

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Π.Μ.Σ. "ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ - ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ
ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ"**



Διδακτορική Διατριβή

ΘΕΜΑ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΗ
ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΠΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΤΟΥ zebrafish, *Danio
rerio* (Hamilton, 1822)**

ΣΦΑΚΙΑΝΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2009

Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπουσα καθηγήτρια:

M. Κεντούρη (Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης)

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή:

M. Κεντούρη (Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης)

I. Καρακάσης (Αναπλ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Γ. Κουμουνδούρος (Επ. Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών)

Μέλη εξεταστικής επιτροπής:

M. Μυλωνάς (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

P. Divanach (Ερευνητής Α' Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών
Ελληνικού κέντρου Θαλασσίων Ερευνών)

K. Μυλωνάς (Ερευνητής Α' Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών
Ελληνικού κέντρου Θαλασσίων Ερευνών)

Σ. Σωμαράκης (Ερευνητής Β' Ινστιτούτου Θαλάσσιων Βιολογικών
Πόρων Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών)

Η μελέτη χρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο (ΕΚΤ), Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευση και Αρχική Επαγγελματική Κατάρτιση (ΕΠΕΑΕΚ II), και ειδικότερα από το Πρόγραμμα ΠΥΘΑΓΟΡΑΣ II.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε σχεδόν στο σύνολό της στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Κανένα από τα βήματα της ακαδημαϊκής και ερευνητικής μου ανέλιξης μέχρι σήμερα δε θα ήταν εφικτό χωρίς την καθηγήτρια μου κα. Μαρουδιώ Κεντούρη. Η παρουσία της αποτέλεσε έναν από τους καθοριστικότερους λόγους για την αρχική απόφασή μου να ξεκινήσω αυτόν το δύσκολο και μακρύ δρόμο που καταλήγει στη λήψη του Διδακτορικού Διπλώματος. Η κα. Κεντούρη αποτελεί κατά την προσωπική μου άποψη την επιτομή της σύγχρονης εκπαιδευτικού, διευθύντριας εργαστηρίου, προϊσταμένης και συνεργάτιδας πράγματα που είμαι σε θέση να γνωρίζω καθώς έχω συνδεθεί και συνδέομαι μαζί της με όλους τους παραπάνω τρόπους. Ένα απλό ευχαριστώ δε θα είναι ποτέ αρκετό και για αυτό επιφυλάσσομαι να της αποδείξω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη όποτε χρειαστεί μέλλοντικά.

Θέλω να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής, Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Καρακάση και Επίκουρο Καθηγητή (και σύντομα επίσης Αναπληρωτή) κ. Γιώργο Κουμουندούρο για τις παρατηρήσεις κατά την πορεία της πραγματοποίησης αυτής της διατριβής, τις διορθώσεις επί του τελικού κειμένου και τη συνολική διάθεσή τους για βοήθεια όποτε τη χρειάστηκα. Ιδιαίτερα δε τον κ. Κουμουندούρο θέλω να τον ευχαριστήσω ακόμη διότι υπήρξε ο άνθρωπος που μου έδειξε τα πρώτα πράγματα στην αρχή της ενασχόλησης μου με το χώρο αλλά και γιατί συμμετείχε στον αρχικό τουλάχιστον σχεδιασμό της παρούσας διατριβής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Ερευνητή Α' του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. κ. Κωνσταντίνο Μυλωνά. Μπορεί η αρχική του «υποχρέωση» να περιοριζόταν στην εξασφάλιση της διενέργειας της ιστολογίας των γονάδων αλλά ο Ντίνος έκανε πολλά παραπάνω από αυτό, δίνοντας μου χρήσιμες συμβουλές τόσο σε προσωπικό όσο και σε επαγγελματικό επίπεδο. Επίσης πρέπει να τον ευχαριστήσω για την εκπληκτικά σχολαστική διόρθωση της διατριβής μου η οποία θα του κόστισε προφανώς αρκετές ώρες από τον πολύτιμο χρόνο του. Δοθείσης της ευκαιρίας, θέλω να ευχαριστήσω και την τεχνικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας

και Αναπαραγωγής (Δρ. Κων/νος Μυλωνάς) του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. κα. Μαρία Παπαδάκη για την πραγματοποίηση των αναλύσεων της ιστολογίας των γονάδων, οι οποίες απαιτούν πολλές ημέρες ενασχόλησης. Η Μαρία ανέλυσε τα δείγματα της διατριβής μου παραμερίζοντας τις υπόλοιπες δικές της υποχρεώσεις εκείνη τη χρονική περίοδο που εγώ επιθυμούσα.

Για τον Ερευνητή Β' του Ινστιτούτου Βιολογικών Πόρων του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. κ. Στέλιο Σωμαράκη τρέφω μεγάλη εκτίμηση και σαν επιστήμονα και σαν άνθρωπο και για αυτό ήμουν αρκετά χαρούμενος όταν δέχθηκε να συμμετάσχει στην επταμελή μου επιτροπή. Πέρα από αυτό όμως, θέλω να τον ευχαριστήσω και για τη βοήθεια του στην επίλυση αρκετών προβλημάτων κυρίως στατιστικής φύσεως που προέκυψαν στην πορεία.

Θέλω να ευχαριστήσω επίσης τα μέλη της επταμελούς μου επιτροπής Καθηγητή Α' του Τμήματος Βιολογίας κ. Μωσή Μυλωνά και τον Διευθυντή του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. κ. Pascal Divanach για τον πολύτιμο χρόνο που αφιέρωσαν συμμετέχοντας στην επιτροπή μου αλλά και για τις διορθώσεις και τα σχόλιά τους πάνω στο γραπτό μου κείμενο.

Ευχαριστώ ακόμη όλα τα μέλη της επταμελούς επιτροπής και για την επικοινωνιακή συζήτηση που προέκυψε κατά τη διάρκεια της εξέτασής μου καθώς είναι ιδιαίτερα δύσκολο να καταφέρεις να συγκεντρώσεις τόσο πολλούς αξιόλογους επιστήμονες σε ένα χώρο και να ασχοληθούν με τη δική σου δουλειά.

Ευχαριστώ πολύ τη Λέκτορα της Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης κα. Ευαγγελία Παπακωνσταντή για το ότι μου παραχώρησε τμήμα του εξοπλισμού στο Εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής για ένα μεγάλο μέρος των αναλύσεων του γαλακτικού οξέος. Αν και απέκλινα πολύ από το αρχικό μου χρονοδιάγραμμα, η Λίτσα όχι μόνο δε δυσανασχέτησε όταν τελικά πήγα, αλλά τόσο εκείνη όσο και η φοιτήτριά της Καλλίνα ήταν από πάνω μου βοηθώντας με σε κάθε σημείο που χρειάστηκα κάτι.

Θέλω να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τους πρώην φοιτητές του Εργαστηρίου κ. Ιωάννη Λέρη και κα. Νατάσα Λάγκη διότι συμμετείχαν σε πολλά από τα κομμάτια της παρούσας διατριβής τα οποία θα ήταν πρακτικά αδύνατο να ολοκληρωθούν εάν δεν υπήρχε η δική τους βοήθεια. Πέραν αυτών όμως, πρέπει να ευχαριστήσω και όλα τα παιδιά του εργαστηρίου για τη δημιουργία στις περισσότερες των περιπτώσεων ιδανικών συνθηκών εργασίας μέσα στο μικρό χώρο που συνυπάρχουμε. Ονομαστικά λοιπόν θα αναφέρω τη Μαρία Νεοφύτου, την Αλίκη Καρούσου και τον Ιάσωνα Πετρούτσο. Σε αυτό το σημείο θέλω να ευχαριστήσω τη Χρύσα Δόξα η οποία αν και

δε συμμετείχε καθόλου στη διατριβή μου, εντούτοις με βοήθησε σε μια σειρά από άλλα πειράματα που διενεργούνταν παράλληλα και τα οποία δε θα κατάφερνα να πραγματοποιήσω εάν δεν ήταν εκείνη.

Από τη γραμματεία του Τμήματος Βιολογίας, θέλω να ευχαριστήσω τις κυρίες Χαρά Ζαφειροπούλου και Ελευθερία Λαρεντζάκη επειδή αλόγγυστα πραγματοποιούσαν τα αιτήματα μου της τελευταίας –ως συνήθως- στιγμής αλλά και τις Ελένη, Ελπίδα και Πέτρα για την εξυπηρέτηση σε κάθε λογής ζητήματα που προέκυπταν καθημερινά.

Ευχαριστώ τη Στάσα από το εργαστήριο «Φυσιολογία και Βιοτεχνολογία Φυτών» για το ότι μου επέτρεψε να χρησιμοποιήσω μέρος του εξοπλισμού τους για την ανάλυση του γαλακτικού οξέος.

Ευχαριστώ θερμά τη συμφοιτήτρια και συνοδοιπόρο μέχρι σήμερα Vera Szisch (ή κάπως έτσι) για την παρέα της, για τις κουβέντες που έχουμε κάνει και συνεχίζουμε να κάνουμε και για το γεγονός ότι τα πολλές φορές κοινά μας προβλήματα βρίσκουν παρηγοριά και βάλαμο μόνο όταν τα εκμυστηρεύομαστε ο ένας στον άλλο.

Ευχαριστώ τον Λέκτορα του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών κ. Άρη Παρμακέλη για την παρέα του στα πρώτα χρόνια της τέλεσης αυτής της διατριβής (και κυρίως τα μοναχικά Σαββατοκύριακα) και γιατί όσες φορές ζήτησα τη βοήθεια ή τη γνώμη του για κάτι μου έδινε πάντα απίστευτα επιστημονικά τεκμηριωμένες απαντήσεις. Τον θεωρώ έναν από τους πιο ολοκληρωμένους επιστήμονες του χώρου.

Φυσικά δε μπορώ να ξεχάσω να ευχαριστήσω το φίλο και συμφοιτητή Γιάννη Παπαδάκη διότι αν και “μικρότερος” έχει την τάση να μου δίνει πάντα συμβουλές για το καλό μου. Γιάννη, σε ευχαριστώ και...άσε και λίγη από τη μηλόπιτα.

Ευχαριστώ ιδιαιτέρως το Μαριώ μου για την ψυχολογική υποστήριξη κυρίως κατά τον τελευταίο και πιο δύσκολο χρόνο του διδακτορικού αλλά και για την πρακτική της βοήθεια τόσο στα πειράματα της κολυμβητικής ικανότητας και του γαλακτικού οξέος, όσο και στη συγγραφή της παρούσας διατριβής. Κούκλα μου, είσαι θησαυρός!

Φτάνοντας προς το τέλος του μακρύ αυτού καταλόγου ευχαριστιών, προφανώς ένα μεγάλο ευχαριστώ αρμόζει στους γονείς μου και στην αδελφή μου για λόγους οι οποίοι δεν αποτυπώνονται εύκολα στο χαρτί.

Η παρούσα διατριβή αφιερώνεται σε όλους εκείνους που με βοήθησαν και συνεχίζουν να είναι δίπλα μου...

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΦΑΙΝΟΤΥΠΙΚΗ ΠΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	2
ΤΟ ZEBRAFISH	5
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	12
ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Η ΕΚΤΡΟΦΗ	14
Η ΕΚΤΡΟΦΗ ΤΟΥ ZEBRAFISH.....	15
ΚΕΦ. 1: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ZEBRAFISH.	21
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	22
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	29
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
ΚΕΦ. 2: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΡΙΣΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΩΝ ΤΟΥ ZEBRAFISH.	49
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	50
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	53
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	61
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	71
ΚΕΦ. 3: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ZEBRAFISH.	76
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	77
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	80
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	82
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	84
ΚΕΦ. 4: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΚΟΛΥΜΒΗΣΗΣ ΙΧΘΥΛΙΩΝ ZEBRAFISH.	89
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	90
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	101
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	109
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	113
ΚΕΦ. 5: ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟΥΣ ΜΥΕΣ ΤΟΥ ZEBRAFISH.	117
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	118
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	122
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	128
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	132

ΕΠΙΛΟΓΟΣ	137
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	143
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	146
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	174
ABSTRACT	179

ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Φαινοτυπική πλαστικότητα και θερμοκρασία

Με τον όρο φαινοτυπική πλαστικότητα ορίζεται η ιδιότητα ενός γονοτύπου να παράγει ποικίλους φαινότυπους, ως απόκριση στις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες υπόκειται (Pigliucci *et al.* 2006). Αυτή η απόκριση μπορεί να εκφράζεται σε μορφολογικό, βιοχημικό, φυσιολογικό ή αναπτυξιακό επίπεδο (οντογενετική πλαστικότητα) και εμφανίζεται στο σύνολο των ζωικών και φυτικών οργανισμών.

Η μεγάλη πλειοψηφία των οργανισμών διαβιούν σε περιβάλλοντα με συνεχώς μεταβαλλόμενες συνθήκες και ως εκ τούτου χρειάζονται κάποιο μηχανισμό για την επιτυχή αντιμετώπιση των καταστάσεων αυτών. Έτσι, διαμορφώνουν κατάλληλα συγκεκριμένους χαρακτήρες τους με απώτερο στόχο την επιτυχή προσαρμογή τους στις κυμαινόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες και άρα τη διαφύλαξη των ζωικών τους δραστηριοτήτων (*φαινοτυπική πλαστικότητα*) (Debat & David 2001). Το εύρος της φαινοτυπικής πλαστικότητας ποικίλλει όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών συστηματικών ομάδων, αλλά και μέσα στο ίδιο είδος ανάλογα με τον περιβαλλοντικό παράγοντα στον οποίο οφείλει να προσαρμοσθεί.

Το φαινόμενο της φαινοτυπικής πλαστικότητας έχει μελετηθεί εκτενώς σε πολλούς φυτικούς και ζωικούς οργανισμούς και οφείλεται στη διαφορική έκφραση των γονιδίων (Gilbert 2001). Είναι δε τόσο ισχυρή η παρουσία της, ώστε σε κάποιες περιπτώσεις οι παραγόμενοι φαινότυποι, μπορεί να είναι τόσο διαφορετικοί μεταξύ τους, που να θεωρηθεί ότι οι οργανισμοί ανήκουν σε διαφορετικά είδη (Gilbert 2001). Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που οδηγούν στην εμφάνιση της πλαστικότητας περιλαμβάνουν όλους τους αβιοτικούς και βιοτικούς που χαρακτηρίζουν κάθε οικοσύστημα.

Τα ψάρια, ειδικότερα εκείνα των γλυκών υδάτων, αντιμετωπίζουν επίσης ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους. Αποτελούν επομένως μια από τις πλέον ευπροσάρμοστες ομάδες οργανισμών, με άμεσες

προσαρμογές πλήθους χαρακτηριστικών (μεταβολικής, φυσιολογικής, μορφολειτουργικής και ηθολογικής φύσεως), οι οποίες στην πλειονότητά τους πραγματοποιούνται κατά τη διάρκεια της οντογένεσης (Kendall *et al.* 1984).

Οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με τη φαινοτυπική πλαστικότητα στα ψάρια είναι πάρα πολλές και έχουν συνδυάσει πλήθος περιβαλλοντικών παραγόντων με διάφορους επηρεαζόμενους χαρακτήρες στους οργανισμούς. Έτσι, έχει βρεθεί ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης, το pH, η φωτοπερίοδος, η αλατότητα και το οξυγόνο επηρεάζουν σημαντικά την επιβίωση, τη μορφολογία, την αναπαραγωγή και γενικότερα όλη τη ζωή των ψαριών (Lindsey 1988, Koumoundouros *et al.* 2001a, 2002a, Sfakianakis *et al.* 2004, Georgakopoulou *et al.* 2007a).

Από όλους τους περιβαλλοντικούς παράγοντες όμως που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, η θερμοκρασία διαδραματίζει το σημαντικότερο ρόλο σε όλους τους τομείς της βιολογίας των ψαριών κυρίως επειδή πρόκειται για εξώθερμους οργανισμούς (Blaxter 1969, 1988, 1992, Fry 1971, Conover & Kynard 1981, Policansky 1982, Seikai *et al.* 1986, Polo *et al.* 1991, Blaxter 1992, Fuiman *et al.* 1998, Koumoundouros *et al.* 2001a, 2002a). Επομένως, και δεδομένης της κλιμακούμενης παγκόσμιας ανησυχίας για την αύξηση της θερμοκρασίας (βλ. φαινόμενο του θερμοκηπίου), είναι κατανοητό ότι μελέτες σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στους θαλάσσιους οργανισμούς, και ειδικότερα στα ψάρια, τυγχάνουν ιδιαίτερης προσοχής τα τελευταία χρόνια (Ospina-Alvarez & Piferrer 2008).

Έχει καταγραφεί ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης επιδρά δραστικά στην εκκόλαψη (Herzig & Winkler 1986), την ανάπτυξη (Fukuhara 1990, Gibson & Johnston 1995, Herzig & Winkler 1986, Lein *et al.* 1997, Polo *et al.* 1991), την αύξηση (Herzig & Winkler 1986, Rana 1990b, Martell *et al.* 2005), το μεταβολισμό (Herzig & Winkler 1986), τη διαδοχή της τροφής, την απορρόφηση της λεκίθου (Fukuhara 1990), την ανάπτυξη των μυών (Wilkes *et al.* 2001, Koumoundouros *et al.* 2009a), τη χρονική στιγμή εμφάνισης κάποιων χαρακτηριστικών (Fukuhara 1990, Gibson & Johnston 1995, Sfakianakis *et al.* 2004), τη μορφολογία (Lindsay 1988, Wimberger 1992, Tudela 1999, Pakkasmaa & Piironen 2001, Koumoundouros *et al.* 2001a, Cabral *et al.* 2003, Silva 2003, Turan 2004, Sfakianakis *et al.* 2006, Georgakopoulou *et al.* 2007a), τους

μεριστικούς χαρακτήρες (Turan 2004, Georgakopoulou *et al.* 2007a), την εμφάνιση μορφοανατομικών παραμορφώσεων (Polo *et al.* 1991, Koumoundouros *et al.* 2001b, Sfakianakis *et al.* 2006, Georgakopoulou *et al.* 2007b), την κολυμβητική ικανότητα (Koumoundouros *et al.* 2002b, Koumoundouros *et al.* 2009a), τον καθορισμό του φύλου (Koumoundouros *et al.* 2002a) και συνολικά την επιβίωση (Fukuhara 1990, Lein *et al.* 1997) και τη διάρκεια ζωής των ψαριών (Malek *et al.* 2004).

Η πλαστικότητα που επιδεικνύουν τα ψάρια είναι σημαντική όχι μόνο λόγω της αξίας που έχει για την προσαρμοστικότητα των φυσικών πληθυσμών, αλλά και για τη δυνατότητα που δίνει στον επιστήμονα να μεταβάλλει ανάλογα με το προσδοκούν αποτέλεσμα τις βιολογικές παραμέτρους των εκτρεφόμενων πληθυσμών. Πέρα από αυτά, η μελέτη της μπορεί να δώσει πλήθος απαντήσεων σε ερωτήματα κυρίως εξελικτικής αλλά και οικολογικής φύσεως τα οποία μένουν έως σήμερα αναπάντητα. Καθότι όμως είναι πρακτικά αδύνατο να μελετηθούν ξεχωριστά όλα τα γνωστά είδη ψαριών, είναι επιβεβλημένη η χρήση ενός οργανισμού τα αποτελέσματα του οποίου θα μπορούσαν να αναχθούν και στους υπόλοιπους. Τέτοιον οργανισμό μπορεί να αποτελέσει το zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton 1822) το οποίο συγκεντρώνει πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σύγκριση με τα άλλα είδη των οποίων η εκτροφή και η πλήρης παρακολούθηση του κύκλου τους είναι εφικτά.

To zebrafish

Ταξονομία και φυσική κατανομή του zebrafish

Πίνακας 1. Ταξινομική κατάταξη του zebrafish (Froese & Pauly 2008, Integrated Taxonomic Information System, 2008).

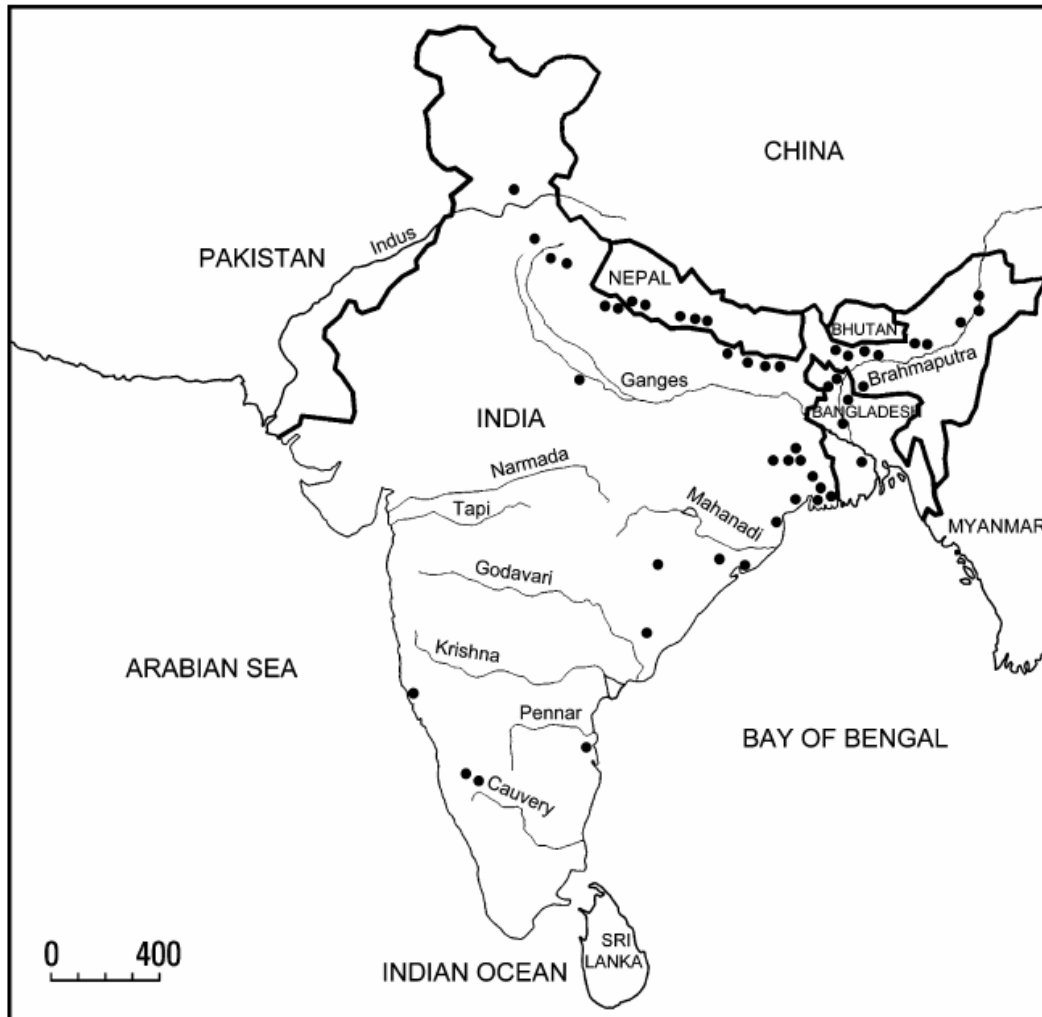
Βασίλειο	Animalia
Φύλο	Chordata
Υπόφυλο	Vertebrata
Υπερομοταξία	Gnathostomata
Ομοταξία	Actinopterygii
Υφομοταξία	Teleostei
Τάξη	Cypriniformes
Υποτάξη	Ostariophysii
Οικογένεια	Cyprinidae
Γένος	<i>Danio</i>
Είδος	<i>Danio rerio</i>

Το γένος *Danio* (Hamilton 1822), ανήκει στην υποοικογένεια Rasborinae (Howes 1991) και είναι μια αρκετά διαφοροποιημένη ομάδα μικρών πολύχρωμων ψαριών του γλυκού νερού της Νότιας Ασίας. Το όνομα του γένους προέρχεται από τη λέξη «*dhani*» που στη γλώσσα Bengali σημαίνει «από τον ορυζώνα» (Talwar & Jhingran 1991). Τα είδη του γένους αυτού χαρακτηρίζονται από το μικρό τους μέγεθος (< 120 mm ολικό μήκος), την παρουσία μίας χαρακτηριστικής εγκοπής στο περιθώριο της οδοντοστοιχίας (danionin notch) και ένα ξεχωριστό χρωματικό πρότυπο που βασίζεται σε εναλλαγές σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων οριζόντιων ριγών (Spence *et al.* 2008)



Εικόνα 1. Αρσενικό (A) και θηλυκό (B) zebrafish, από πληθυσμό του εργαστηρίου.

Το zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton 1822) ή *Brachydanio rerio* όπως αναφέρεται συχνά (Lambert 1997, Sandford 2003), αποτελεί ίσως το πιο κοινό είδος του γένους αυτού (Εικόνα 1). Ζει σε περιοχές της Βορειοανατολικής Ινδίας, του Μπαγκλαντές (Barman 1991, Menon 1999, Spence *et al.* 2008) του Πακιστάν (Laale 1977, Menon 1999), του Νεπάλ (Menon 1999, Spence *et al.* 2008), της Myanmar (Menon 1999) και του Bhutan (Petr 1999) (Εικόνα 2). Νέα στοιχεία αναφέρουν ότι μάλλον έχει περιοριστεί η εξάπλωσή του στο φυσικό περιβάλλον λόγω της συνεχώς αυξανόμενης ανθρωπογενούς επίδρασης στα οικοσυστήματα των περιοχών αυτών (Engeszer *et al.* 2007). Έχει βρεθεί και στην Κολομβία, πιθανώς εξαιτίας διαφυγής από εγκατάσταση εκτροφής του (Welcomme 1988).



Εικόνα 2. Κατανομή του zebrafish στο φυσικό περιβάλλον (από Spence *et al.* 2008).

Στοιχεία μορφολογίας, οικολογίας και βιολογίας του zebrafish

Το zebrafish είναι γενικά μικρό σε μέγεθος: τα ενήλικα φτάνουν τα 30-40 mm τυπικό μήκος (standard length, SL), (Barman 1991) ή σύμφωνα με άλλους ερευνητές τα 60 mm ολικό μήκος (total length, TL), (Riehl & Baensch 1991). Ο τύπος κολύμβησής του είναι ο «subcarangiform» (Plaut & Gordon 1994) που επιτυγχάνεται με τη χρήση του οπίσθιου μισού τμήματος του σώματος (1/2 - 2/3 του συνολικού μυϊκού ιστού). Το σώμα του είναι στενόμακρο (Talwar & Jhingran 1991) και τέσσερις (Maderspracher & Nüsslein-Volhard 2003) ή πέντε (Talwar & Jhingran 1991) ομοιόμορφα χρωματισμένες

μπλε λωρίδες εκτείνονται από το κεφάλι μέχρι τις ακτίνες του ουραίου πτερυγίου σε κάθε πλευρά του σώματος. Ανάλογες ρίγες εμφανίζονται και στο εδρικό πτερύγιο, το οποίο εμφανίζει 10-12 διακλαδιζόμενες μαλακές ακτίνες, ενώ τα θωρακικά πτερύγια εμφανίζουν 11-12 και τα κοιλιακά 6. Το στόμα είναι τοποθετημένο ραχιαία ενώ στην κοιλιακή πλευρά υπάρχει ένα ζευγάρι δερματικών αποφύσεων ή «μουστάκια» (barbells) (Talwar & Jhingran 1991). Μπορεί να αντιληφθεί ένα ευρύ πεδίο ηχητικών συχνοτήτων, χρησιμοποιώντας τα οστάρια του Weber (Popper & Coombs 1980). Τα ενήλικα άτομα εμφανίζουν φυλετικό διμορφισμό: τα αρσενικά έχουν πιο ατρακτοειδές σώμα και κίτρινο χρώμα ανάμεσα στις ρίγες, ενώ τα θηλυκά είναι μεγαλύτερα νωτο-κοιλιακά και έχουν ασημί χρώμα ανάμεσα στις ρίγες (Lambert 1997; Προσωπικές παρατηρήσεις) (Εικόνα 1).

Το zebrafish είναι ένα τροπικό βενθοπελαγικό ψάρι. Το ιδανικό pH για την επιβίωση και αναπαραγωγή του κυμαίνεται από 6 έως 8, ενώ η σκληρότητα του νερού από 5 έως 19 (dH), (Froese & Pauly 2008). Η αναπαραγωγή του zebrafish επιτυγχάνεται αρκετά εύκολα σε συνθήκες εργαστηρίου. Στο φυσικό περιβάλλον, αναπαράγεται σε ανοιχτά νερά και τα αβγά σκορπίζονται και πέφτουν στο υπόστρωμα (open water egg scatterers), (Riehl & Baensch 1991). Τα αβγά είναι βενθικά με διάμετρο 600-700 μm και εκκολάπτονται σε 48-72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (Kimmel *et al.* 1995), ανάλογα με τη θερμοκρασία. Δεν υπάρχει η παραμικρή γονική φροντίδα (Riehl & Baensch 1991), αντίθετα είναι συνηθισμένο οι γονείς να καταβροχθίζουν τα αβγά (προσωπικές παρατηρήσεις).

Στις περιοχές όπου εξαπλώνεται το zebrafish, επικρατεί «κλίμα μουσώνων» που εμφανίζει μεγάλη εποχική διαφοροποίηση όσον αφορά στα οικοσυστήματα γλυκού νερού. Συγκεκριμένα, υπάρχει ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών στα ενδιαίτημα του zebrafish, που μπορεί να κυμαίνεται από 6°C το χειμώνα μέχρι πάνω από 38°C το καλοκαίρι (Spence *et al.* 2008). Ζει σε κανάλια, ρυάκια, λιμνούλες (Talwar & Jhingran 1991, Pitchard *et al.* 2001), ορυζώνες και γενικά σε υδάτινους όγκους με στάσιμο ή χαμηλής ροής νερό (Talwar & Jhingran 1991). Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αναφορές για παρουσία του σε ποτάμια και ρυάκια μεγαλύτερης ροής (Daniels 2002), σε γενικές γραμμές το zebrafish φαίνεται να είναι πιο πολύ είδος που ζει σε πλημμυρισμένες εκτάσεις (lotic) παρά σε ποτάμια (lentic) (Spence *et al.* 2008). Εμφανίζει μεγάλη αφθονία

στα οικοσυστήματα αυτά και σχηματίζει κοπάδια των 2-10 ατόμων, δείχνοντας προτίμηση σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερου μεγέθους κοπάδια (Pritchard *et al.* 2001). Η διαίτά του σύμφωνα με αναλύσεις στομαχικών περιεχομένων, περιλαμβάνει σκουλήκια, μικρά καρκινοειδή (Mills & Vevers 1989), έντομα και νύμφες εντόμων, ζωοπλαγκτόν καθώς και ανόργανα υλικά (Spence *et al.* 2008). Έτσι, το zebrafish μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολύ αποτελεσματικά για τον έλεγχο των κουνουπιών (Shrestha 1990).

Τέλος, το zebrafish είναι ένα πολύ δημοφιλές είδος στους ενυδρείοφίλους (Axelrod *et al.* 1986, Plaut & Gordon 1994, Arunachalam *et al.* 2000) εξαιτίας της ενεργητικής συμπεριφοράς του (εμφανίζει μεγάλη κινητικότητα) και της ευκολίας με την οποία μπορεί να συντηρηθεί και ίσως να αναπαραχθεί στο σπίτι.

Το zebrafish ως πειραματικό μοντέλο

Το zebrafish, όπως προαναφέρθηκε, εκτός από εξαιρετικά δημοφιλές κατοικίδιο (Axelrod *et al.* 1986, Plaut & Gordon 1994, Arunachalam *et al.* 2000), είναι σήμερα ένα πολύ χρήσιμο εργαλείο σε διάφορα πεδία έρευνας, όπως σε περιβαλλοντικά θέματα που αφορούν στην ποιότητα του νερού (Sprague & Fogels 1977) και σε έρευνες στους τομείς της νευροβιολογίας (Key & Devine 2003, Amsterdam & Hopkins 2006) και αναπτυξιακής βιολογίας (Yoder *et al.* 2002, Valdesalici & Cellerino 2003, Key & Devine 2003, Goldsmith & Harris 2003, Larson *et al.* 2004, Amsterdam & Hopkins 2006). Εκτός από αυτούς τους τομείς, έχει χρησιμεύσει ως οργανισμός μοντέλο στη γενετική (Kimmel 1989, Ingham 1997, Chen & Ekker 2004, Trede *et al.* 2004, Amsterdam & Hopkins 2006), στην εμβρυογένεση (Kimmel *et al.* 1995), στη γεροντολογία (Gerhard & Cheng 2002, Gerhard 2003), στην οικοτοξικολογία (Neilson *et al.* 1990, Ensenbach & Nagel 1995, Diekmann *et al.* 2004), στην ανοσολογία (Yoder *et al.* 2002, Trede *et al.* 2004) και στην έρευνα πάνω στους μοριακούς μηχανισμούς των ασθενειών (Kimmel *et al.* 1995, Berman *et al.* 2003, Goldsmith & Harris 2003).

Το γεγονός ότι το zebrafish είναι από τα λίγα σπονδυλωτά που μπορεί να κλωνοποιηθούν σχετικά εύκολα και έχουν περίοδο γενεάς τόσο μικρή ώστε να επιτρέπει

γενετικούς χειρισμούς σε διαφορετικές γενιές, είναι πολύ σημαντικό για τη χρήση του στην έρευνα (Plaut & Gordon 1994). Πιο συγκεκριμένα, τα χαρακτηριστικά που καθιστούν το zebrafish έναν από τους πιο σημαντικούς οργανισμούς μοντέλα για τη σύγχρονη επιστήμη είναι τα παρακάτω:

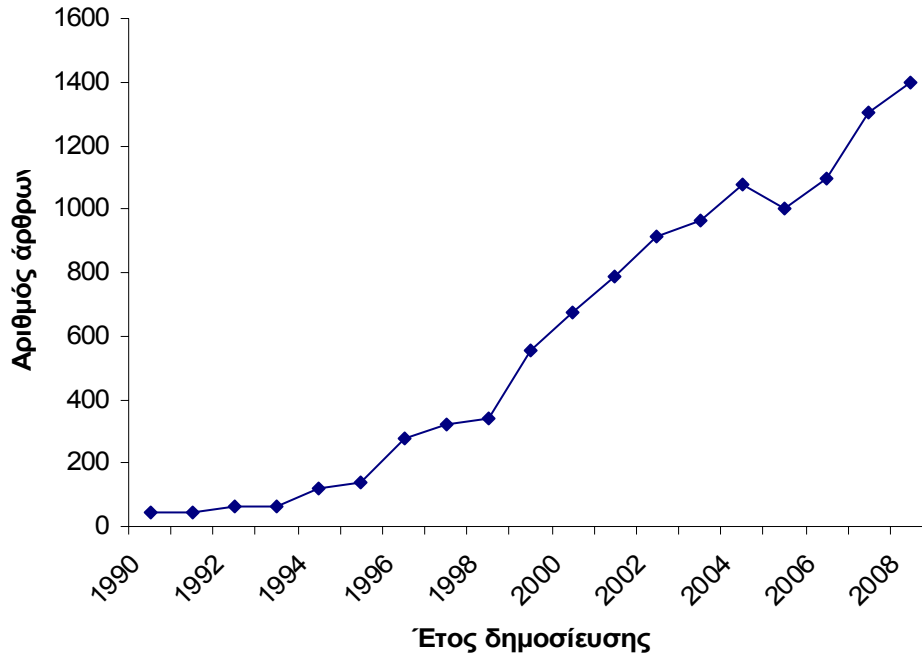
- Μικρός κύκλος γενεάς (χρόνος από το αυγό μέχρι το ώριμο άτομο, 10-12 εβδομάδες)
- Διαφανή έμβρυα (επιτρέπουν τη συνεχή παρατήρηση των αναπτυξιακών σταδίων)
- Καλά καθορισμένα αναπτυξιακά στάδια (Kimmel 1989)
- Υψηλή γονιμότητα
- Εύκολη διαχείριση
- Μικρό κόστος συντήρησης
- Περιορισμένες απαιτήσεις σε χώρο (Gerlai 2003).

Επιπροσθέτως, τα zebrafish προσφέρονται για πληθώρα γενετικών μεθοδολογιών, όπως τη δημιουργία διαγονιδιακών στελεχών, τους γενετικούς ελέγχους μεταλλαγμένων σειρών, την αποσιώπηση της μετάφρασης οποιουδήποτε γονιδίου και, πρόσφατα, τη στοχευμένη μεταλλαξιγένεση γονιδίων. Ακόμη, τα zebrafish είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για τη μελέτη του καρδιαγγειακού συστήματος καθώς η ανάπτυξη, η λειτουργία και οι μηχανισμοί οι οποίοι οδηγούν σε καρδιαγγειακά νοσήματα μπορούν να μελετηθούν με μη επεμβατικές μεθόδους μικροσκοπίας σε ζωντανά έμβρυα, αφού αυτά είναι διάφανα, μια ιδιότητα μοναδική για σπονδυλωτά ζωικά πρότυπα. Η καρδιά αρχίζει να κτυπά την πρώτη μέρα μετά τη γονιμοποίηση και μπορεί να παρατηρηθεί καθώς ολοκληρώνει τη μορφογένεσή της κατά τις επόμενες ημέρες. Τα zebrafish είναι επίσης ιδανικά για την ταχεία πειραματική επιβεβαίωση μεγάλου όγκου πληροφοριών, οι οποίες προκύπτουν από τις γονιδιωματικές μεθοδολογίες (πρωτεομική, μεταγραφομική παράλληλη αλληλούχηση). Στόχος είναι να συνδυαστούν χάρτες της ανάπτυξης του zebrafish με κατάλληλους αισθητήρες και μικροσκοπικές τεχνικές προκειμένου να υπάρξουν

ποιοτικές αλλά και ποσοτικές πληροφορίες για βιολογικές διεργασίες κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης. Με αυτόν τον τρόπο θα είναι δυνατό οι διεργασίες αυτές να περιγραφούν και να μελετηθούν με μαθηματικά μοντέλα, σύμφωνα με τη μεθολογία της Βιολογίας Συστημάτων (Beis *et al.* 2005, Beis & Steinier 2006).

Επιπλέον, σε αντίθεση με τα θηλαστικά, τα zebrafish έχουν αξιοθαύμαστη ικανότητα αναγέννησης ιστών και οργάνων – ακόμα και της καρδιάς και του παγκρέατος. Οι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που ελέγχουν τη συντήρηση βλαστικών κυττάρων και επιτρέπουν την πλαστικότητα αναμόρφωσης ενηλίκων ιστών παραμένουν άγνωστοι. Η μελέτη των μηχανισμών αναγέννησης στο zebrafish στοχεύει στη μεταφορά των συμπερασμάτων στον άνθρωπο και την αξιοποίηση ομόλογων μορίων για θεραπευτικούς σκοπούς. Πλεονεκτήματα του zebrafish πάνω σε αυτό αποτελούν το ότι διαθέτει υψηλή γενετική ομολογία με τον άνθρωπο (85% ομοιότητα) αλλά και εγείρει πολύ λιγότερους ηθικούς περιορισμούς σε σύγκριση με άλλα ζωικά μοντέλα. Ενθαρρυντικά αποτελέσματα από μελέτες στα zebrafish, με πιθανές εφαρμογές στη θεραπεία ανθρώπινων νόσων, έχουν ήδη υπάρξει στη νευροβιολογία, σε μελέτες συμπεριφοράς (μελέτη ύπνου, πόνου, εξάρτησης) και σε νευροεκφυλιστικές παθήσεις που προκαλούνται λόγω γήρανσης. Οι φαρμακευτικές εταιρείες χρησιμοποιούν όλο και περισσότερο τα zebrafish λόγω του μικρού τους μεγέθους και της πληθώρας απογόνων για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας ή τοξικότητας νέων ουσιών, πιθανών φαρμάκων. Τα πειράματα αυτά μπορούν να γίνουν σε έμβρυα λίγων ημερών, τα οποία δεν έχουν πλήρως αναπτυγμένο νευρικό σύστημα και, συνεπώς, δεν αισθάνονται πόνο. Αυτό οδηγεί σε δραματική μείωση της χρησιμοποίησης θηλαστικών κατά τη διάρκεια της προκλινικής αξιολόγησης ενός πειραματικού φαρμάκου, σύμφωνα με τις διεθνείς αρχές βιοηθικής (Lieschke & Currie 2007).

Συνέπεια όλων των παραπάνω αποτελεί το γεγονός ότι περισσότερα από 400 εργαστήρια παγκοσμίως χρησιμοποιούν σήμερα το zebrafish τόσο σε βασική όσο και σε εφαρμοσμένη έρευνα. Ιδιαίτερα τα τελευταία 10-15 χρόνια παρατηρείται ένα διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση του ως μοντέλο σε διάφορους τομείς (Εικόνα 3).



Εικόνα 3: Αριθμός άρθρων ανά έτος σχετικά με το zebrafish σε διεθνή περιοδικά με κριτές. Η αναζήτηση έγινε στη μηχανή www.scopus.com (search “zebrafish” in Article title, Keywords, Abstract).

Σκοπός της παρούσας διατριβής:

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης (εκτροφής) στη φαινοτυπική πλαστικότητα (μορφολογική και λειτουργική) που εμφανίζει το zebrafish. Εξετάστηκαν μια σειρά από διαφορετικούς χαρακτήρες, ζωτικής σημασίας για την επιβίωση του ζώου οι οποίοι συνδυαζόμενοι, συνθέτουν ένα πληροφοριακό μωσαϊκό που καλύπτει σημαντική ένδεια γνώσης πάνω τη βιολογία του.

Ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν 4 διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης (22, 25, 28 και 31 °C) μέσα στα όρια της επιτυχούς εκτροφής του οργανισμού (προσωπικά αδημοσίευτα αποτελέσματα) οι οποίες εφαρμόστηκαν από το στάδιο του αυγού μέχρι και

μετά τη μεταμόρφωση. Στο μεταμορφωμένο πλέον ιχθύδιο, εξετάστηκαν οι ακόλουθοι 6 χαρακτήρες:

1. Σκελετικές παραμορφώσεις
2. Σχήμα του σώματος
3. Μεριστικοί χαρακτήρες
4. Διαφοροποίηση του φύλου
5. Ικανότητα κολύμβησης, και
6. Μεταβολισμός γαλακτικού οξέος στους μύες

Οι τρεις πρώτοι από τους προαναφερθέντες χαρακτήρες συνιστούν τμήμα της μορφολογίας του οργανισμού ενώ οι τρεις τελευταίοι τμήμα της λειτουργίας του.

ΓΕΝΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ: Η
ΕΚΤΡΟΦΗ

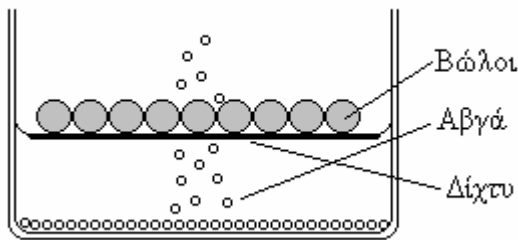
Η εκτροφή του zebrafish

Η διαδικασία εκτροφής για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε εξολοκλήρου στο Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Η συλλογή των αβγών

Χρησιμοποιήθηκαν αβγά από πληθυσμό γεννητόρων του εργαστηρίου (αγρίου τύπου, ZF WT2 F5, Wageningen Agricultural University, The Netherlands) οι οποίοι διατηρούνταν σε ενυδρείο χωρητικότητας 35 l με εξωτερικό σύστημα φιλτραρίσματος του νερού (φίλτρο 2217, EHEIM, Germany). Καθ' όλη την περίοδο της αναπαραγωγής, η φωτοπερίοδος διατηρήθηκε στις 12 ώρες φως και 12 ώρες σκοτάδι και η θερμοκρασία στους $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ με τη χρήση αντιστάσεων με θερμοστάτη (Visi-Therm 100W, Aquarium Systems Inc., Ohio, USA). Οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν, θεωρούνται – σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Westerfield 1995, Lawrence 2007) – ως οι βέλτιστες για την ωοτοκία του είδους. Οι γεννήτορες ταΐζονταν καθημερινά, τρεις φορές την ημέρα (πρωί - μεσημέρι - βράδυ), με βιομηχανική ξηρή τροφή σε νιφάδες (TetraMin, Tetra GmbH, Germany) ενώ κάθε τρεις ημέρες το βραδινό γεύμα αντικαθίστατο με ναύπλιους *Artemia* sp. [Instar I, (Selco, INVE S.A., Belgium)]. Η παραγωγή της *Artemia* sp. (για τους γεννήτορες και για τις εκτροφές των νυμφών) γινόταν στο εργαστήριο, σε κυλινδρικό δοχείο (1 l) με νερό αλατότητας 35 ‰, σε θερμοκρασία 28°C και με χρήση έντονου αερισμού. Την ημέρα πριν από την καθορισμένη συλλογή αβγών, γινόταν μεγάλη αλλαγή νερού (περίπου 80%) γεγονός που – σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Westerfield 1995) αλλά και από προσωπικές παρατηρήσεις – επάγει την ωοτοκία.

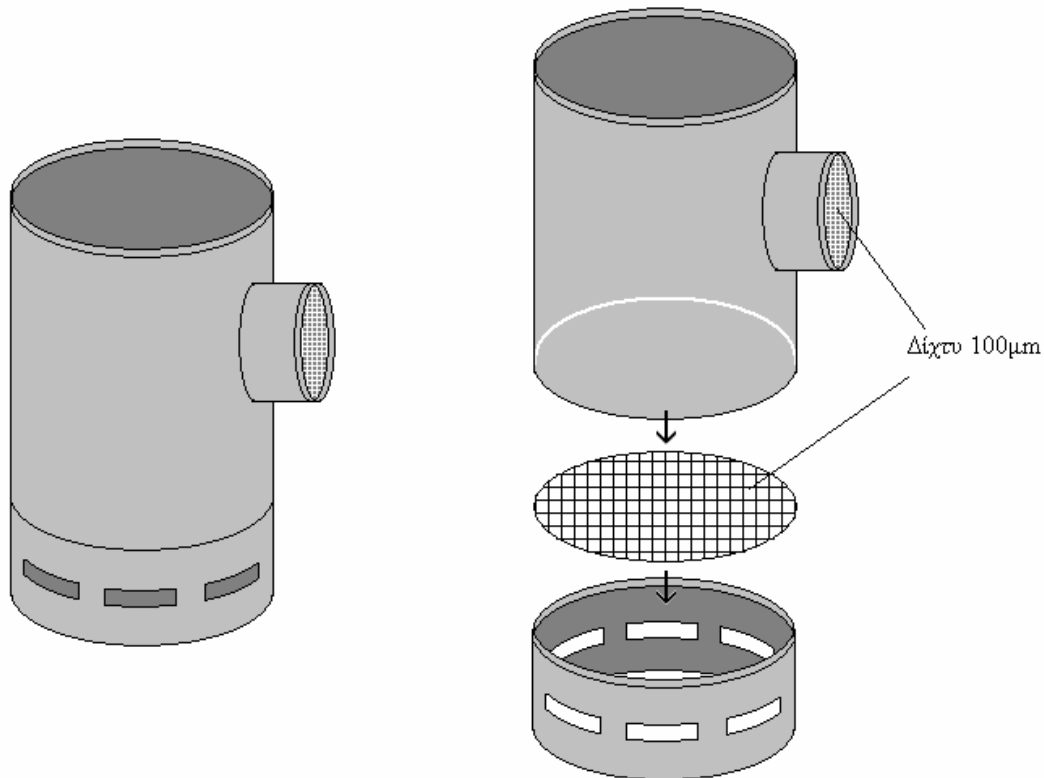
Μετά τη χορήγηση των ναυπλίων *Artemia*, ειδικές συσκευές συλλογής αβγών ή «γεννήστρες» (Εικόνα 4), τοποθετούνταν στον πυθμένα των ενυδρείων. Κάθε «γεννήστρα» αποτελούνταν από ένα πλαστικό δοχείο χωρισμένο στα δύο (πάνω και



Εικόνα 4. Ειδική κατασκευή για τη συλλογή των αβγών («γεννήστρα»).

κάτω) με τη βοήθεια διχτυού, που επέτρεπε στα αβγά να περάσουν και να μαζευτούν στο κάτω μέρος του ώστε να μη φαγωθούν από τα ψάρια. Πάνω στο δίχτυ τοποθετούνταν πολύχρωμοι γυάλινοι βόλοι, οι οποίοι προσέλκυαν τα ψάρια ώστε να αποθέσουν τα αβγά τους εκεί.

Το πρωί της επόμενης ημέρας, μετά το ζευγάρισμα, γινόταν η συλλογή, καταμέτρηση, διαλογή και καθαρισμός των αβγών. Η καταμέτρηση και η διαλογή των αβγών γίνονταν κάτω από στερεοσκόπιο (SZX9, Olympus, USA) με τη χρήση τρυβλίων Petri και πλαστικής πιπέτας. Στη συνέχεια, τα αβγά εμβαπτιζόνταν σε διάλυμα υπεροξειδίου (Hydrogen Peroxide, H_2O_2), $0,001 \text{ g l}^{-1}$ για 12-15 λεπτά (Rach *et al.* 1998), για την καταπολέμηση των μυκήτων και τοποθετούνταν ανά 300 σε ειδικές κυλινδρικές κατασκευές εκκόλαψης (Εικόνα 5) εφοδιασμένες με δίχτυ ($100 \mu\text{m}$) το οποίο επέτρεπε την καλή κυκλοφορία του νερού ενώ ταυτόχρονα περιόριζε την διαφυγή της ζωντανής τροφής κατά το τάισμα.



Εικόνα 5. Ειδική κυλινδρική κατασκευή εκκόλαψης.

Η εκτροφή των νυμφών

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα ενυδρεία χωρητικότητας 130 λίτρων σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες (22, 25, 28 και 31°C). Όλα τα πειράματα έγιναν σε δύο επαναλήψεις (Α και Β) στο ίδιο ενυδρείο. Προς τούτο, τα ενυδρεία ήταν χωρισμένα στη μέση με πλαστικό πλέγμα ώστε σε κάθε πλευρά να υπάρχει και από μία κυλινδρική κατασκευή εκκόλαψης. Για τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας, στους 22 και 25°C, χρησιμοποιήθηκε ψυκτικός μηχανισμός και αντίσταση με θερμοστάτη ενώ στους 28 και 31°C μόνο αντίσταση με θερμοστάτη. Ακόμη, τα ενυδρεία εκτροφής ήταν εξοπλισμένα με εξωτερικά φίλτρα για τον καθαρισμό του νερού, και με αερισμό (σωλήνας και πορόλιθος) για την οξυγόνωσή του, ενώ γίνονταν τακτικά αλλαγές νερού (περίπου 2 φορές την εβδομάδα) για τη διατήρηση βέλτιστων συνθηκών. Για την αποφυγή εναλλαγών στη θερμοκρασία μεταξύ ημέρας και νύχτας, χρησιμοποιήθηκε κλιματιστικό μηχάνημα που διατηρούσε σταθερή τη θερμοκρασία στο χώρο των πειραμάτων στους 25°C. Η θερμοκρασία των ενυδρείων μετριόταν

καθημερινά δύο φορές (πρωί - βράδυ), ενώ το pH και η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό κάθε 2-3 ημέρες. Η μέτρηση της θερμοκρασίας γινόταν με θερμομέτρο υδραργύρου (Labortherm N Skalenwert 0.2K), του pH με ηλεκτρονικό πεχάμετρο (Tunze, pH-controller 7070/2, Germany) και του διαλυμένου O₂ με ηλεκτρονικό οξυγονόμετρο (OxyGuard, Handy Gamma, Denmark).

Δύο ημέρες μετά την εκκόλαψη, μόλις δηλαδή οι νύμφες ξεκινούσαν να κολυμπούν οριζόντια (μετά την πλήρωση της νηκτικής τους κύστης), ταΐζονταν με πρωτόζωα *Paramecium* sp., (Blades Biological CO, UK) τα οποία παράγονταν στο εργαστήριο σε υγρές καλλιέργειες κριθαριού (barley infusion). Στη συνέχεια, όταν οι νύμφες είχαν το κατάλληλο μέγεθος για να καταναλώσουν μεγαλύτερα θηράματα (33 ημέρες μετά την εκκόλαψη, (days post hatching, dph) κατά μέσο όρο), άρχιζε η χορήγηση ναυπλίων *Artemia* sp. (Instar I), ενώ υπήρχε μία μεταβατική περίοδος τριών ημερών κατά τις οποίες παρέχονταν στις νύμφες και *Paramecium* sp. και *Artemia* sp. (Instar I) ώστε να γίνει πιο ομαλή η αλλαγή στο είδος της τροφής και να αποφευχθούν οι μεγάλες διαφορές μεγέθους (Westerfield 1995). Μετά την πλήρη αποκοπή από τα πρωτόζωα γινόταν απελευθέρωση των νυμφών μέσα στο μεγάλο ενυδρείο των 130 λίτρων. Μετά από 73 dph κατά μέσο όρο, ξεκίνησε η χορήγηση βιομηχανικής τροφής σε νιφάδες (flakes), αφού προηγήθηκε και πάλι μεταβατική περίοδος προσαρμογής τριών ημερών με ταυτόχρονη χορήγηση ναυπλίων *Artemia* και βιομηχανικής τροφής. Οι ημέρες που πραγματοποιήθηκαν τα πρώτα ταΐσματα κάθε τύπου τροφής για κάθε πληθυσμό, δίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: F.F., πρώτο τάισμα *Paramecium* sp., *Artemia* sp., flakes σε ημέρες μετά την εκκόλαψη (dph).

	F.F. <i>Paramecium</i>	F.F. <i>Artemia</i>	F.F. Flakes
22 °C	2	35	74
25 °C	2	34	73
28 °C	2	33	74
31 °C	2	30	71

Η εκτροφή που περιγράφεται παραπάνω πραγματοποιήθηκε τρεις διαφορετικές φορές τόσο λόγω της ανάγκης για πολλά δείγματα όσο και εξαιτίας του σύνθετου πειραματικού σχεδιασμού. Η πρώτη έλαβε χώρα το 2005, η δεύτερη το

2006 και η τρίτη και τελευταία το 2008. Η μεγάλη διαφορά στις χρονικές περιόδους οφείλεται αφενός στη μεγάλη διάρκεια κάθε εκτροφής (7-8 μήνες συμπεριλαμβανομένων και των προετοιμασιών) και αφετέρου στην αδυναμία των εργαστηριακών χώρων να στεγάσουν 2 εκτροφές (ή μία μεγάλης κλίμακας) ταυτόχρονα. Επιπροσθέτως, πιθανότατα λόγω δικής μας ανεπαρκούς γνώσης, πέρασαν μεγάλες περίοδοι κατά τη διάρκεια τέλεσης αυτής της διατριβής όπου η πρόκληση της ωοτοκίας ήταν αδύνατη.

Η 1^η εκτροφή παρείχε τα δείγματα για τη μελέτη των 2 πρώτων κεφαλαίων της διατριβής (Κεφ. 1: παραμορφώσεις, Κεφ. 2: σχήμα σώματος και μεριστικά στοιχεία), η 2^η εκτροφή παρείχε τα δείγματα για τη μελέτη του φύλου (Κεφ. 3) και η 3^η εκτροφή παρείχε τα δείγματα για τη μελέτη της κολύμβησης και του γαλακτικού οξέος (Κεφ. 4 και 5 αντίστοιχα).

Τα στοιχεία των συνθηκών εκτροφής (μετρήσεις θερμοκρασίας, pH και ποσοστό διαλυμένου οξυγόνου στο νερό), ήταν μέσα στα επιθυμητά όρια (μέσοι όροι και των 3 εκτροφών, Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Μέσοι όροι (\pm S.D., τυπική απόκλιση) των μετρήσεων θερμοκρασίας, pH και O_2 για τις τέσσερις συνθήκες του πειράματος (δεδομένα και από τις 3 εκτροφές).

<i>Συνθήκη</i>	<i>Θερμοκρασία (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>% O_2</i>
22 °C	21,9 \pm 0,2	6,8 \pm 0,3	79,4 \pm 5,9
25 °C	25,0 \pm 0,2	7,1 \pm 0,2	82,7 \pm 6,0
28 °C	28,1 \pm 0,1	6,7 \pm 0,3	79 \pm 6,9
31 °C	31,0 \pm 0,3	7,1 \pm 0,2	77,8 \pm 5,3

Επίσης, είναι σημαντικό να τονιστεί ότι η επιβίωση κυμάνθηκε σε ιδιαίτερος ικανοποιητικά επίπεδα (πάνω από 80%) με την εξαίρεση των 31°C στην πρώτη εκτροφή όπου για λόγο που δε μπόρεσε να διευκρινιστεί, η επιβίωση στη μία από τις δύο επαναλήψεις έπεσε περίπου στο 40% (Πίν. 4). Η επιβίωση σε όλες τις περιπτώσεις υπολογιζόταν από την εκκόλαψη μέχρι και τη στιγμή της δειγματοληψίας, με καθημερινούς διπλούς ελέγχους στα ενυδρεία εκτροφής.

Πίνακας 4. Αριθμός ατόμων μετά την εκκόλαψη (ΜΕ), κατά τη δειγματοληψία (Δειγμ.) και επί τοις εκατό (%) ποσοστό επιβίωσης για τις οκτώ επαναλήψεις του πειράματος σε κάθε μία από τις τρεις εκτροφές.

	1η εκτροφή			2η εκτροφή			3η εκτροφή		
	ΜΕ	Δειγμ.	%	ΜΕ	Δειγμ.	%	ΜΕ	Δειγμ.	%
22A	96	80	83,3	102	91	89,2	117	98	83,8
22B	97	83	85,6	105	88	83,8	106	91	85,8
25A	102	85	83,3	120	105	87,5	124	105	84,7
25B	111	89	80,2	127	112	88,2	131	122	93,1
28A	109	90	82,6	131	120	91,6	158	136	86,1
28B	110	95	86,4	123	115	93,5	125	115	92,0
31A	101	84	83,2	124	109	87,9	147	134	91,2
31B	107	47	43,9	132	121	91,7	141	126	89,4

Η ηλικία (dph) στην οποία τερματιζόταν η κάθε εκτροφή και πραγματοποιούνταν η δειγματοληψία διέφερε κάθε φορά ανάλογα με τον υπό μελέτη χαρακτήρα και συνεπώς περιγράφεται στα αντίστοιχα κεφάλαια. Επιπρόσθετα, η επιμέρους μεθοδολογία που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη κάθε ενός από τους χαρακτήρες αναλύεται διεξοδικά στα επόμενα κεφάλαια.

Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι οι πληθυσμοί που διατηρούσε το Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών προέρχονται από έναν αρχικό πληθυσμό 40 περίπου ατόμων ο οποίος εγκαταστάθηκε το 2003. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα, οι πειραματικοί πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν στα Κεφάλαια 1 και 2 να αποτελούν F3 γενεά ενώ οι πληθυσμοί των Κεφαλαίων 3, 4 και 5 να αποτελούν γενεά F4.

Τέλος, πρέπει να σημειώσουμε ότι οι εκτρεφόμενοι πληθυσμοί μεταχειρίστηκαν σύμφωνα με τις αρχές και τις οδηγίες του Ελληνικού εθνικού νόμου 2015/2001 ο οποίος ενσωματώνει τη «συνθήκη για την προστασία των σπονδυλωτών ζώων που χρησιμοποιούνται σε πειραματικούς και άλλους επιστημονικούς σκοπούς» του συμβουλίου της Ευρώπης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΗΝ ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΣΚΕΛΕΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΟΡΦΩΣΕΩΝ ΣΤΟ ZEBRAFISH.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Μορφο-ανατομικές ανωμαλίες

Ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα που παρουσιάζουν τα ψάρια σε συνθήκες εκτροφής αλλά και στο φυσικό περιβάλλον, είναι οι μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις ή ανωμαλίες, οι οποίες ορίζονται ως οι μη αναστρέψιμες αποκλίσεις από το φυσιολογικό πρότυπο. Οι ανωμαλίες αυτές –με τα μέχρι τώρα γνωστά δεδομένα- δεν έχουν ειδο-ειδική έκφραση και αναπτύσσονται κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (εμβρυικό, νυμφικό και στάδιο του ιχθυδίου), σαν αποτέλεσμα της δράσης διάφορων γενεσιουργών παραγόντων (Divanach *et al.* 1996, Koumoundouros *et al.* 2002b, Cahu *et al.* 2003, Fraser *et al.* 2004, Sfakianakis *et al.* 2006).

Οι πιο συνηθισμένες μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις στα ψάρια εντοπίζονται στο χρωματισμό του σώματος, στα λέπια, στη νηκτική κύστη και στο σκελετό (Divanach *et al.* 1996). Οι χρωματικές ανωμαλίες μπορούν να είναι μικρής ή μεγάλης έντασης που φτάνει μέχρι και αλφισμό (Dickey-Collas 1993, Dedi *et al.* 1995, Takeuchi *et al.* 1995, Venizelos & Benetti 1999, Bolker & Hill 2000, Shields 2001, Aritaki & Seikai 2004). Οι ανωμαλίες των λεπιών περιλαμβάνουν τη μερική έλλειψη τους, την ανώμαλη διάταξή τους στη πλευρική γραμμή ή/και ελλείψεις μεγάλων τμημάτων της πλευρικής γραμμής (Κουμουνδούρος, 1998; Carrillo *et al.*, 2001). Οι παραμορφώσεις της νηκτικής κύστης μπορούν να χωριστούν σε δυο κατηγορίες: την απουσία λειτουργικής νηκτικής κύστης, η οποία σχετίζεται με σκελετικές παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης (Kitajima *et al.* 1991, Chatain 1989,1994, Divanach *et al.* 1996, Shields 2001, Trotter *et al.* 2003), και την υπερτροφία της νηκτικής κύστης (swimbladder stress syndrome) (Bagarinao & Kungvankij 1986).

Οι σκελετικές παραμορφώσεις αποτελούν με διαφορά τον πιο συχνό τύπο παραμορφώσεων και εξαιτίας αυτού θεωρούνται και ως οι πιο σοβαρές. Εντοπίζονται σε όλες τις περιοχές του σώματος που φέρουν σκελετικές δομές και η «σοβαρότητά» τους

καλύπτει όλο το πιθανό φάσμα. Έτσι, ποικίλουν από εκείνες που μόνο το έμπειρο μάτι μπορεί να διακρίνει μετά από σχετική επεξεργασία (ακτινογραφία, χρώση) μέχρι εκείνες που οδηγούν σε θάνατο. Η εμφάνισή τους επίσης ποικίλει καθώς περιλαμβάνουν απουσία, παραμορφώσεις σχήματος, διπλασιασμό ή πολλαπλασιασμό και συντήξεις μεταξύ των διαφόρων σκελετικών δομών.

Με βάση τις μελέτες που έχουν γίνει μέχρι στιγμής οι σκελετικές παραμορφώσεις μπορούν να χωριστούν σε αυτές της κεφαλικής περιοχής (Matsuoka 1987, Koumoundouros *et al.* 1997a, Galeotti *et al.* 2000, Cobcroft *et al.* 2001, Fraser & de Nys 2005), της σπονδυλικής στήλης (Matsuoka 1987, Boglione *et al.* 1993, 1995, Andrandes *et al.* 1996, Divanach *et al.* 1997, Koumoundouros 1998, Afonso *et al.* 2000, Ferreri *et al.* 2000, Kihara *et al.* 2002, Koumoundouros *et al.* 2001c, Favaloro and Mazzola 2003, Sfakianakis *et al.* 2006) και των πτερυγίων (Koumoundouros *et al.* 1997b, 2001b, Sfakianakis *et al.* 2003, 2004).

Οι ανωμαλίες της κεφαλικής περιοχής ή του κρανίου επικεντρώνονται κυρίως στο βραγχιακό επικάλυμμα και στις σιαγόνες (Matsuoka 1987, Koumoundouros *et al.* 1997a, Koumoundouros 1998, Galeotti *et al.* 2000, Cobcroft *et al.* 2001, Fraser and de Nys 2005, Georgakopoulou *et al.* 2007b). Οι παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης διακρίνονται σε αξονικές και σπονδυλικές. Οι πρώτες μπορούν να διαχωριστούν σε σκολίωση (πλευρική κάμψη), λόρδωση (κάμψη σε σχήμα V στο κατακόρυφο επίπεδο) και κύφωση (κάμψη σε σχήμα Λ στο κατακόρυφο επίπεδο) (Andrandes *et al.* 1996, Koumoundouros 1998, Afonso *et al.* 2000, Kihara *et al.* 2002, Koumoundouros *et al.* 2001c, Favaloro & Mazzola 2003, Sfakianakis *et al.* 2006). Από την άλλη, οι σπονδυλικές παραμορφώσεις διακρίνονται σε μετατοπίσεις, συντήξεις, συμπτώξεις, δυσπλασίες, διπλασιασμούς ή ελλείψεις των σωμάτων των σπονδύλων, των τόξων (νευρικών και αιματικών), των ακάνθων (νευρικών και αιματικών) και των πλευρών (Matsuoka 1987, Boglione *et al.* 1993, 1995, Divanach *et al.* 1997, Ferreri *et al.* 2000, Favaloro & Mazzola, 2003). Τέλος, οι παραμορφώσεις των πτερυγίων περιλαμβάνουν τον ελλιπή σχηματισμό του ραχιαίου («σύνδρομο του σαμαριού» ή saddleback syndrome) (Matsuoka 1987, Koumoundouros *et al.* 2001b, Sfakianakis *et al.* 2003, Koumoundouros 2008) και του εδρικού πτερυγίου (Matsuoka 1987, Favaloro & Mazzola 2003), την πλευρική κάμψη, τον διπλασιασμό και

τη στένωση του ουραίου πτερυγίου, παραμορφώσεις στα στηρικτικά οστά των πτερυγίων (Matsuoka 1987, Koumoundouros *et al.* 1997b, 2001b, Koumoundouros 1998, Favalaro & Mazzola 2003, Sfakianakis *et al.* 2004) και τις κάμψεις των ακτινών (Daoulas *et al.* 1991).

Πέρα από την επίδραση που έχουν στο ρυθμό ανάπτυξης και στην εικόνα του ατόμου (θέματα που άλλωστε επηρεάζουν μόνο την ιχθυοκαλλιέργεια και δη την εμπορική), οι παραμορφώσεις οδηγούν πολλές φορές και σε θνησιμότητα τα φέροντα άτομα (Divanach *et al.* 1996), γεγονός που ασφαλώς επηρεάζει και τους φυσικούς πληθυσμούς.

Πολλές είναι οι μελέτες που επικεντρώνονται στον προσδιορισμό των παραγόντων που προκαλούν τις μορφο-ανατομικές ανωμαλίες χωρίς όμως να δίνουν οριστική και αδιαμφισβήτητη λύση (Divanach *et al.* 1996, Cobcroft *et al.* 2001). Αυτό συμβαίνει διότι στην πλειονότητα των περιπτώσεων, οι γενεσιουργοί παράγοντες είναι πολλοί, έχουν κοινή συμπτωματολογία, εμφανίζουν συνεργατική δράση και δραστηριοποιούνται σε ένα μεγάλο εύρος των αναπτυξιακών φάσεων (ανασκόπηση από Divanach *et al.* 1996). Παρόλα αυτά, είναι αρκετές οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με τα αίτια του προβλήματος και έχουν επιχειρήσει να δώσουν απαντήσεις. Ανάμεσα στους παράγοντες που έχουν ενοχοποιηθεί για την εμφάνιση μορφο-ανατομικών παραμορφώσεων είναι πέραν των γενετικών (Purdom 1993, Divanach *et al.* 1996, Andrades *et al.* 1996, Bengtsson *et al.* 1998) οι: α) διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες και γενικότερα συνθήκες εκτροφής (Chun *et al.* 1981, Francescon *et al.* 1988, Boglione *et al.* 1993, 1994, Lindesjoo *et al.* 1994, Divanach *et al.* 1997, Haaparanta *et al.* 1997, Faustino & Power 1997, Koumoundouros *et al.* 1997a,b, 2001b, Teh *et al.* 2002, Sfakianakis *et al.* 2004,2006, Georgakopoulou *et al.* 2007b), β) ακραίες αβιοτικές συνθήκες (Polo *et al.* 1991, Pavlov 1997, Pavlov & Moksness 1997, Faustino & Power 1999), και γ) ακατάλληλες διατροφικές συνθήκες χαρακτηριζόμενες κυρίως από ανεπάρκεια ή περίσσεια βιταμινών και απαραίτητων αμινοξέων (Nacario 1983, Akiyama *et al.* 1986a,b, Hinton *et al.* 1992, Kanazawa *et al.* 1992, McConnell & Barrows 1993, Estevez & Kanazawa 1995, Takeuchi *et al.* 1995, Dedi *et al.* 1998). Ο κάθε ένας από τους παραπάνω παράγοντες ανάλογα με την ένταση των υπολοίπων και το είδος στο

οποίο επιδρά, διαμορφώνει διαφορετικά τόσο την ανατομική εικόνα των παραγόμενων παραμορφώσεων όσο και τη συχνότητά τους.

Ο ρόλος της θερμοκρασίας στις μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις

Η θερμοκρασία μπορεί να προκαλέσει μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις, κύρια κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των νυμφών (Polo *et al.* 1991, Sfakianakis *et al.* 2006). Ως εκ τούτου, πολλές είναι οι μελέτες που αναφέρουν αύξηση της θνησιμότητας ή/και του ρυθμού παραμόρφωσης των ψαριών, όταν η θερμοκρασία διαβίωσης των νυμφών κυμαίνεται εκτός των άριστων ορίων διαβίωσης του κάθε είδους (Wiegand *et al.* 1989, Lein *et al.* 1997, Wang & Tsai 2000, Abdel *et al.* 2004, Sfakianakis *et al.* 2004, 2006, Georgakopoulou *et al.* 2007b). Για παράδειγμα, οι Wiegand *et al.* (1989) παρατήρησαν πως η έκθεση των νυμφών του χρυσόψαρου, *Carassius aurata* (L., 1758), σε θερμοκρασία 13°C προκαλεί αύξηση της συχνότητας εμφάνισης των παραμορφώσεων, ενώ και τα αυγά επηρεάζονται καθώς παρατηρήθηκε μείωση του ποσοστού εκκόλαψης σε σύγκριση με τη θερμοκρασία των 22°C.

Πρέπει να σημειωθεί πως η μελέτη των μορφο-ανατομικών παραμορφώσεων αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο καθώς μερικές δυσπλασίες μπορούν να αυξηθούν ή να εξαφανιστούν κατά την ανάπτυξη των ψαριών (Favaloro & Mazzola 2003). Ως εκ τούτου, ο χαρακτηρισμός αυτών των ανωμαλιών κατά το στάδιο του ιχθυδίου μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για την πρόβλεψη της εξέλιξης τους στα στάδια ενηλικίωσης ή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση και την αλλαγή των αβιοτικών ή βιοτικών παραγόντων που συχνά τις προκαλούν (Ferreri *et al.* 2000, Favaloro & Mazzola 2003).

Όσον αφορά στο zebrafish, σε εργασία των Ferreri *et al.* (2000) που περιελάμβανε σύγκριση άγριων ατόμων από την Ινδία και εκτρεφόμενων του εργαστηρίου, διαπιστώθηκε ότι και οι δύο ομάδες ψαριών εμφάνισαν σκελετικές παραμορφώσεις σε ποσοστά γύρω στο 90%.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης τεσσάρων διαφορετικών θερμοκρασιών ανάπτυξης στις μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις που εμφανίζονται στο σκελετό και στα πτερύγια (ραχιαίο, εδρικό και ουραίο) του zebrafish.

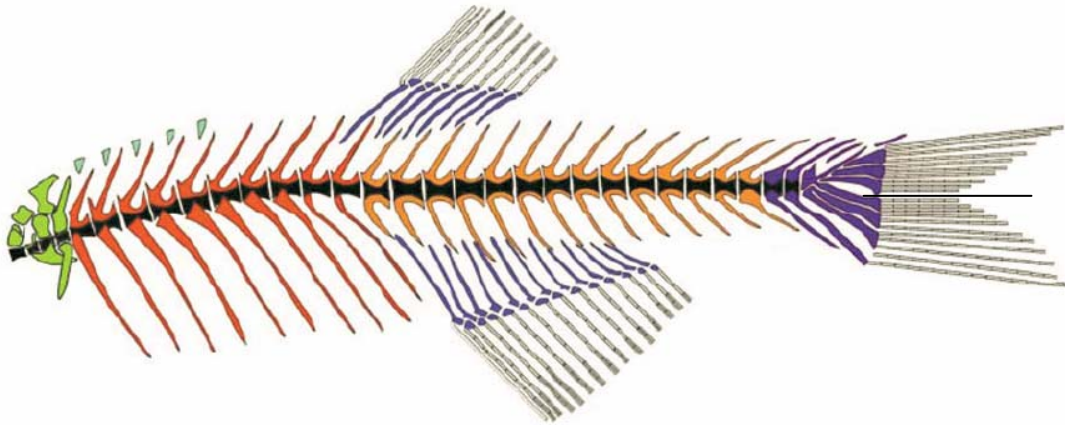
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα δείγματα, μετά το πέρας της εκτροφής τους (όταν το μέσο ολικό μήκος, Total Length (TL) τυχαίου δείγματος υπερέβαινε τα 12 mm), συλλέχθηκαν, αναισθητοποιήθηκαν (ethylenglycol-monophenylether, Merck, 0.2-0.5 ml l⁻¹) και φωτογραφήθηκαν ατομικά με ψηφιακή μηχανή από την αριστερή τους πλευρά (Olympus C-5050). Ακολούθησε μαζική συντήρηση σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλίνης 5% (pH=7,2; Taylor & Van Dyke 1985) και μετά την πάροδο ελάχιστου χρονικού διαστήματος μιας βδομάδας, υποβλήθηκαν σε διπλή χρώση Αλιζαρίνης – Κυανού της Αλσατίας (Park & Kim 1984) ώστε να γίνει δυνατή η μελέτη του σκελετού τους. Η Αλιζαρίνη βάφει με ερυθρό χρώμα όλα τα μεμβρανικά οστά καθώς και τα οστά αντικατάστασης που βρίσκονται σε διαδικασία οστεοποίησης. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα του ασβεστίου σε κάποιες από αυτές τις δομές, τόσο πιο έντονη είναι η συγκεκριμένη χρώση. Αντίστοιχα, το Κυανό της Αλσατίας βάφει με χρώμα κυανό τα οστά αντικατάστασης, στα οποία δεν έχει αρχίσει η διαδικασία οστεοποίησης.

Μετά τη χρώση των δειγμάτων μελετήθηκαν 50 περίπου άτομα από κάθε συνθήκη (επανάληψη) σε στερεοσκόπιο (Olympus SZX9), όπου υπήρχε διερχόμενος και/ή προσπίπτον φωτισμός. Παρατηρήθηκαν και καταγράφηκαν όλες οι ανωμαλίες της σπονδυλικής στήλης, του ραχιαίου, του εδρικού και του ουραίου πτερυγίου. Σε κάθε παραμόρφωση γινόταν καταγραφή των σκελετικών στοιχείων που παρουσίαζαν κάποια δυσμορφία καθώς και ο τύπος της δυσμορφίας (παραμόρφωση σχήματος, απουσία ή διπλασιασμός). Πρέπει να σημειωθεί ότι στην κατηγορία του ουραίου πτερυγίου συμπεριελήφθησαν μόνο τα οστά του πτερυγίου μαζί με το ουρόστυλο (χωρίς τους δύο τελευταίους σπονδύλους). Η απαρίθμηση των οστών έγινε από το κεφάλι προς την ουρά. Οι ψηφιακές φωτογραφίες επεξεργάστηκαν στον ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη χρήση του κατάλληλου προγράμματος (Corel Photo Paint 11).

Χρησιμοποιήθηκαν 400 άτομα στο σύνολο των οποίων μετρήθηκε το TL στις ψηφιακές φωτογραφίες με ελεύθερο λογισμικό ανάλυσης εικόνας (tpsDig, Rohlf, version 5.0.3.32).

Τέλος, η φυσιολογική εικόνα του σκελετού του zebrafish πάνω στην οποία βασίστηκε η παρούσα μελέτη των παραμορφώσεων, ήταν εκείνη που περιγράφηκε από τους Bird & Mabee (2003) (Εικ. 1.1).



Εικόνα 1.1: Γενική απεικόνιση του σκελετού του zebrafish, όπου τα κέντρα είναι χρωματισμένα με μαύρο, τα οστά του Weber με πράσινο, τα προραχιαία οστά με ανοιχτό πράσινο, οι προ-αιματικοί σπόνδυλοι με κόκκινο, οι αιματικοί σπόνδυλοι με πορτοκαλί, οι ουραίοι σπόνδυλοι με μοβ και τα πτερυγιοφόρα του ραχιαίου και του εδρικού πτερυγίου με μπλε (σύμφωνα με Bird and Mabee, 2003).

Για τη διαπίστωση τυχόν διαφορών μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιακών ομάδων (αλλά και επαναλήψεων) με βάση τις παραμορφώσεις, πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση διασποράς (MANOVA). Προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει ομαδοποίηση μεταξύ των συνθηκών, πραγματοποιήθηκε Ανάλυση Κυρίων Συνιστωσών (P.C.A.), ενώ η απόσταση των συνθηκών εξετάστηκε με την Ανάλυση Κανονικών Μεταβλητών (C.V.A.). Τέλος, δημιουργήθηκε και φαινόγραμμα με την Ανάλυση Ομάδων (Cluster Analysis) με βάση την παρουσία των παραμορφώσεων σε κάθε άτομο. Όλες οι πολυμεταβλητές αναλύσεις έγιναν με το στατιστικό πρόγραμμα Statistica v. 6 (Data Analysis Software System, Statsoft, Inc., 2001).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα Ολικά Μήκη (TL) των ατόμων που εξετάστηκαν δίνονται στον Πίνακα 1.1.

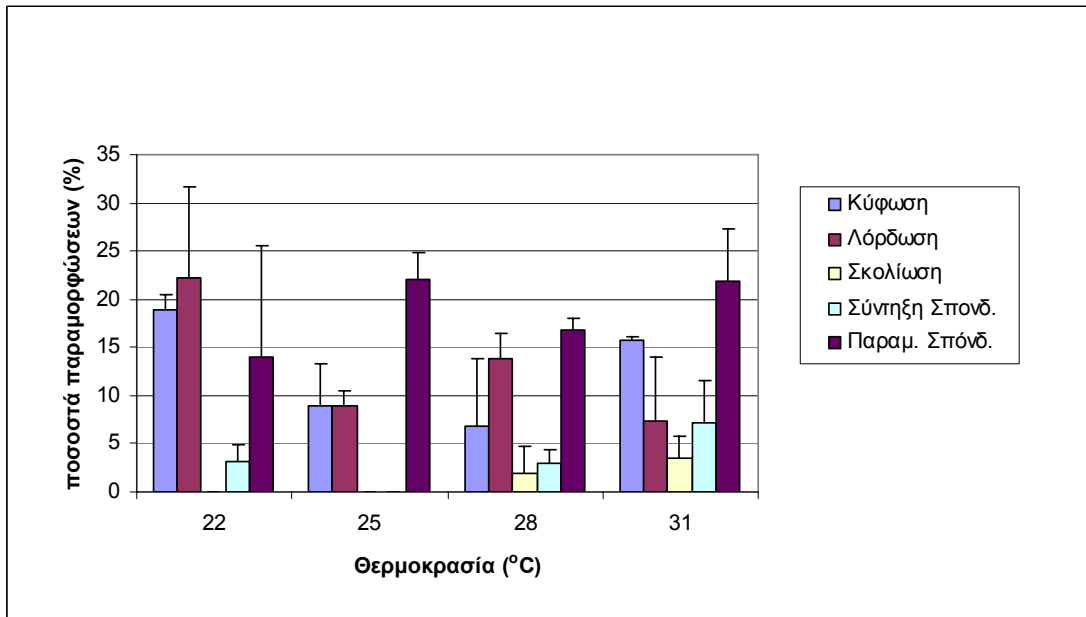
Πίνακας 1.1: Ολικό μήκος (mm) \pm S.D. όλων των δειγμάτων (n=400) που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη των παραμορφώσεων.

$T^{\circ}C$	TL	SD
22	13,24	2,64
25	14,19	2,56
28	14,23	3,20
31	13,87	2,42

Οι σκελετικές δυσπλασίες που εμφάνισε το zebrafish χωρίστηκαν σε τρεις κατηγορίες: παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης, των πτερυγίων (ραχιαίο και εδρικό) και του ουραίου πτερυγίου. Σε καμία θερμοκρασία δεν βρέθηκαν φυσιολογικά άτομα (ποσοστά 0%) εκτός από τους 25°C, όπου παρατηρήθηκαν 1% φυσιολογικά άτομα. Για τις ανάγκες των γραφημάτων που ακολουθούν έχει γίνει ενοποίηση των 2 επαναλήψεων.

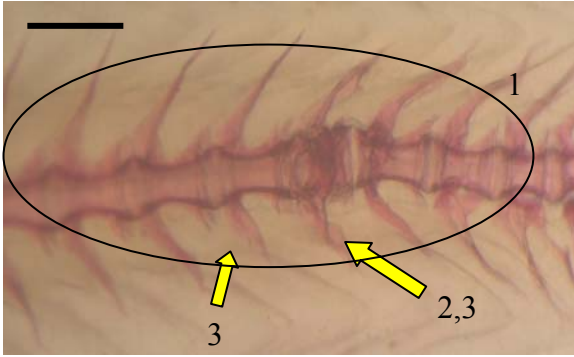
Παραμορφώσεις σπονδυλικής στήλης

Οι παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης που εντοπίστηκαν (Εικ. 1.2), ήταν η κύφωση (Εικ. 1.3-1.4), η λόρδωση (Εικ. 1.5), η σκολίωση, η σύντηξη σπονδύλων (Εικ. 1.6), ενώ στην κατηγορία «άλλου είδους παραμορφώσεις» εντάχθηκαν οι αποκλίσεις στο σχήμα, στο μέγεθος και στη θέση στο χώρο των κέντρων των σπονδύλων και η απουσία ή ο διπλασιασμός των νευρικών και αιματικών αποφύσεων των σπονδύλων (Εικ. 1.7-1.8 και 1.17).

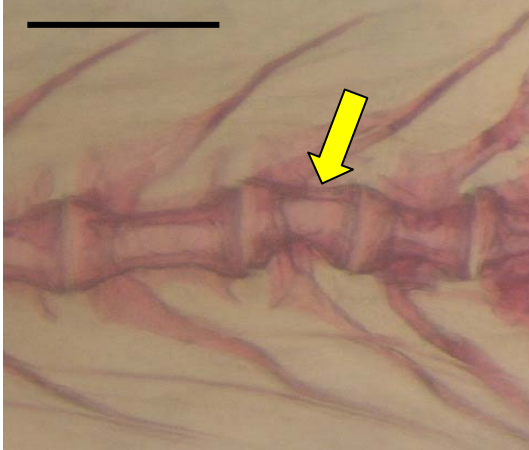


Εικόνα 1.2: Συχνότητα (%) εμφάνισης παραμορφώσεων της σπονδυλικής στήλης στους πληθυσμούς των τεσσάρων θερμοκρασιών (22, 25, 28 και 31°C). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν 1 S.D. (n=2).

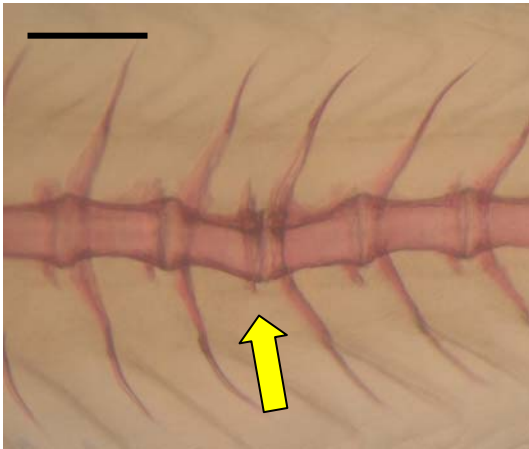
Από τα αποτελέσματα (Εικ. 1.2) που ελήφθησαν προκύπτει ότι δεν υπάρχει θερμοκρασία στην οποία να μην υπήρχε έστω και κάποια παραμόρφωση της σπονδυλικής στήλης. Η κύφωση και η λόρδωση εμφανίστηκαν στα άτομα όλων των θερμοκρασιών σε μεγάλα ποσοστά. Σκολίωση παρατηρήθηκε μόνο στις δυο μεγαλύτερες θερμοκρασίες (28 και 31°C) σε πολύ μικρά ποσοστά (μεταξύ 1 και 4%). Η σύντηξη εμφανίζεται και αυτή σε μικρά ποσοστά (κάτω από 7%) στους 22, 28 και 31°C, ενώ δεν παρατηρήθηκε στα ψάρια των 25°C. Τέλος, παρατηρήθηκαν παραμορφώσεις στους σπονδύλους σε όλες τις θερμοκρασίες σε σχετικά υψηλά ποσοστά (πάνω από 14%). Πρέπει να σημειωθεί εδώ, ότι σε όλα ανεξαιρέτως τα άτομα που εξετάστηκαν υπήρχαν παραμορφωμένες νευρικές και αιματικές αποφύσεις οι οποίες όμως, λόγω της πολύ μικρής τους έντασης, δεν κατηγοριοποιήθηκαν σαν παραμορφώσεις. Τα ποσοστά των φυσιολογικών ατόμων για κάθε θερμοκρασία όσον αφορά τη σπονδυλική στήλη κυμάνθηκαν από 43% (στους 22°C) έως 64% (στους 25°C) (Εικ. 1.9).



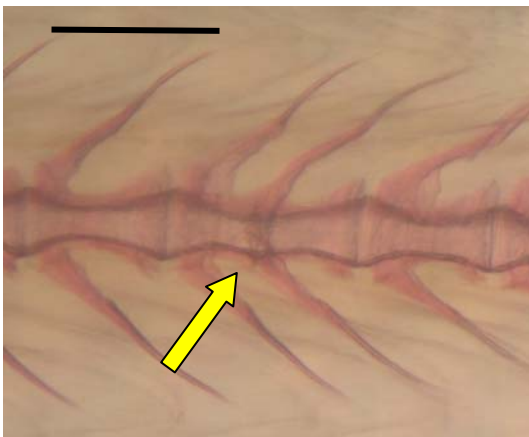
Εικόνα 1.3: 1, έντονη κύφωση; 2, παραμορφωμένος σπόνδυλος; και 3, δυσμορφίες στις αιματικές αποφύσεις σε άτομο 12,2 mm TL. Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.



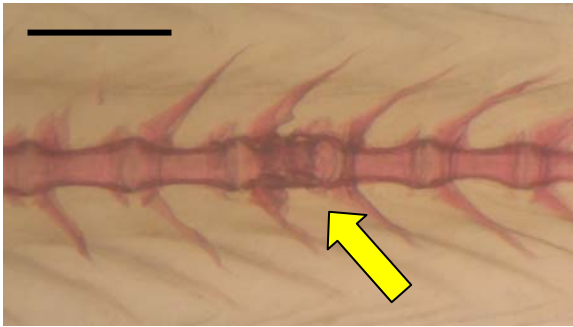
Εικόνα 1.4: Κύφωση σε άτομο 14,0 mm TL. Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.



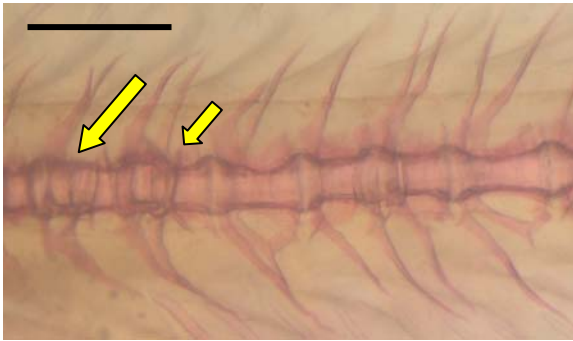
Εικόνα 1.5: Λόρδωση σε άτομο 11,3 mm TL. Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.



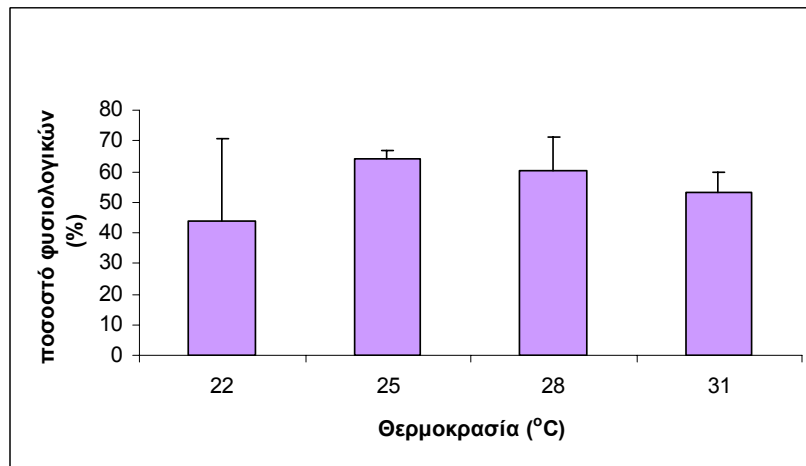
Εικόνα 1.6: Σύντηξη σπονδύλων σε άτομο 15,9 mm TL. Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.



Εικόνα 1.7: Παραμορφωμένος σπόνδυλος σε άτομο 11,8 mm TL. Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.



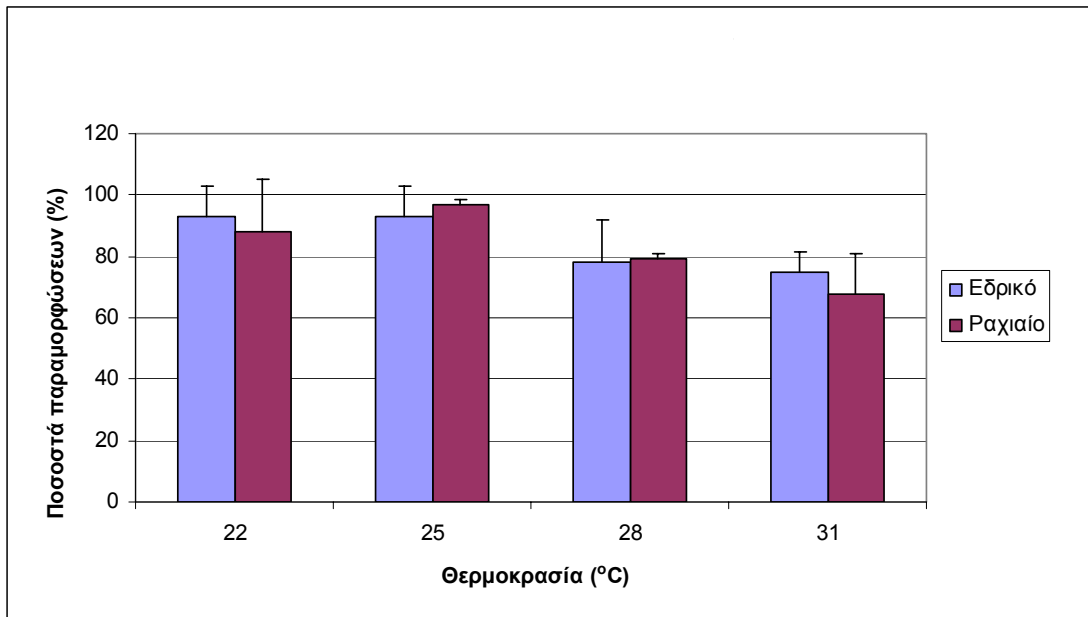
Εικόνα 1.8: Παραμορφωμένοι και συντηγμένοι σπόνδυλοι και δυσμορφίες σε όλες τις αποφύσεις (νευρικές και αιματικές) σε άτομο 13,9 mm TL. Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.



Εικόνα 1.9: Συχνότητα (%) ατόμων με φυσιολογική σπονδυλική στήλη στις τέσσερις θερμοκρασίες (22, 25, 28 και 31°C). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν 1 S.D. (n=2).

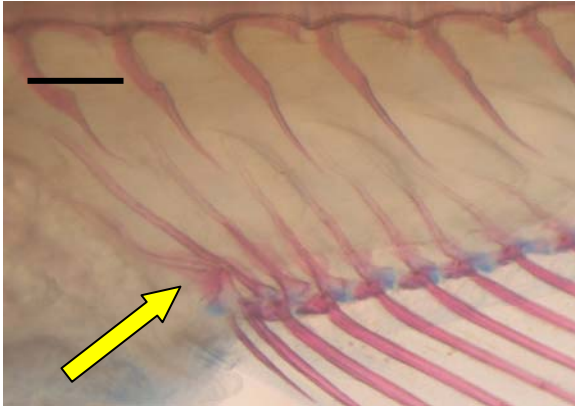
Παραμορφώσεις πτερυγίων

Οι παραμορφώσεις του ραχιαίου και του εδρικού πτερυγίου οφείλονταν σε δυσπλασίες των πτερυγιοφόρων (παραμορφώσεις σχήματος, Εικ. 1.10-1.14).

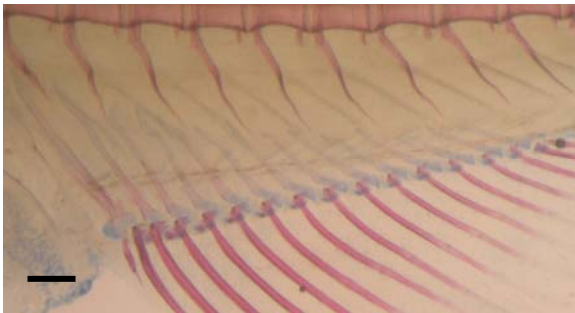


Εικόνα 1.10: Συχνότητα (%) παραμορφώσεων του εδρικού και του ραχιαίου πτερυγίου στις τέσσερις θερμοκρασίες (22, 25, 28 και 31°C). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν 1 S.D. (n=2).

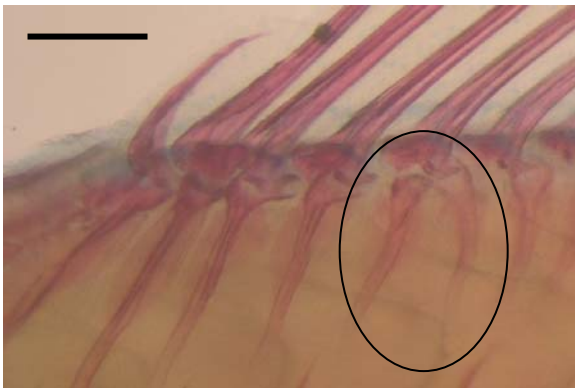
Στην Εικόνα 1.10 φαίνεται πως σε όλες τις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν εμφανίστηκαν μεγάλα ποσοστά παραμορφώσεων (πάνω από 60%). Τα ποσοστά των φυσιολογικών ατόμων από την άλλη, όσον αφορά το εδρικό και το ραχιαίο πτερύγιο μαζί, ήταν 4% στους 22°C, 3% στους 25, 12% στους 28°C και 0% στους 31°C.



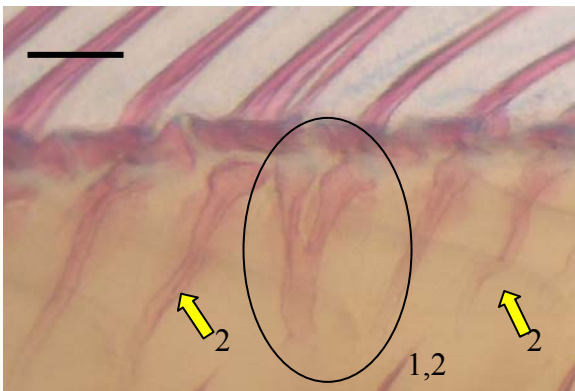
Εικόνα 1.11: Παραμορφωμένο πτερυγιοφόρο (το πρώτο) στο εδρικό πτερύγιο σε άτομο 15,9 mm TL. Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.



Εικόνα 1.12: Παραμορφωμένα πτερυγιοφόρα εδρικού πτερυγίου σε άτομο 11,1 mm TL. Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.



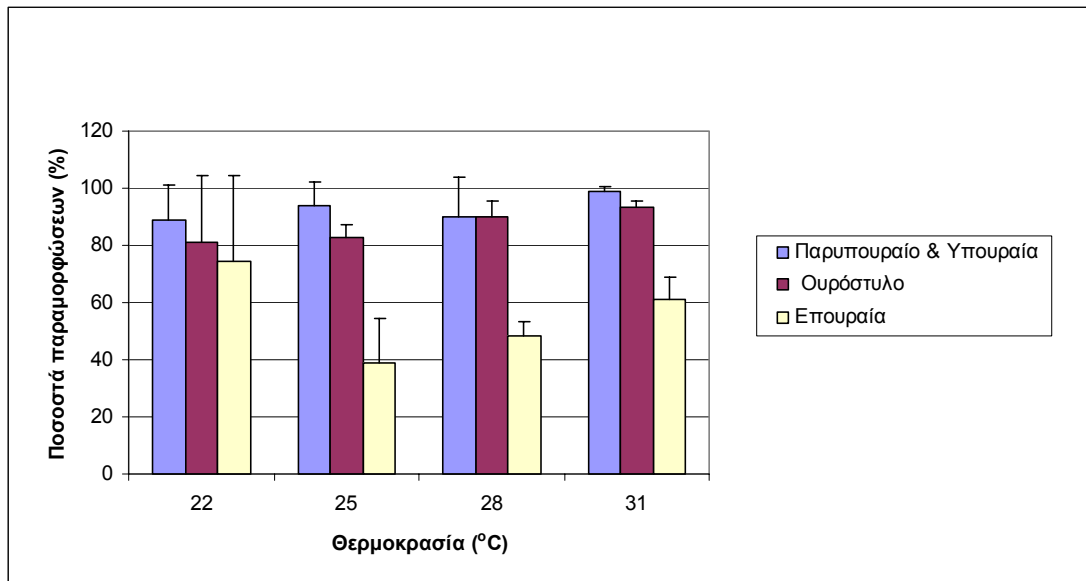
Εικόνα 1.13: Παραμορφωμένα πτερυγιοφόρα ραχιαίου πτερυγίου σε άτομο 16,5 mm TL. Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.



Εικόνα 1.14: Σύντηξη (1) και παραμορφώσεις σχήματος σε πτερυγιοφόρα του ραχιαίου πτερυγίου (2) σε άτομο 16,2 mm TL. Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.

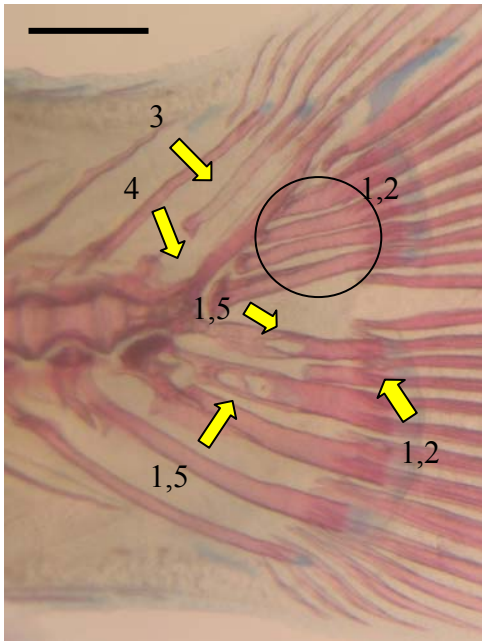
Παραμορφώσεις ουραίου περυγίου

Οι παραμορφώσεις του ουραίου περυγίου ομαδοποιήθηκαν σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με την περιοχή στην οποία εμφανίστηκαν: Σε εκείνες στο παρυπουραίο + υποουραία, στο ουρόστυλο και στα επουραία (Εικ. 1.15-1.18).

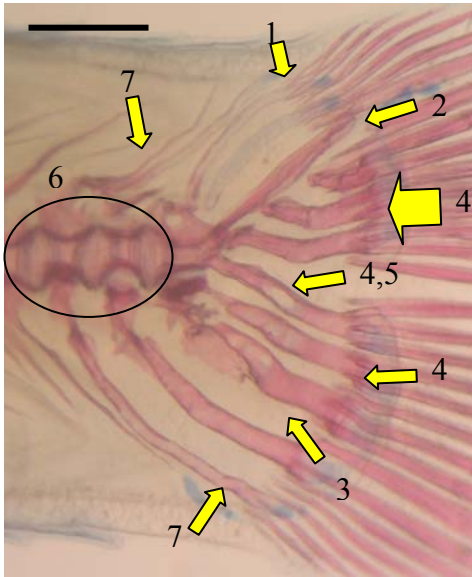


Εικόνα 1.15: Συχνότητα (%) παραμορφώσεων του ουραίου περυγίου στις τέσσερις θερμοκρασίες (22, 25, 28 και 31°C). Οι γραμμές σφάλματος αντιπροσωπεύουν 1 S.D. (n=2).

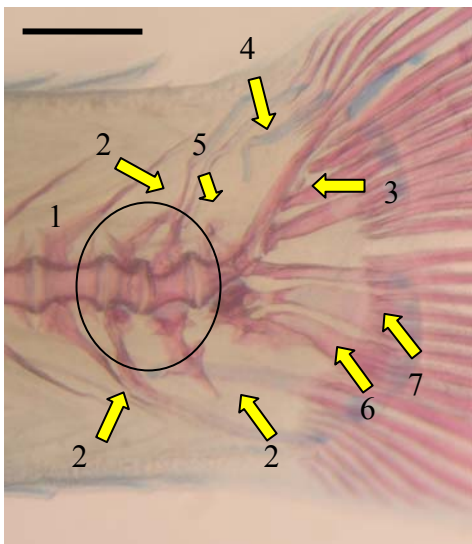
Στην Εικόνα 1.15 φαίνεται ότι, σε όλες τις θερμοκρασίες, ήταν έντονες οι δυσπλασίες του ουρόστυλου και του παρυπουραίου και των υποουραίων με ποσοστά υψηλότερα του 80%. Οι παραμορφώσεις των επουραίων, κυμάνθηκαν επίσης σε υψηλά ποσοστά σε όλες τις συνθήκες (πάνω από 40%). Τέλος, τα ποσοστά των φυσιολογικών ατόμων στις τέσσερις θερμοκρασίες όσον αφορά μόνο το ουραίο περύγιο ήταν 2% στους 22°C, 1% στους 25 και 28°C και 0% στους 31°C.



Εικόνα 1.16: Παραμορφωμένο ουραίο πτερύγιο σε άτομο 13,6 mm TL. Διακρίνονται εφτά υποουραία (1), παραμορφωμένα υποουραία (2), επουραίο (3) και ουρόστυλο (4), και κενά στα υποουραία 1 και 3 (5). Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.



Εικόνα 1.17: Παραμορφωμένο ουραίο πτερύγιο σε άτομο 14,8 mm TL, όπου διακρίνονται δυο επουραία (1), παραμορφώσεις σχήματος του ουρόστυλου (2), του παρυποουραίου (3) και των υποουραίων (4), κενό στο υποουραίο 2 (5), παραμορφωμένοι οι δυο τελευταίοι σπόνδυλοι (6) και παραμορφωμένες αποφύσεις (αιματικές και νευρικές) (7). Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.



Εικόνα 1.18: Παραμορφωμένο ουραίο πτερύγιο σε άτομο 13,0 mm TL. Διακρίνονται λόρδωση στους δυο τελευταίους σπονδύλους (1), παραμορφωμένες αιματικές και νευρικές αποφύσεις των δυο τελευταίων σπονδύλων (2), επιπρόσθετο οστό μεταξύ του υποουραίου 4 και 5 (3), και παραμορφώσεις σχήματος στα επουραία (4), ουρόστυλο (5), παρυποουραίο (6) και υποουραίο 1 (7). Η γραμμή αναφοράς ισούται με 0,5 mm.

Πολυπαραγοντική ανάλυση παραμορφώσεων

Η πολυπαραγοντική ανάλυση διασποράς έδειξε ότι οι τέσσερις θερμοκρασιακές συνθήκες του πειράματος επιδρούν σημαντικά στην ανάπτυξη των παραμορφώσεων (Wilks' Lambda: 0,71229 approx. $F(27,1092)=4,9863$ $p<0,0000$; MANOVA).

Όπως φαίνεται και από τον Πίνακα 1.2, οι παραμορφωμένες περιοχές που συμμετέχουν στο διαχωρισμό των πληθυσμών διαφορετικής θερμοκρασιακής ιστορίας είναι με σειρά σημαντικότητας το ραχιαίο πτερύγιο, τα επουραία, το εδρικό πτερύγιο, τα παρυπουραία με τα υπουραία, το ουρόστηλο, η λόρδωση και οι άλλες παραμορφώσεις των σπονδύλων ($P<0,05$). Η σκολίωση της σπονδυλικής στήλης δε συμμετείχε καθόλου στη διαδικασία εξαιτίας της πολύ μικρής της εμφάνισης. Οι αποστάσεις Mahalanobis μας αποκαλύπτουν ότι κάθε συνθήκη (θερμοκρασίας) διαχωρίζεται στατιστικά από τις υπόλοιπες (Πίν. 1.3).

Πίνακας 1.2: Αποτελέσματα της ανάλυσης διαχωρισμού με βάση τις διαφορετικές παραμορφώσεις που συμμετέχουν (για τις 4 θερμοκρασίες).

	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (3,374)	p-level	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)
Ραχιαίο	0,775360	0,918657	11,03864	0,000001	0,944241	0,055759
Επουραία	0,769439	0,925727	10,00227	0,000002	0,931423	0,068577
Εδρικό	0,740114	0,962406	4,86975	0,002465	0,932770	0,067231
Παρ.& Υπουρ.	0,730541	0,975017	3,19430	0,023601	0,922170	0,077830
Ουρόστυλο	0,727894	0,978563	2,73103	0,043685	0,936784	0,063216
Λόρδωση	0,744589	0,956623	5,65290	0,000851	0,823885	0,176115
Παρ. Σπόνδ.	0,732340	0,972623	3,50911	0,015485	0,793135	0,206865
Κύφωση	0,727094	0,979640	2,59100	0,052552	0,774933	0,225068
Σύντηξη	0,719197	0,990398	1,20870	0,306345	0,965418	0,034583

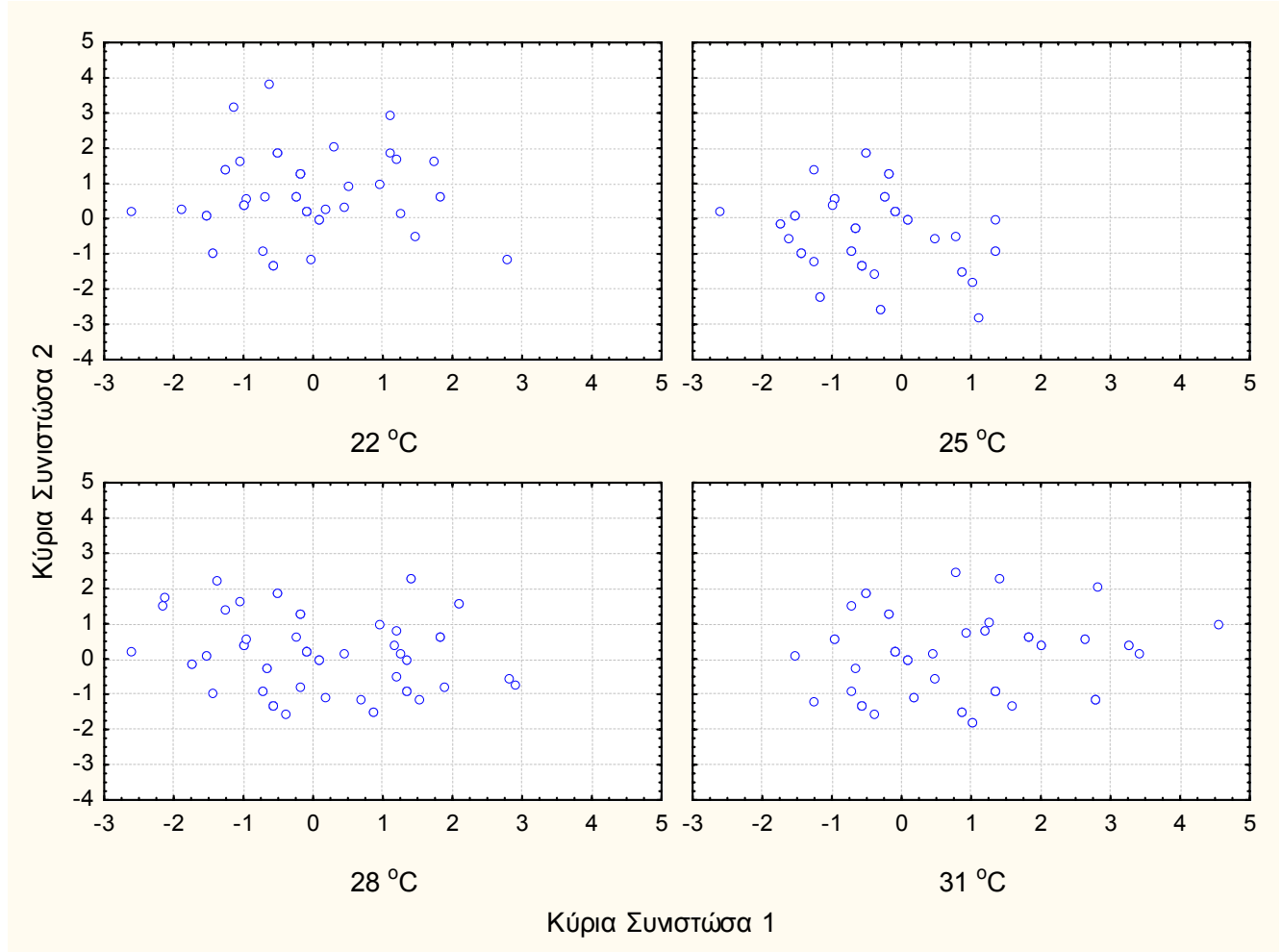
Πίνακας 1.3: Τετραγωνισμένες γενικευμένες αποστάσεις Mahalanobis μεταξύ των τεσσάρων θερμοκρασιακών ομάδων και έλεγχος της διαφοροποίησής τους.

	22°C	25°C	28°C	31°C
22°C		1,121392	0,624581	1,457631
25°C	$P<0,05$		0,488753	1,624882
28°C	$P<0,05$	$P<0,05$		0,612260
31°C	$P<0,05$	$P<0,05$	$P<0,05$	

Η Ανάλυση Κανονικών Μεταβλητών (C.V.A.) παρέχει τους 9 κανονικοποιημένους συντελεστές (standardized coefficients) στις 3 Κύριες Συνιστώσες (ή άξονες) (Πιν. 1.4). Από τις 2 πρώτες συνιστώσες της C.V.A. που καλύπτουν το 94,8 % της παρατηρούμενης μεταβλητότητας, προκύπτει και το γράφημα 1.19.

Πίνακας 1.4: Κανονικοποιημένοι συντελεστές των 9 τύπων παραμορφώσεων που συμμετείχαν στην ανάλυση μεταξύ των τεσσάρων θερμοκρασιών. Αθρ. %, Αθροιστική διασπορά που ερμηνεύεται από κάθε Κ. Συν.; Κ. Συν., Κύρια συνιστώσα της ανάλυσης μεταβλητών; % Αθρ. Μεταβλ., επί τοις εκατό αθροιστική μεταβλητότητα.

	Κ. Συν. 1	Κ. Συν. 2	Κ. Συν. 3
Ραχιαίο	-0,692533	-0,142793	-0,307814
Επουραία	0,230190	0,733242	-0,435610
Εδρικό	-0,463894	0,074707	0,394974
Παρ.& Υπουρ.	0,290793	-0,289677	-0,343031
Ουρόστυλο	0,310042	-0,123318	0,497961
Λόρδωση	-0,154428	0,605633	0,385063
Παρ. Σπόνδ.	0,100794	-0,501696	-0,268028
Κύφωση	-0,039258	0,450944	-0,179592
Σύντηξη	0,223157	0,101685	0,091721
Ιδιοτιμή	0,205777	0,142833	0,018810
% Αθρ. Μεταβλ.	0,560060	0,948805	1,000000



Εικόνα 1.19: Γραφική απεικόνιση των 2 πρώτων κύριων συνιστωσών για τις τέσσερις ομάδες θερμοκρασίας.

Οι οκτώ επαναλήψεις του πειράματος διαχωρίζονται επίσης καλά μεταξύ τους με βάση τις παραμορφώσεις που φέρει κάθε ξεχωριστό άτομο (Wilks' Lambda: 0,53829 approx. $F(63,2089)=3,8563$ $p<0,001$; MANOVA) (Πίν. 1.5).

Οι παραμορφωμένες περιοχές που συμμετέχουν στο διαχωρισμό είναι με σειρά σημαντικότητας τα επουραία, το ραχιαίο πτερύγιο, τα παρυπουραία με τα υποουραία, το ουρόστηλο, το εδρικό πτερύγιο, η λόρδωση και η κύφωση ($P<0,05$). Η σύντηξη των σπονδύλων δε συμμετείχε καθόλου στη διαδικασία του διαχωρισμού εξαιτίας της πολύ μικρής της εμφάνισης (Πίν. 1.5).

Πίνακας 1.5: Αποτελέσματα της ανάλυσης διαχωρισμού με βάση τις διαφορετικές παραμορφώσεις που συμμετέχουν (για τις 8 επαναλήψεις).

	Wilks Lambda	Partial Lambda	F-remove (7,370)	p-level	Toler.	1-Toler. (R-square)
Επουραία	0,6104	0,8818	7,0848	0,0000	0,9515	0,0484
Ραχιαίο πτερ.	0,6002	0,8968	6,0813	0,0000	0,9602	0,0397
Παρυπ.& υπουρ.	0,5800	0,9280	4,0981	0,0002	0,9475	0,0524
Ουρόστηλο	0,5759	0,9345	3,7020	0,0006	0,9545	0,0454
Εδρικό πτερ.	0,5675	0,9484	2,8731	0,0062	0,9357	0,0642
Λόρδωση	0,5778	0,9315	3,8818	0,0004	0,8191	0,1808
Κύφωση	0,5616	0,9584	2,2901	0,0270	0,7701	0,2298
Απλά παρ. σπ.	0,5580	0,9645	1,9430	0,0619	0,8007	0,1992
Σκολίωση	0,5493	0,9798	1,0885	0,3698	0,9577	0,0422

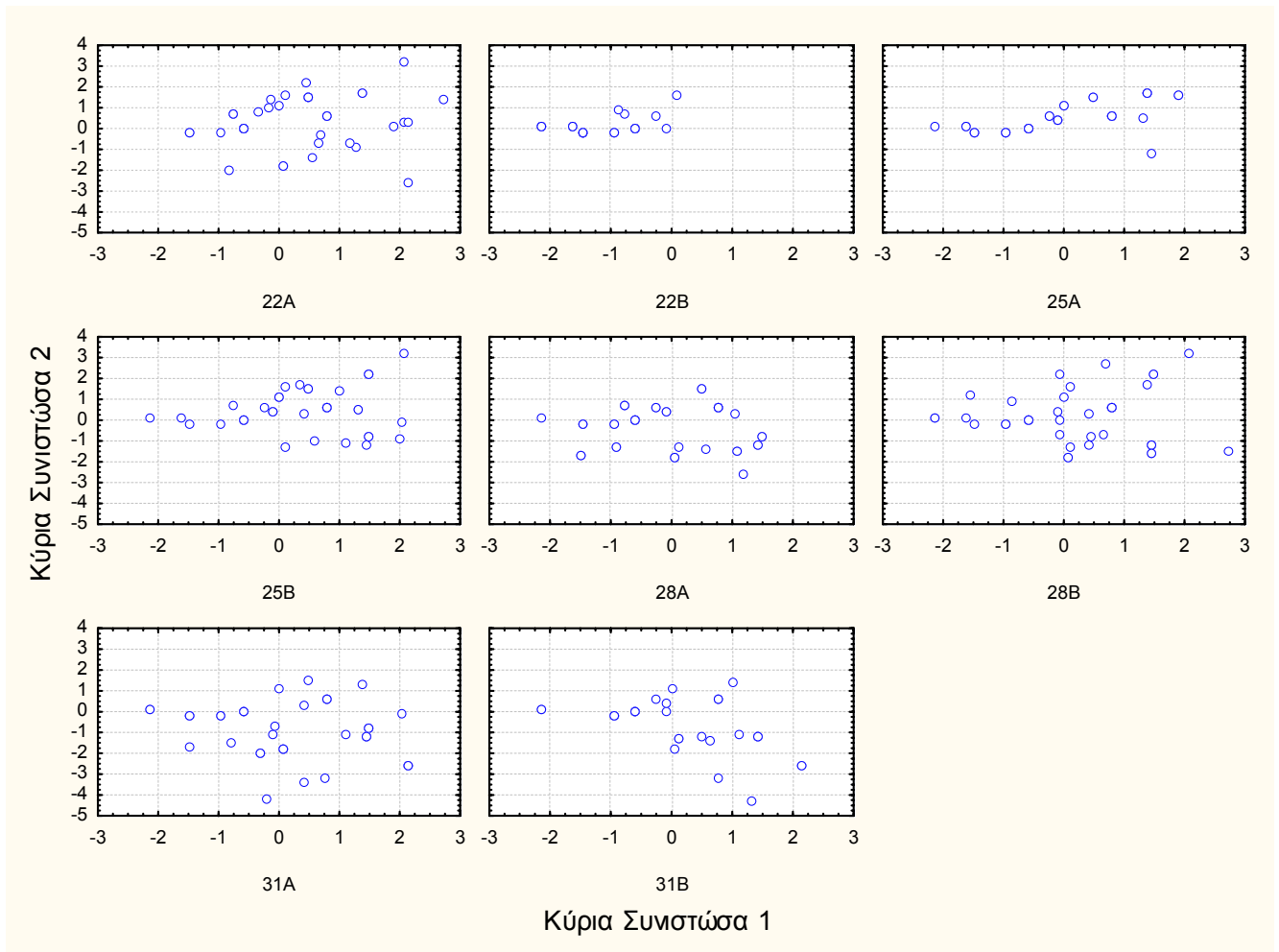
Πίνακας 1.6: Τετραγωνισμένες γενικευμένες αποστάσεις Mahalanobis μεταξύ των οκτώ διαφορετικών επαναλήψεων του πειράματος και έλεγχος της διαφοροποίησής τους. -, $P > 0,05$.

	22A	22B	25A	25B	28A	28B	31A	31B
22A		2,61804	1,34145	1,32751	1,54934	0,50473	1,77363	2,00479
22B	$P < 0,05$		1,99624	3,26632	1,93629	2,22542	3,07328	2,43926
25A	$P < 0,05$	$P < 0,05$		0,67973	0,82866	0,90166	2,26920	1,29665
25B	$P < 0,05$	$P < 0,05$	-		0,95441	0,65402	2,21911	1,56696
28A	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$		0,77454	0,91628	0,66869
28B	-	$P < 0,05$	$P < 0,05$	-	$P < 0,05$		1,22802	0,96743
31A	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$		0,69753
31B	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	$P < 0,05$	-	$P < 0,05$	-	

Οι αποστάσεις Mahalanobis για τις οκτώ επαναλήψεις δίνονται στον Πίνακα 1.6, ενώ ακολουθούν οι κανονικοποιημένοι συντελεστές (Πιν. 1.7) και η γραφική απεικόνιση των 2 πρώτων Κυρίων Συνιστωσών (Εικ. 1.20).

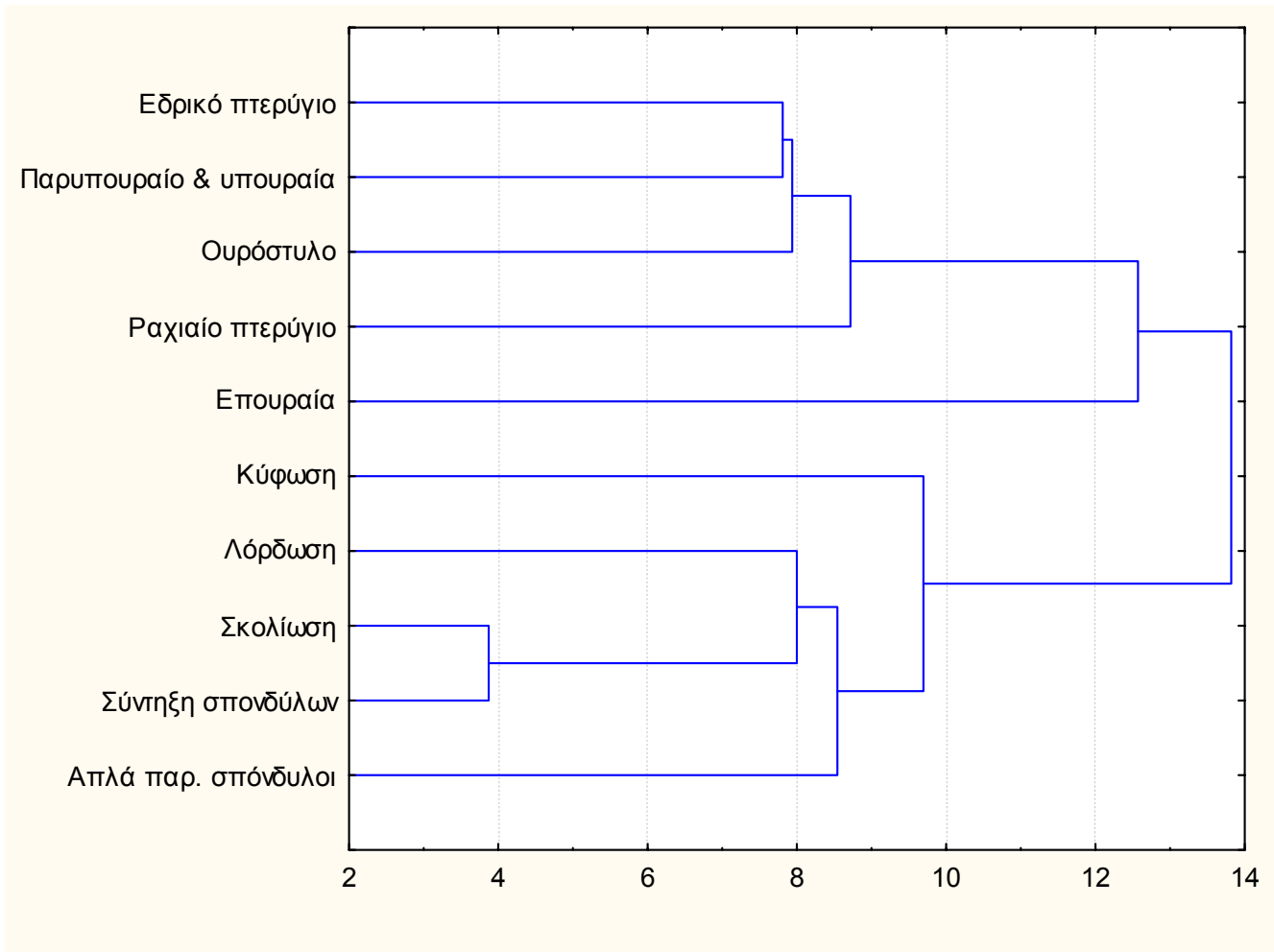
Πίνακας 1.7: Κανονικοποιημένοι συντελεστές των 9 τύπων παραμορφώσεων που συμμετείχαν στην ανάλυση μεταξύ των οκτώ επαναλήψεων. Αθρ. %, Αθροιστική διασπορά που ερμηνεύεται από κάθε Κ. Συν.; Κ. Συν., Κύρια συνιστώσα της ανάλυσης μεταβλητών; % Αθρ. Μεταβλ., επί τοις εκατό αθροιστική μεταβλητότητα.

	Κ. Συν. 1	Κ. Συν. 2	Κ. Συν. 3	Κ. Συν. 4	Κ. Συν. 5	Κ. Συν. 6	Κ. Συν. 7
Επουραία	-0,64422	-0,24674	0,44242	-0,54204	-0,23211	-0,04532	-0,09917
Ραχιαίο πτερ.	-0,23459	0,64104	-0,41846	0,06221	-0,22962	-0,28711	-0,42539
Παρυπ.& υπουρ.	-0,16750	-0,38171	-0,50512	-0,24521	0,61788	-0,07718	0,14972
Ουρόστηλο	-0,20467	-0,37110	-0,35961	0,57444	-0,52516	0,02077	0,13897
Εδρικό πτερ.	-0,22525	0,44920	-0,12345	-0,08718	0,14782	0,64489	0,39915
Λόρδωση	-0,55800	0,03380	0,27499	0,59011	0,29962	0,14603	0,04283
Κύφωση	-0,38096	-0,08579	0,22133	0,49024	0,48100	-0,41930	-0,28096
Απλά παρ. σπ.	0,20121	-0,03247	-0,40989	-0,52890	-0,41364	-0,10392	0,26979
Σκολίωση	0,06378	-0,12703	-0,24628	0,00911	0,08767	0,64030	-0,70743
Ιδιοτιμή	0,23030	0,21204	0,13445	0,03819	0,03379	0,01531	0,00778
% Αθρ. Μεταβλ.	0,34278	0,65838	0,85851	0,91535	0,96565	0,98843	1,00000



Εικόνα 1.20: Γραφική απεικόνιση των 2 πρώτων κύριων συνιστωσών που ερμηνεύουν το 66% της συνολικής μεταβλητότητας για τις οκτώ επαναλήψεις του πειράματος.

Τέλος, η Ανάλυση των Ομάδων (Cluster) αποκαλύπτει ότι οι παραμορφώσεις που εντοπίζονται στη σπονδυλική στήλη ομαδοποιούνται ξεχωριστά από τις παραμορφώσεις των πτερυγίων (Εικόνα 1.21).



Εικόνα 1.21: Σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών παραμορφώσεων της μελέτης, (Cluster Analysis) με βάση τον αλγόριθμο της Single Linkage και των Ευκλείδειων αποστάσεων.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εξετάζοντας τις σκελετικές παραμορφώσεις που εμφανίστηκαν στις τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες παρατηρούμε πως στους 22 °C και τους 25°C δεν εμφανίζεται σκολίωση ενώ στους 25°C δεν βρέθηκε κανένα άτομο που να φέρει σύντηξη. Από την άλλη, παρατηρούμε πως στους 28 και στους 31°C εμφανίζονται όλες οι σκελετικές δυσμορφίες. Με βάση τα παραπάνω, θα μπορούσε κανείς να συμπεράνει πως οι καταλληλότερες θερμοκρασίες διαβίωσης για το zebrafish είναι οι χαμηλότερες (22 και 25°C). Αυτό, όμως, έρχεται σε αντίθεση με το ποσοστό των φυσιολογικών ατόμων καθώς με την εξαίρεση των 25°C όπου παρατηρήθηκαν 1% φυσιολογικά άτομα στον πληθυσμό, όλες οι υπόλοιπες συνθήκες εμφάνισαν 0% φυσιολογικά άτομα. Δεν είναι ξεκάθαρη, λοιπόν, η επίδραση της θερμοκρασίας στο ποσοστό των σκελετικών παραμορφώσεων στους πληθυσμούς.

Τα ψάρια στους 22°C βρέθηκε ότι παρουσιάζουν μεγαλύτερο ποσοστό κύφωσης και λόρδωσης σε σύγκριση με όλες τις υπόλοιπες θερμοκρασίες και πολύ μικρότερο ποσοστό παραμορφωμένων σπονδύλων. Εάν θεωρήσουμε ότι το πρώτο στάδιο της λόρδωσης ξεκινάει από απλές παραμορφώσεις των κέντρων των σπονδύλων (Sfakianakis *et al.* 2006) από αυτό το αποτέλεσμα προκύπτει ότι αυτές οι παραμορφώσεις, θα μπορούσαν να έχουν ξεκινήσει σε όλες τις θερμοκρασίες με τα ίδια ποσοστά, και να «αναπτύχθηκαν» τελικά μόνο στους 22°C στο βαθμό που παρατηρήθηκαν. Αυτό θα μπορούσε να υπονοεί πως τα ψάρια που αναπτύσσονται στους 22°C έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εμφανίσουν λόρδωση και κύφωση απ' ό,τι οι υπόλοιπες θερμοκρασίες.

Οι παραμορφώσεις που παρατηρούνται στο ουραίο πτερύγιο, εμφανίζονται και στις τέσσερις θερμοκρασίες σε μεγάλα ποσοστά και δε διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Αρχικά, δεν προκύπτει λοιπόν επίδραση της θερμοκρασίας στην εμφάνιση παραμορφώσεων στο ουραίο πτερύγιο. Αυτό, όμως, δε σημαίνει πως αποκλείεται καθώς, σύμφωνα με τους Sfakianakis *et al.* (2004), οι παραμορφώσεις του ουραίου πτερυγίου θα μπορούσαν να αποτελέσουν κριτήριο για τη καταλληλότητα των συνθηκών εκτροφής.

Αυτό, θα μπορούσε να σημαίνει πως όλες οι θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα ήταν ακατάλληλες. Δεδομένα όμως από τη βιβλιογραφία αντικρούουν την υπόθεση αυτή, καθώς οι βέλτιστες θερμοκρασίες που έχουν κατά καιρούς προταθεί για την ανάπτυξη του είδους (27 – 34°C, Engeszer *et al.* 2007 και Spence *et al.* 2008; 26 - 29°C, Froese & Pauly 2000) περιλαμβάνουν και κάποιες από τις παρούσες.

Πρέπει να σημειωθεί πως παρόλο το μεγάλο ποσοστό των παραμορφώσεων στο ουραίο πτερύγιο, δε παρατηρήθηκε το «σύνδρομο του σαμαριού» (saddleback syndrome) στο ραχιαίο. Οι Koumoundouros *et al.* (2001b) έδειξαν στη συναγρίδα, *Dentex dentex* (L., 1758) πως αυτό το σύνδρομο σχετίζεται ανατομικά και οντογενετικά με τη σοβαρή παραμόρφωση του ουραίου πτερυγίου. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι οι παραμορφώσεις του ουραίου πτερυγίου δεν ήταν σοβαρές ή ότι οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν δεν είχαν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση αυτού του συνδρόμου στο zebrafish. Σύμφωνα με τους Boglione *et al.* (2003) όμως, που ασχολήθηκαν με το λυθρίνι, *Pagellus erythrinus* (L., 1758), αυτό το σύνδρομο μπορεί να μη σχετίζεται με τις σοβαρές παραμορφώσεις του ουραίου πτερυγίου, καθώς παρατήρησαν συνύπαρξη του «saddleback syndrome» και των παραμορφώσεων του ουραίου πτερυγίου μόνο σε μία περίπτωση.

Λίγες είναι οι μελέτες που έχουν ασχοληθεί με τις σκελετικές παραμορφώσεις του zebrafish. Κάποιες σποραδικές σκελετικές παραμορφώσεις έχουν αναφερθεί σε zebrafish εμπορικής προέλευσης (Piron 1978). Η μάλλον μοναδική βιβλιογραφική αναφορά του θέματος έγινε από τους Ferreri *et al.* (2000) οι οποίοι συνέκριναν εκτρεφόμενους με άγριους πληθυσμούς zebrafish και διαπίστωσαν ότι και οι δύο ομάδες ψαριών εμφάνισαν πολύ μεγάλα ποσοστά σκελετικών παραμορφώσεων (γύρω στο 90%). Από αυτές, σύμφωνα με τους παραπάνω ερευνητές, οι πιο κοινές παραμορφώσεις ήταν εκείνες των προουραίων σπονδυλικών κέντρων και των αποφύσεων τους. Δεν υπάρχει όμως καμία έρευνα μέχρι σήμερα που να μελετάει την επίδραση της θερμοκρασίας στην εμφάνιση σκελετικών παραμορφώσεων στο zebrafish.

Από την άλλη, είναι πολλές οι μελέτες που ασχολήθηκαν με την επίδραση της θερμοκρασίας στις μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις άλλων ψαριών. Οι Wang & Tsai (2000) βρήκαν πως οι μεγάλες θερμοκρασίες (28 και 32°C) επηρεάζουν αρνητικά την τιλάπια, *Onchorhynchus mossambicus*, αυξάνοντας το ποσοστό των παραμορφωμένων

ψαριών. Παρομοίως, μελέτες που έγιναν στο λαβράκι, *Dicentrarchus labrax* δείχνουν πως οι θερμοκρασίες εκκόλαψης που ξεπερνούν τους 19°C, αυξάνουν το ποσοστό των παραμορφωμένων ατόμων (Marino *et al.* 1991, Pelosi *et al.* 1993, Abdel *et al.* 2004). Οι Abdel *et al.* (2004) συνέκριναν πληθυσμούς λαβρακιών που μεγάλωσαν σε δυο διαφορετικές θερμοκρασίες (15 και 19°C) και παρατήρησαν μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης παραμορφωμένων ατόμων στους 19°C. Αντίθετα, οι Wiegand *et al.* (1989) βρήκαν πως η έκθεση του χρυσόψαρου, *C. auratus* σε χαμηλή θερμοκρασία (13°C) αυξάνει το ποσοστό των παραμορφωμένων ατόμων σε σύγκριση με άτομα που μεγάλωσαν στους 22°C. Οι Polo *et al.* (1991) μελέτησαν την επίδραση θερμοκρασιών από 12 μέχρι 30°C στην τσιπούρα, *Sparus aurata* από τη γονιμοποίηση μέχρι και την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου και παρατήρησαν ότι στις θερμοκρασίες μεταξύ 16 και 22°C ο ρυθμός επιβίωσης ήταν μεγαλύτερος και τα ποσοστά των παρατηρούμενων παραμορφώσεων αρκετά μικρότερα.

Επίσης, οι Sfakianakis *et al.* (2004), έδειξαν πως η θερμοκρασία συνδέεται στενά με την εμφάνιση σκελετικών παραμορφώσεων στο λυθρίνι, καθώς βρέθηκε πως όσο αυξάνει η θερμοκρασία τόσο αυξάνουν και οι παραμορφώσεις στο ουραίο περύγιο και πως η ένταση των σκελετικών παραμορφώσεων εξαρτάται από την θερμοκρασία, γεγονός που δε παρατηρήθηκε στη παρούσα εργασία. Μελετώντας τη λόρδωση στο λαβράκι, οι Sfakianakis *et al.* (2006) διαπίστωσαν ότι η υψηλή θερμοκρασία (20°C) ευνοεί τόσο τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης όσο και τη σοβαρότητα της εν λόγω παραμόρφωσης σε σχέση με τη χαμηλή θερμοκρασία (15°C). Από την άλλη, στο ίδιο είδος έχει δειχθεί ότι σε θερμοκρασία ανάπτυξης 15°C –έναντι των 20°C – παρατηρείται 8-πλάσια αύξηση της συχνότητας εμφάνισης παραμορφώσεων των βραγχιοστεγών ακτινών (Georgakopoulou *et al.* 2007b).

Στην παρούσα εργασία δε διαπιστώθηκε ξεκάθαρη επίδραση της θερμοκρασίας στην εμφάνιση σκελετικών παραμορφώσεων με βάση τη συχνότητά τους στον πληθυσμό. Αυτό πιθανότατα δηλώνει την εμπλοκή κάποιου άλλου παράγοντα που υπερισχύει της δράσης της θερμοκρασίας προκαλώντας παραμορφώσεις σε τέτοιο βαθμό που να υπερκαλύπτουν τις τυχόν διαφορές ανάμεσα στις τέσσερις συνθήκες. Σύμφωνα με τους Favalaro & Mazzola (2003) ένας μεγάλος αριθμός παραμορφώσεων υποδεικνύει

την ύπαρξη ακατάλληλων συνθηκών κατά το πρώιμο στάδιο εκτροφής. Οι χειρισμοί που έγιναν στα αυγά και η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των γεννητόρων και των ενυδρείων εκτροφής, θα μπορούσαν να αποτελέσουν το έναυσμα για την ανάπτυξη δυσπλασιών στα άτομα που επιβίωσαν (Divanach *et al.* 1996, Κουμουνδούρος 1998).

Οι συνθήκες εκτροφής θα μπορούσαν να περικλείουν και άλλους γενεσιουργούς για τις παραμορφώσεις παράγοντες. Έτσι, το pH αποτελεί έναν πιθανό παράγοντα αν και στη συγκεκριμένη μελέτη ήταν εντός των ορίων που προτείνονται από τη βιβλιογραφία (6-8, Westerfield 1995). Η διατροφή μπορεί να είναι ένας άλλος παράγοντας, καθώς είναι γνωστό από άλλες μελέτες πως οι διατροφικές συνθήκες μπορούν να αποτελέσουν αίτιο για την εμφάνιση παραμορφώσεων (Sato *et al.* 1983, Kanazawa *et al.* 1992, Takeuchi *et al.* 1995, 1998, Dedi *et al.* 1998, Madsen & Dalsgaard 1999, Sugiura *et al.* 2004). Σύμφωνα με τους Takeuchi *et al.* (1998), η έλλειψη της βιταμίνης Α προκαλεί σκελετικές παραμορφώσεις στο *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel 1846). Μια άλλη πιθανή εξήγηση θα μπορούσε να είναι αυτή της έκθεσής τους σε κάποιο είδος ρυπαντή (Bresch *et al.* 1990, Wannemacher *et al.* 1992, Henry *et al.* 1997, Wiegand *et al.* 2001, Martinez *et al.* 2003). Για παράδειγμα, έχουν παρατηρηθεί μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις σε zebrafish που έχει εκτεθεί σε 4-χλωροανιλίνη (Bresch *et al.* 1990), 2,3,7,8-τετραχλωροδιβενζο-p-διοξίνη (Wannemacher *et al.* 1992, Henry *et al.* 1997) και 2-χλωρο-4-εθυλαμινο-6-ισοπροπιλαμίνη-s-τριαζίνη (Wiegand *et al.* 2001) αν και κάτι τέτοιο μάλλον δεν ισχύει στην παρούσα μελέτη. Το γεγονός, επίσης, ότι τα ψάρια που εξετάστηκαν ήταν F3 γενεάς θα μπορούσε να επηρεάσει την ανάπτυξη των παραμορφώσεων. Σύμφωνα με τον Piron (1978) αυθόρμητες σκελετικές παραμορφώσεις είναι σπάνιες στην F1 γενιά του zebrafish, αλλά η συχνότητα εμφάνισής τους αυξάνει με την περαιτέρω διασταύρωσή τους.

Η πολυπαραγοντική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε, διαχώρισε επιτυχώς τόσο τους πληθυσμούς των τεσσάρων διαφορετικών θερμοκρασιών όσο και αυτούς των οκτώ επαναλήψεων με κριτήριο τους τύπους παραμορφώσεων που παρουσιάστηκαν σε κάθε άτομο. Από βιολογικής πλευράς, το πρόβλημα με αυτού του είδους τις αναλύσεις είναι ότι προορίζονται για να μεγιστοποιούν το διαχωρισμό μεταξύ των πληθυσμών (C.V.A.) ή να δημιουργούν κλάδους ανεξάρτητα από το αν υπάρχει ή όχι φυσική ομαδοποίηση

(Cluster Analysis) (Albrecht 1980, James & McCulloch 1990). Παρόλα αυτά, η Ανάλυση των Ομάδων αποκάλυψε διαφοροποίηση μεταξύ όλων των πτερυγίων και της σπονδυλικής στήλης σε σχέση με τις εμφανιζόμενες παραμορφώσεις, γεγονός που συμφωνεί και με την ανατομική θέση των δομών αυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΗ
ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΣΧΗΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΩΜΑΤΟΣ
ΚΑΙ ΤΩΝ ΜΕΡΙΣΤΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΩΝ ΤΟΥ ZEBRAF-
ISH.**

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Είναι γνωστό ότι οι μορφολογικές διαφορές ανάμεσα σε άτομα ή πληθυσμούς ψαριών μπορεί να οφείλονται σε γενετικές διαφοροποιήσεις, σε περιβαλλοντικούς παράγοντες, ή σε συνδυασμό των δύο (Linsday 1988, Tudela 1999, Pakkasmaa & Piironen 2001, Silva 2003) με τους περιβαλλοντικούς παράγοντες όμως να διαδραματίζουν τον καθοριστικό ρόλο (Linsday 1988). Γενικά, μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχαν έρευνες που να εξετάζουν πειραματικά την επίδραση της θερμοκρασίας στη μορφολογία και για το λόγο αυτό, οι περισσότερες πληροφορίες που είναι διαθέσιμες, προέρχονται από δειγματοληπτικές μελέτες που αφορούν στην ταυτοποίηση αλιευτικών αποθεμάτων (fish stock identification).

Έτσι, οι Junquera & Perez-Gándaras (1993), βρήκαν ότι μορφολογικές διαφορές ανάμεσα σε πληθυσμούς αντζούγιας (*Engraulis encrasicolus*) που ζουν στην ακτή του Biscay, συνδέονται με διαφορές στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι Mamuris *et al.* (1998), μελετώντας τη μορφολογική διαφοροποίηση ανάμεσα σε διάφορους πληθυσμούς μπαρμπουνιού (*Mullus barbatus*) σε 7 τοποθεσίες στην Ελλάδα, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι διαφορές οφείλονταν σε διαφορές στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο Tudela (1999), μελετώντας έναν γενετικά ομογενή πληθυσμό αντζούγιας (*Engraulis encrasicolus*) ως προς τη μορφολογία των ατόμων, διαπίστωσε ότι η διαφοροποίηση που κατέγραψε ανάμεσα στα δείγματα, οφειλόταν στην επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων. Οι Hard *et al.* (2000), συνέκριναν τη μορφολογία άγριων πληθυσμών coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) από το Hood Canal (Washington), με πληθυσμούς προερχόμενους από εκτροφές και κατέληξαν στο ότι, τουλάχιστον μερικές από τις διαφορές που κατέγραψαν, προέρχονται από επίδραση του περιβάλλοντος. Σε μελέτη που διεξήγαγαν, οι Pakkasmaa & Piironen (2001) εντόπισαν διαφορές στο σχήμα του σώματος ανάμεσα σε πέστροφες (*Salmo trutta*) από διαφορετικούς ποταμούς της Φινλανδίας, τις οποίες απέδωσαν στην διαφορετική θερμοκρασία του περιβάλλοντος στο οποίο ζούσαν. Οι Salini *et al.* (2003), μελέτησαν τη μορφολογική διαφοροποίηση στο *Tenuialosa ilisha* σε όλο το εύρος κατανομής του και πρότειναν ότι οι διαφορές οφείλονται περισσότερο σε τοπικές διαφορές στις περιβαλλοντικές συνθήκες παρά σε

διαφορές σε επίπεδο πληθυσμού. Τέλος, σύμφωνα με τον Turan (2004), παράγοντες όπως η διαφορετική θερμοκρασία και αλατότητα ανάμεσα στις περιοχές που μελέτησε (στην Ανατολική Μεσόγειο Θάλασσα, Μαύρη Θάλασσα, Αιγαίο Πέλαγος και Θάλασσα του Μαρμαρά), οδήγησαν σε σημαντικές διαφοροποιήσεις στο σχήμα του σώματος αλλά και στα μεριστικά των διαφόρων πληθυσμών σαυριδιού (*Trachurus mediterraneus*). Ο ίδιος ερευνητής (Turan *et al.* 2006), μελέτησε τη μορφολογική διαφοροποίηση μεταξύ πληθυσμών *Pomatomus saltatrix* σε διάφορες περιοχές της Μεσογείου και υποστήριξε ότι οι διαφορές που παρατηρήθηκαν οφείλονταν κυρίως σε επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, αλλά δεν περιορίζονταν σε αυτούς μόνο.

Παρά το ότι υπάρχει πλήθος δημοσιευμένων εργασιών σχετικό με τις διαφορές που εμφανίζουν στο σχήμα του σώματος άτομα του ίδιου είδους (συνήθως από διαφορετικές περιοχές), σχεδόν όλες απλά υποθέτουν ότι μπορεί να ευθύνεται η θερμοκρασία. Μόνο πρόσφατα, αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε επιστημονική μελέτη (Georgakopoulou *et al.* 2007a) άμεση και σαφής συσχέτιση της θερμοκρασίας ανάπτυξης ενός είδους με την τελική μορφή του σχήματός του. Στην εργασία αυτή βρέθηκε ότι πληθυσμοί λαβρακιού που εκτράφηκαν σε δύο θερμοκρασίες ανάπτυξης (15 ή 20°C), παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στο σχήμα τους και στις 3 διαφορετικές αναπτυξιακές στιγμές που εξετάστηκαν (στα 14,1, 21 και 38,1 mm TL).

Ο αριθμός των μεριστικών χαρακτήρων, τα οποία αναφέρονται στα απεριθμήσιμα τμήματα των δομών του σώματος (O'Reilly & Horn 2004), αποτελεί ένα μορφολογικό χαρακτηριστικό. Έχει χρησιμοποιηθεί κατά κόρον, σε συνδυασμό με άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι οι αναλογίες του σώματος (π.χ. η μορφομετρία), για την ταυτοποίηση ή τον διαχωρισμό μεταξύ ειδών (Ditty *et al.* 2005), πληθυσμών (O'Reilly & Horn 2004, Turan 2004) και ατόμων ενός γενετικά όμοιου πληθυσμού (Kinsey *et al.* 1994, Tudela 1999). Χαρακτηριστική περίπτωση είναι οι διαφορές που φαίνεται να υπάρχουν μεταξύ τριών διαφορετικών πληθυσμών του *Atherinops affinis* (Ayres 1860) που απαντώνται στις ακτές του Ειρηνικού ωκεανού (O'Reilly & Horn 2004). Επίσης, τα μεριστικά χαρακτηριστικά έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των διαφορών μεταξύ των άγριων και των εκτρεφόμενων ψαριών (Ferrerri *et al.* 2000, Boglione *et al.* 2001, Favaloro & Mazzola 2003). Σύμφωνα με τους Ferrerri *et*

al. (2000), τα άγρια και τα εκτρεφόμενα άτομα του zebrafish διαφέρουν στον αριθμό των εδρικών πτερυγοφόρων και των ραχιαίων και εδρικών παρεμβολών των πτερυγίων (anal fin insertions).

Παρά το ότι ο αριθμός των μεριστικών δομών καθορίζεται από τον γονότυπο, είναι αρκετές εκείνες οι αναφορές που υποστηρίζουν πως ο τελικός αριθμός αυτού του μορφολογικού χαρακτήρα καθορίζεται από επιδράσεις του περιβάλλοντος κατά την κρίσιμη περίοδο της ανάπτυξης των ψαριών. Τέτοιες επιδράσεις μπορεί να είναι η θερμοκρασία, το διαλυμένο οξυγόνο και η αλατότητα (Leary *et al.* 1985, Kinsey *et al.* 1994, Tudela 1999, O'Reilly & Horn 2004, Turan 2004, Ditty *et al.* 2005, Georgakopoulou *et al.* 2007a).

Αν και οι έρευνες με αντικείμενο την επίδραση της θερμοκρασίας ή τα μεριστικά στοιχεία των διαφόρων ειδών είναι πάρα πολλές, οι μελέτες που αποδίδουν με σαφήνεια επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στους μεριστικούς χαρακτήρες, είναι ελάχιστες (Lindsey 1988, Blaxter 1992, Murray & Beacham 1989, Georgakopoulou *et al.* 2007a).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να διερευνηθεί η επίδραση που μπορεί να έχουν τέσσερις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας στα πρώτα στάδια της ζωής, στη διαμόρφωση του σχήματος του σώματος και των μεριστικών χαρακτήρων στο zebrafish.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δειγματοληψία

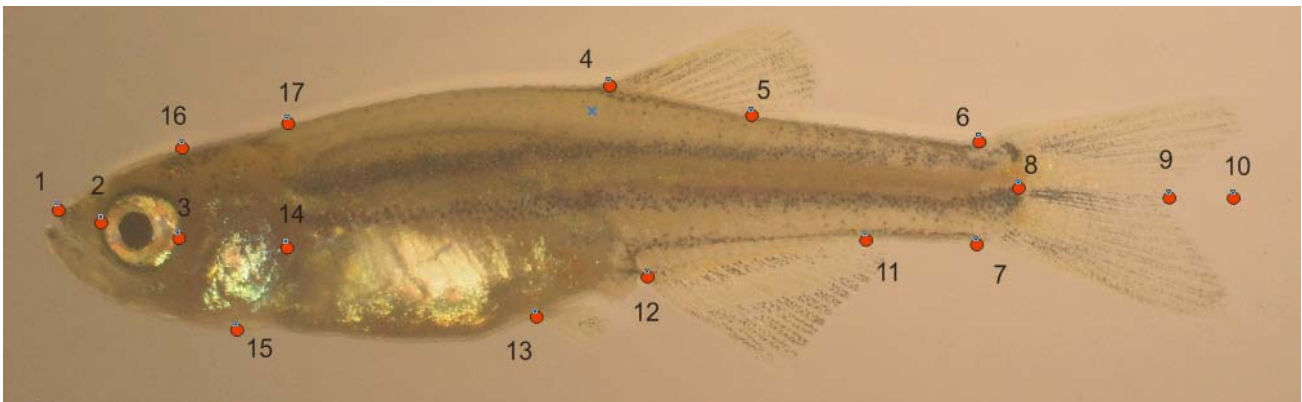
Η εκτροφή τερματίστηκε στο τέλος της μεταμόρφωσης, όταν το μέσο TL τυχαίου δείγματος υπερέβαινε τα 12 mm. Τα δείγματα συλλέχθηκαν, αναισθητοποιήθηκαν (ethylenglycol-monophenylether, Merck, 0.2-0.5 ml l⁻¹) και φωτογραφήθηκαν ατομικά από την αριστερή τους πλευρά ψηφιακή μηχανή (Olympus C-5050). Ακολούθησε μαζική συντήρηση σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλίνης 5% (pH=7,2, Taylor and Van Dyke 1985) και μετά την πάροδο ελάχιστου χρονικού διαστήματος μιας βδομάδας, υποβλήθηκαν σε διπλή χρώση Αλιζαρίνης – Κυανού της Αλσατίας (Park and Kim, 1984).

Οι παραγόμενες ψηφιακές φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκαν για τη μορφομετρική ανάλυση του σχήματος του σώματος και για τις μετρήσεις του TL των ατόμων (tpsDig, Rohlf, version 5.0.3.32), ενώ τα βαμμένα άτομα χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των μεριστικών χαρακτήρων. Τα άτομα που έφεραν παραμορφώσεις ή τραυματισμό λόγω ανθρώπινων χειρισμών σε οποιαδήποτε ανατομική περιοχή του σώματος (κεφάλι, πτερύγια ή σπονδυλική στήλη, Koumoundouros *et al.* 1997a, 2001b, Sfakianakis *et al.* 2003, 2004, 2006), τέτοιους που να επηρεάζουν το σχήμα του σώματος ή να υπονομεύουν τη σωστή εκτίμηση των μεριστικών, εξαιρέθηκαν από τη μελέτη. Χρησιμοποιήθηκαν εντέλει 200 άτομα στο σύνολο (50 ανά θερμοκρασιακή συνθήκη· Χρησιμοποιήθηκε αυτούσια η μία επανάληψη του πειράματος) για τη μελέτη του σχήματος του σώματος και 386 άτομα (96, 100, 101 και 89 αντίστοιχα από τις συνθήκες των 22, 25, 28 και 31°C) για τη μελέτη των μεριστικών.

Ανάλυση δεδομένων σχήματος σώματος - Μορφομετρία

Τοποθέτηση «σημείων αναφοράς» («landmarks»)

Για τη μελέτη του σχήματος του σώματος χρησιμοποιήθηκαν μορφομετρικοί χαρακτήρες της εξωτερικής μορφολογίας οι οποίοι οριοθετήθηκαν με τη βοήθεια των «σημείων αναφοράς» («landmarks» ή «γεωμετρικά ορόσημα»). Ειδικότερα, σε κάθε φωτογραφία, τοποθετήθηκαν 17 «landmarks» σε συγκεκριμένα σημεία της ανατομίας του ψαριού (Εικόνα 2.1, Πίνακας 2.1).

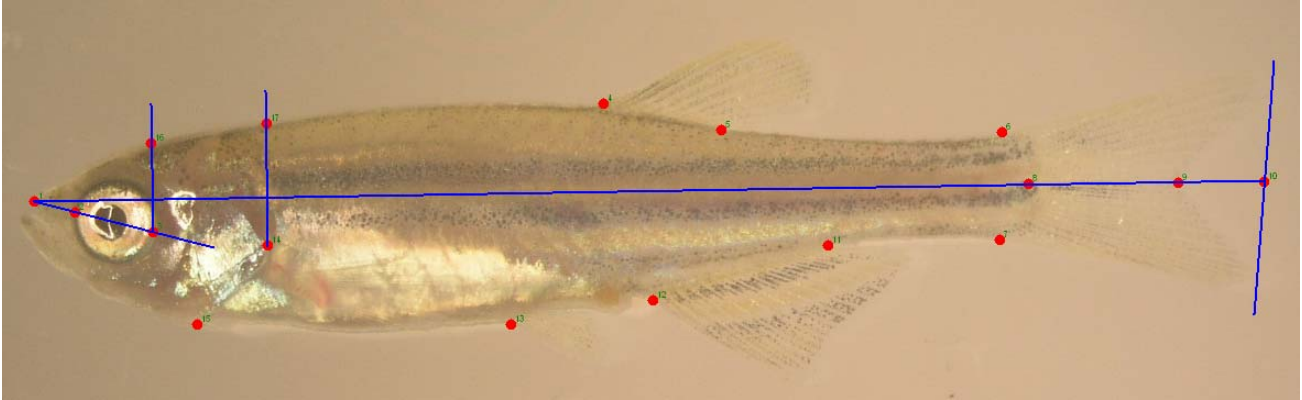


Εικόνα 2.1. Τα σημεία του σώματος που επιλέχθηκαν για την τοποθέτηση των «landmarks».

Η επιλογή των σημείων (αλλά και των αποστάσεων) έγινε με αναφορά σε βιβλιογραφικά δεδομένα, προηγούμενη εμπειρία αλλά και προσαρμογή τους στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του μελετούμενου είδους. Η επιλογή καθοδηγήθηκε από το ότι έπρεπε α) να είναι σταθερά σημεία της ανατομίας του ιχθυδίου, και β) να είναι εύκολα τοποθετήσιμα σε όλα τα άτομα ανεξαιρέτως (όποια και αν ήταν η ποιότητα της φωτογραφίας ή η ιδιαιτερότητα κάθε ατόμου).

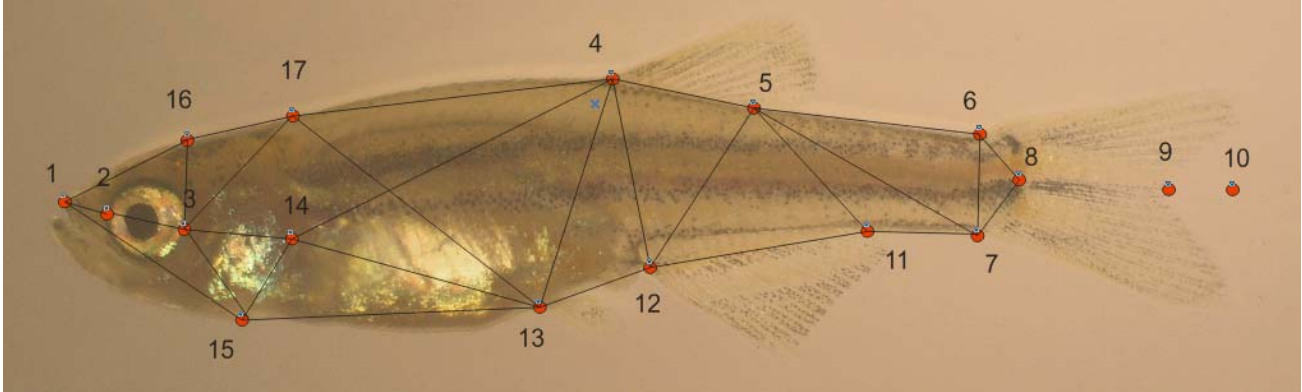
Πίνακας 2.1. Σημεία του σώματος που χρησιμοποιήθηκαν για την τοποθέτηση των «landmarks».

Σημείο	Θέση στο σώμα
1	Πρόσθιο άκρο του προγναθικού οστού
2	Πρόσθιο άκρο του ματιού (πάνω στη νοητή γραμμή που διέρχεται από το κέντρο της κόρης και καταλήγει στο ρύγχος) (Εικόνα. 2.2)
3	Οπίσθιο άκρο του ματιού(πάνω στη νοητή γραμμή που διέρχεται από το κέντρο της κόρης και καταλήγει στο ρύγχος) (Εικόνα. 2.2)
4	Πρόσθια βάση ραχιαίου πτερυγίου
5	Οπίσθια βάση ραχιαίου πτερυγίου
6	Νωτιαία βάση ουραίου πτερυγίου
7	Κοιλιακή βάση ουραίου πτερυγίου
8	Οπίσθιο όριο ουραίου μίσχου
9	Μέσο ουραίου πτερυγίου
10	Σημείο τομής της νοητής γραμμής που ενώνει τις οπίσθιες άνω και κάτω άκρες του ουραίου πτερυγίου με τον επιμήκη άξονα του σώματος (Η απόστασή του από το ρύγχος αποτελεί το TL) (Εικ. 2.2)
11	Οπίσθια βάση εδρικού πτερυγίου
12	Πρόσθια βάση εδρικού πτερυγίου
13	Πρόσθια βάση αριστερού κοιλιακού πτερυγίου
14	Άπω όριο βραγχιακού επικαλύμματος
15	Κοιλιακή άκρη του κλείθρου
16	Σημείο τομής της κάθετης προβολής του σημείου 3 [με ευθεία αναφοράς την απόσταση 1-10 (TL)] με την εξωτερική ραχιαία περιφέρεια του σώματος (Εικ. 2.2)
17	Σημείο επαφής της κάθετης προβολής του σημείου 14 [με ευθεία αναφοράς την απόσταση 1-10 (TL)] με την εξωτερική ραχιαία περιφέρεια του σώματος (Εικ. 2.2)



Εικόνα 2.2. Φωτογραφία ψαριού μετά από επεξεργασία και τοποθέτηση των «landmarks» στο tpsDig. Διακρίνονται οι ευθείες (με μπλε χρώμα), που χρησιμοποιήθηκαν για την τοποθέτηση των «landmarks».

Οι αποστάσεις που ορίζονται από τα σημεία αυτά, αποτελούν τους μορφομετρικούς χαρακτήρες κάθε ατόμου βάσει των οποίων επιχειρήθηκε η σύγκριση των σχημάτων των σωμάτων μεταξύ τους. Οι μορφομετρικοί αυτοί χαρακτήρες δίνουν μία καλή εικόνα για το περίγραμμα του σώματος, δημιουργώντας ένα πλέγμα που καλύπτει το μεγαλύτερο μέρος του σώματος του ψαριού. Το πλέγμα αυτό, ή αλλιώς «truss network» (Strauss & Bookstein 1982), έχει χρησιμοποιηθεί σε αρκετές μελέτες στο παρελθόν (Junquera & Perez-Gándaras 1993, Hauser *et al.* 1995, 1998) με πολύ καλά αποτελέσματα. Στην Εικόνα 2.3 διακρίνονται οι 28 αποστάσεις των σημείων που επιλέχθηκαν τελικά για την περιγραφή του σχήματος του σώματος. Αυτές είναι οι d1-2, d2-3, d4-5, d5-6, d5-7, d4-12, d5-11, d3-15, d4-13, d5-12, d3-16, d4-14, d6-7, d1-15, d3-17, d6-8, d1-16, d4-17, d7-8, d16-17, d7-11, d11-12, d12-13, d13-14, d13-15, d13-17, d14-15 και d3-14.



Εικόνα 2.3: Οι 28 αποστάσεις των σημείων που επιλέχθηκαν για την περιγραφή του σχήματος του σώματος σχηματίζοντας το «truss network».

Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί ότι, άτομα με εμφανείς μορφοανατομικές παραμορφώσεις (που αλλοίωναν το σχήμα του σώματος) ή στα οποία δεν ήταν εμφανή όλα τα σημεία τοποθέτησης των «landmarks», δεν χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω στην ανάλυση. Ο ακριβής υπολογισμός των αποστάσεων μεταξύ των σημείων, έγινε πάνω στις ψηφιακές φωτογραφίες με τη χρήση ειδικού λογισμικού (tpsDig, Rohlf, version 5.0.3.32). Κατόπιν, με τη βοήθεια του Excel (Microsoft office, USA) και μέτρου αναφοράς (κλίμακα, που υπάρχει σε κάθε φωτογραφία) υπολογίστηκαν σε απόλυτους αριθμούς όλοι οι χαρακτήρες καθώς το πρόγραμμα ανάλυσης εικόνας υπολογίζει για κάθε σημείο μόνο τις x, y συντεταγμένες. Όλες οι μετρήσεις έγιναν στην αριστερή πλευρά του σώματος των ψαριών ώστε να μην επηρεαστούν τα δεδομένα από την πλευρική ασυμμετρία. Οι μετρήσεις έχουν γίνει με ακρίβεια 0,1 mm και όλες από τον ίδιο άνθρωπο ώστε να μην υπεισέλθει επιπλέον παράγοντας διαφοροποίησης.

Σημείωση: Το σημείο 9, αν και τοποθετήθηκε αρχικά, στη συνέχεια δε χρησιμοποιήθηκε στην εξαγωγή οποιουδήποτε μορφομετρικού χαρακτήρα καθώς δεν αποτελεί σταθερό σημείο της ανατομίας. Το σημείο 10 χρησιμοποιείται στον υπολογισμό του TL.

Στατιστική ανάλυση

Όλες οι μεταβλητές που χρησιμοποιούνται για την περιγραφή του σχήματος εξαρτώνται από το μέγεθος και για αυτό το λόγο έπρεπε να προσαρμοστούν κατάλληλα (διαδικασία κανονικοποίησης). Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση της αλλομετρίας η οποία είναι:

$$Y=a*X^b$$

όπου Y είναι η προβλεπόμενη τιμή, X είναι η παρατηρούμενη, a είναι μια σταθερά (allometric coefficient) και b είναι η καμπύλη της σχέσεως μεταξύ Y και X (slope, ή allometric exponent).

Η εξίσωση αυτή τροποποιήθηκε ώστε η προσαρμοσμένη τιμή μιας μεταβλητής ενός ατόμου μεγέθους X_i να ισούται με

$$Y_i^* = Y_i \left[\frac{X_0}{X_i} \right]^b,$$

όπου Y_i είναι η πραγματική τιμή της μεταβλητής Y , Y_i^* η προσαρμοσμένη τιμή και X_0 ένα αυθαίρετο μέγεθος αναφοράς (στην συγκεκριμένη περίπτωση ως μέγεθος αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ο μέσος όρος του σταθερού μήκους (TL) όλων των ψαριών της μελέτης που ήταν 13,475 mm). Η κανονικοποίηση έγινε μετά από λογαριθμοποίηση των δεδομένων, χρησιμοποιώντας κοινό b για το σύνολο των ατόμων αφού τα b μεταξύ των επιμέρους κατηγοριών δε διέφεραν.

Αυτή η μέθοδος ανάγει τα άτομα ενός πληθυσμού σε ένα κοινό μέγεθος (13,475 mm) διατηρώντας όμως την ατομική διαφοροποίηση και παράλληλα κανονικοποιεί τα δεδομένα (Tudela 1999). Το μεγάλο της πλεονέκτημα είναι ότι διατηρεί τις σχέσεις αλλομετρίας των μορφομετρικών μεταβλητών μέσα σε κάθε ομάδα. Ο Reist (1985) σε μια συγκριτική εργασία του σχετικά με τις διαφορετικές τεχνικές κανονικοποίησης δεδομένων την κατέταξε ανάμεσα στις καλύτερες. Έκτοτε, αυτή η μέθοδος

χρησιμοποιήθηκε σε πολλά είδη ψαριών με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα (Ibanez-Aguirre & Lleonart 1996, Tudela 1999 Salini *et al.* 2003, Turan 2004, 2006).

Για τον προσδιορισμό των διαφορών όσον αφορά το σχήμα των διαφορετικών ομάδων μεταξύ των οποίων έγινε η σύγκριση, χρησιμοποιήθηκε πολυπαραγοντική ανάλυση διασποράς (MANOVA) και η “forward stepwise Discriminant Analysis” (DA). Σε αυτήν, οι μεταβλητές τοποθετούνται ανά μία κάθε φορά σύμφωνα με το κριτήριο «F to enter» (στην προκειμένη περίπτωση ήταν 1,00), ενώ μέσω της “Ανάλυσης Κανονικών Μεταβλητών” (Canonical Variate Analysis, CVA) αποδίδονται κανονικές μεταβλητές (Canonical Variates) που ταξινομούν τις μεταβλητές κατά τρόπο ώστε να μεγιστοποιείται η διασπορά μεταξύ των διαφορετικών ομάδων σε σχέση με τη διασπορά μέσα στις ίδιες τις ομάδες.

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις έγιναν με τη βοήθεια του λογισμικού πακέτου «Statistica, 6» ενώ όλα τα σχέδια και η επεξεργασία των εικόνων έγιναν με το πρόγραμμα «Corel 11».

Ανάλυση μεριστικών χαρακτήρων

Η παρατήρηση έγινε σε στερεοσκόπιο (Olympus SZX9) και οι μεριστικοί χαρακτήρες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ακτίνες όλων των πτερυγίων (ραχιαίο, εδρικό, θωρακικά, κοιλιακά και ουραίο) και τα κέντρα των σπονδύλων. Σε όλα τα πτερύγια μετρήθηκε ο συνολικός αριθμός των ακτίνων (χωρίς να γίνει διαχωρισμός μεταξύ μαλακών και σκληρών), ενώ στο ουραίο πτερύγιο έγινε διαχωρισμός μεταξύ άνω και κάτω λοβού και μέτρηση τόσο των λεπιδοτρίχιων όσο και των δερματοτρίχιων κάθε περιοχής. Για τα ζυγά πτερύγια (θωρακικά και κοιλιακά), η μέτρηση των μεριστικών έγινε από την αριστερή πλευρά του σώματος ενώ η ονοματολογία που ακολουθήθηκε ήταν αυτή που προτείνεται από τον Harder (1975). Κάθε άτομο που χρησιμοποιήθηκε στη μελέτη, εξετάστηκε ως προς την οντογένεση του σκελετού του για να διασφαλιστεί η ολοκλήρωση του σχηματισμού των μεριστικών του χαρακτήρων.

Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας στους μεριστικούς χαρακτήρες του zebrafish έγινε ενοποίηση των δύο επαναλήψεων (Α και Β) κάθε θερμοκρασίας, με τον ίδιο τρόπο που έγινε και στις σκελετικές παραμορφώσεις (ΚΕΦ. 1). Η γραφική απεικόνιση των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του κατάλληλου προγράμματος (Excel, Microsoft Office, USA).

Η επίδραση της θερμοκρασίας στους μεριστικούς χαρακτήρες του zebrafish εξετάστηκε με τη βοήθεια της MANOVA, ενώ για τον έλεγχο της σημαντικότητας των διαφορών στον αριθμό των μεριστικών στοιχείων μεταξύ των θερμοκρασιών (22, 25, 28 και 31°C), χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική δοκιμή των Mann-Whitney για δύο δείγματα, εφόσον δεν πληρούνταν οι κατάλληλες προϋποθέσεις (κανονικότητα κατανομής δεδομένων και ομοιογένεια διασπορών μεταξύ των δειγμάτων, Sokal & Rohlf 1995). Όλα τα τεστ πραγματοποιήθηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας 95%.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Σχήμα του σώματος

Το ολικό μήκος (\pm S.D.) των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του σχήματος του σώματος δίνεται στον Πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2: Ολικό μήκος (mm) \pm S.D. και εύρος (min-max) όλων των δειγμάτων (n) που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη του σχήματος του σώματος.

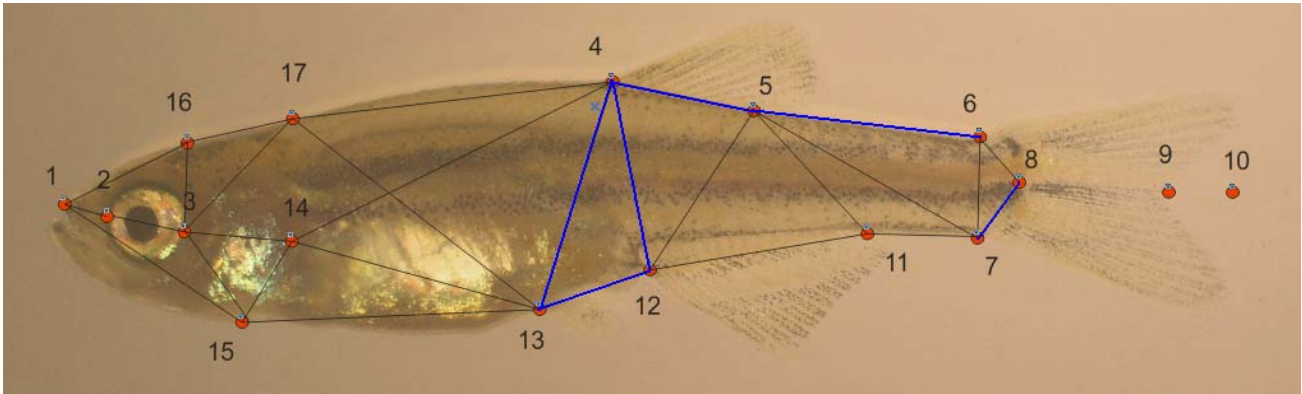
<i>T</i> °C	<i>TL</i>	<i>SD</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>n</i>
22	13,35	1,41	11,27	16,98	50
25	13,55	1,33	10,79	15,87	50
28	13,74	1,66	10,48	16,35	50
31	13,31	1,50	10,79	16,35	50

Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι οι μορφομετρικοί χαρακτήρες και επομένως το σχήμα του σώματος επηρεάστηκαν σημαντικά από τη θερμοκρασία εκτροφής (Wilks' Lambda: 0,03905, $F_{(84,644)} = 15,003$, $p < 0,0000$, MANOVA). Στον Πίνακα 2.3, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της Ανάλυσης διαχωρισμού (Discriminant Function Analysis, DFA) για όλες τις αποστάσεις (μορφομετρικοί χαρακτήρες).

Πίνακας 2.3. Αποτελέσματα της Ανάλυσης Διαχωρισμού για τους 28 μορφομετρικούς χαρακτήρες της ανάλυσης

Χαρακτήρες	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (3,215)	p-level	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)
d1-2	0.039519	0.988003	0.87025	0.457307	0.104002	0.895998
d2-3	0.039340	0.992513	0.54062	0.654970	0.095854	0.904146
d4-5	0.045830	0.851951	12.45399	0.000000	0.108204	0.891796
d5-6	0.042537	0.917908	6.40943	0.000354	0.161932	0.838068
d5-7	0.040046	0.975004	1.83734	0.141346	0.020454	0.979546
d4-12	0.053262	0.733078	26.09458	0.000000	0.105658	0.894342
d5-11	0.040956	0.953343	3.50738	0.016207	0.051329	0.948671
d3-15	0.039865	0.979431	1.50510	0.214182	0.026190	0.973810
d4-13	0.043969	0.888025	9.03674	0.000012	0.026775	0.973225
d5-12	0.040382	0.966908	2.45278	0.064286	0.100533	0.899467
d3-16	0.039480	0.988987	0.79808	0.496145	0.037676	0.962324
d4-14	0.040179	0.971773	2.08169	0.103610	0.002753	0.997247
d6-7	0.041855	0.932879	5.15646	0.001840	0.435387	0.564613
d1-15	0.040330	0.968151	2.35759	0.072698	0.018889	0.981111
d3-17	0.040345	0.967784	2.38565	0.070112	0.009262	0.990738
d6-8	0.040803	0.956916	3.22673	0.023433	0.514495	0.485505
d1-16	0.039609	0.985765	1.03489	0.378015	0.106257	0.893743
d4-17	0.040962	0.953206	3.51822	0.015977	0.003320	0.996680
d7-8	0.043614	0.895236	8.38671	0.000027	0.539391	0.460609
d16-17	0.041493	0.941004	4.49310	0.004417	0.035725	0.964275
d7-11	0.040389	0.966736	2.46592	0.063202	0.022694	0.977306
d11-12	0.042045	0.928647	5.50654	0.001160	0.100907	0.899093
d12-13	0.044712	0.873261	10.40123	0.000002	0.165672	0.834328
d13-14	0.039628	0.985289	1.07006	0.362694	0.031354	0.968646
d13-15	0.039714	0.983171	1.22671	0.300908	0.005599	0.994401
d13-17	0.040203	0.971207	2.12470	0.098065	0.016551	0.983449
d14-15	0.039450	0.989747	0.74242	0.527833	0.009061	0.990939
d3-14	0.040051	0.974891	1.84580	0.139843	0.022288	0.977712

Οι αποστάσεις που αντιστοιχούν σε $p < 0,001$ είναι αυτές που διαφέρουν σε επίπεδο σημαντικότητας 99,9% ανάμεσα στις τέσσερις θερμοκρασίες. Οι αποστάσεις που εμφανίζουν τις μεγαλύτερες τιμές «F-remove» είναι εκείνες που έχουν στατιστικά μεγαλύτερη διαφορά και έπαιξαν σημαντικότερο ρόλο στο στατιστικό διαχωρισμό των τεσσάρων πληθυσμών. Οι μορφομετρικοί χαρακτήρες που συνεισφέρουν περισσότερο στην ολική διαφοροποίηση ($p < 0.001$) είναι οι d4-12, d4-5, d12-13, d4-13, d7-8 και d5-6 (Πίν. 2.4, Εικ. 2.4).



Εικόνα 2.4: Οι 6 αποστάσεις (με μπλε χρώμα) που συμμετείχαν περισσότερο στο διαχωρισμό των τεσσάρων πληθυσμών του πειράματος.

Πίνακας 2.4: Οι 6 μορφολογικοί χαρακτήρες που διαφέρουν στατιστικά σημαντικά (σε επίπεδο 99,9%) και συμμετείχαν περισσότερο στο διαχωρισμό των τεσσάρων πληθυσμών (με μειούμενη σειρά σημαντικότητας).

Χαρακτήρες	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (3,215)	p-level	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)
d4-12	0.053262	0.733078	26.09458	0.000000	0.105658	0.894342
d4-5	0.045830	0.851951	12.45399	0.000000	0.108204	0.891796
d12-13	0.044712	0.873261	10.40123	0.000002	0.165672	0.834328
d4-13	0.043969	0.888025	9.03674	0.000012	0.026775	0.973225
d7-8	0.043614	0.895236	8.38671	0.000027	0.539391	0.460609
d5-6	0.042537	0.917908	6.40943	0.000354	0.161932	0.838068

Το αποτέλεσμα της C.V.A. για τις 28 αποστάσεις που συμμετέχουν στο διαχωρισμό των πληθυσμών, δίνεται στον Πίνακα 2.5 (κανονικοποιημένοι συντελεστές). Οι δύο πρώτοι κανονικοί άξονες της C.V.A. (Root 1 και Root 2), αποδίδουν πάνω από το 90% της συνολικής μεταβλητότητας, ενώ ο πρώτος άξονας μόνος του εκφράζει το 71% περίπου.

*Πίνακας 2.5. Κανονικοποιημένοι συντελεστές των 28
χαρακτήρων που συμμετέχουν στην ανάλυση.*

	Root 1	Root 2	Root 3
d1-2	-0.03818	-0.44075	-0.02033
d2-3	-0.15536	-0.14643	-0.33021
d4-5	0.66382	-1.28254	0.28523
d5-6	0.02491	-0.64265	0.79743
d5-7	0.71935	-0.93856	0.80837
d4-12	-1.59223	0.64266	0.61762
d5-11	0.14832	-0.78272	-1.13073
d3-15	-0.11081	-1.03749	-0.58803
d4-13	1.65126	-1.29196	1.48552
d5-12	-0.06645	-0.50877	-0.64648
d3-16	-0.44965	0.45548	0.05127
d4-14	-0.61979	3.13252	-3.17003
d6-7	-0.20971	0.39439	-0.25038
d1-15	0.40166	-0.26413	1.90655
d3-17	0.13082	-2.31412	-0.88068
d6-8	0.03326	-0.09409	0.43227
d1-16	-0.01769	0.42278	0.26350
d4-17	0.23271	-3.98335	3.37811
d7-8	-0.13810	-0.55088	0.02214
d16-17	0.32515	0.89598	1.62122
d7-11	-0.83541	0.21101	-1.43421
d11-12	-0.51248	0.90641	0.10902
d12-13	-0.79923	0.44172	-0.52613
d13-14	-0.65346	0.06341	-0.51186
d13-15	0.61707	-1.44651	1.87392
d13-17	0.45956	1.45825	-0.87093
d14-15	-0.59725	0.77781	-1.07223
d3-14	-0.88581	0.13757	-1.04952
(Ιδιοτιμή)	5.18875	1.41931	0.71056
% Αθροιστική Μεταβλητότητα	0.70898	0.90291	1.00000

Από τις τιμές των τετραγωνισμένων αποστάσεων Mahalanobis (Πίν. 2.6), προκύπτει ότι όλοι οι διαφορετικοί πληθυσμοί του πειράματος διαφέρουν μεταξύ τους όσον αφορά το σχήμα του σώματος ($p < 0,05$). Επίσης, προκύπτει ότι όσο αυξάνεται η

θερμοκρασία, τόσο αυξάνεται και η διαφοροποίηση του σχήματος του σώματος ανάμεσα στους τέσσερις πληθυσμούς. Δηλαδή, για παράδειγμα, τα άτομα των 22°C διαφέρουν περισσότερο από τα άτομα των 31°C, παρά από τα άτομα των 28°C και ακόμα λιγότερο από τα άτομα των 25°C.

Πίνακας 2.6: Τετραγωνισμένες αποστάσεις «Mahalanobis» και σύγκριση του σχήματος μεταξύ των ατόμων των τεσσάρων συνθηκών (22, 25, 28 και 31°C) με βάση τις αποστάσεις αυτές.

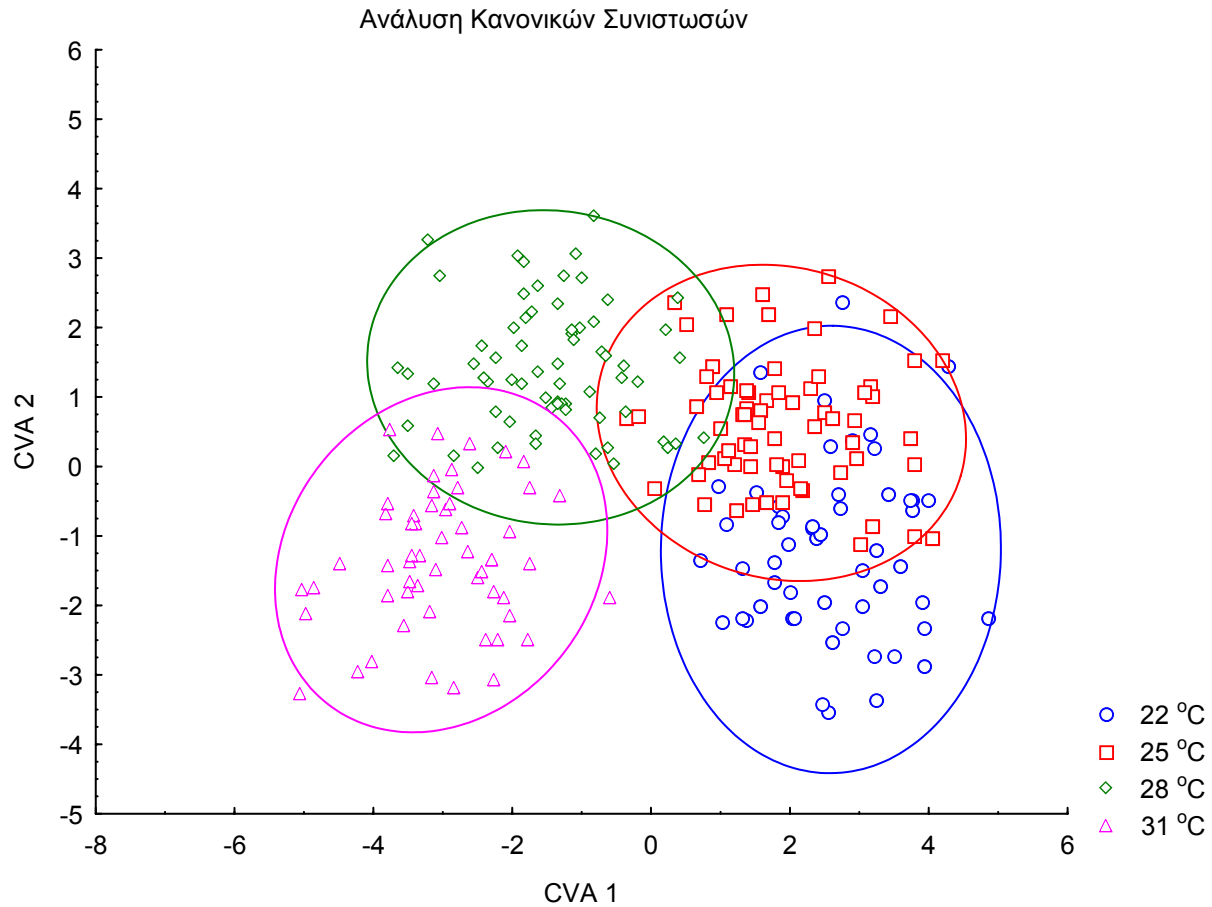
Θερμοκρασίες	22	25	28	31
22		$P<0,05$	$P<0,05$	$P<0,05$
25	7.94091		$P<0,05$	$P<0,05$
28	23.58698	15.14899		$P<0,05$
31	34.01297	28.72729	11.77138	

Στον Πίνακα Ταξινόμησης ή «Classification Matrix» (Πίν. 2.7), φαίνεται ότι το 91,1% περίπου των ατόμων της εργασίας, επανατοποθετείται σωστά στις τέσσερις ομάδες από το πρόγραμμα ανάλυσης.

Πίνακας 2.7. Ταξινόμηση των ατόμων στους 4 πληθυσμούς (22, 25, 28 και 31°C) βάσει της ανάλυσης διαχωρισμού. Στήλες, παρατηρούμενη επανατοποθέτηση; Γραμμές, προβλεπόμενη επανατοποθέτηση.

	Ποσοστό σωστών	22	25	28	31
22	88.88889	48	6	0	0
25	86.76471	7	59	2	0
28	92.64706	0	2	63	3
31	96.42857	0	0	2	54
Σύνολο	91.05691	55	67	67	57

Η γραφική παράσταση των 2 πρώτων αξόνων της CVA επαρκεί για την απεικόνιση των διαφοροποιήσεων μεταξύ των τεσσάρων πληθυσμών του πειράματος αφού φαίνεται ότι οι τέσσερις ομάδες διαχωρίζονται εμφανώς μεταξύ τους (Εικ. 2.5).



Εικόνα 2.5. Γραφική απεικόνιση των ατόμων της μελέτης (N=200) για τις τέσσερις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας στους δύο πρώτους άξονες της CVA με βάση τους μορφολογικούς τους χαρακτήρες. Οι ελλείψεις αντιπροσωπεύουν το 95% των περιοχών εμπιστοσύνης.

Μεριστικά στοιχεία

Το ολικό μήκος (\pm S.D.) των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη των μεριστικών δίνεται στον Πίνακα 2.8. Από την ανάλυση των μεριστικών στοιχείων προέκυψε στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της θερμοκρασίας εκτροφής και του ολικού αριθμού των σπονδύλων και των ακτίνων των πτερυγίων στο zebrafish (Wilks' $\lambda = 0,505$, approximation $F_{8,962}$, $p < 0.001$, MANOVA). Στις περισσότερες των περιπτώσεων, οι ακραίες θερμοκρασίες διαφοροποιούνταν στατιστικά από όλες τις υπόλοιπες (Εικ. 3.1). Ο αριθμός των σπονδύλων, των ραχιαίων και των εδρικών ακτίνων ήταν σημαντικά υψηλότερος στους 22°C ενώ ο αριθμός των ακτίνων των θωρακικών και των κοιλιακών πτερυγίων ήταν σημαντικά χαμηλότερος στους 31°C. Οι υπόλοιπες συνθήκες θερμοκρασίας δεν παρουσίασαν καμία διαφοροποίηση για τα παραπάνω μεριστικά (Εικ. 3.1, Πίνακας 2.9). Στα άνω ουραία δερματοτρίχια, οι δύο ακραίες θερμοκρασιακές συνθήκες (22 και 31°C) παρουσίασαν μικρότερο αριθμό ακτίνων σε σχέση με τις ενδιάμεσες (25 και 28°C), ενώ στα κάτω ουραία δερματοτρίχια, ο αριθμός των ακτίνων ήταν μικρότερος στους 22°C. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των τεσσάρων ομάδων σε σχέση με τα κάτω ουραία λεπιδοτρίχια ενώ αντίθετα τα άνω λεπιδοτρίχια παρουσίασαν μια σχετική διαφοροποίηση (Εικ. 2.6, Πίνακας 2.9).

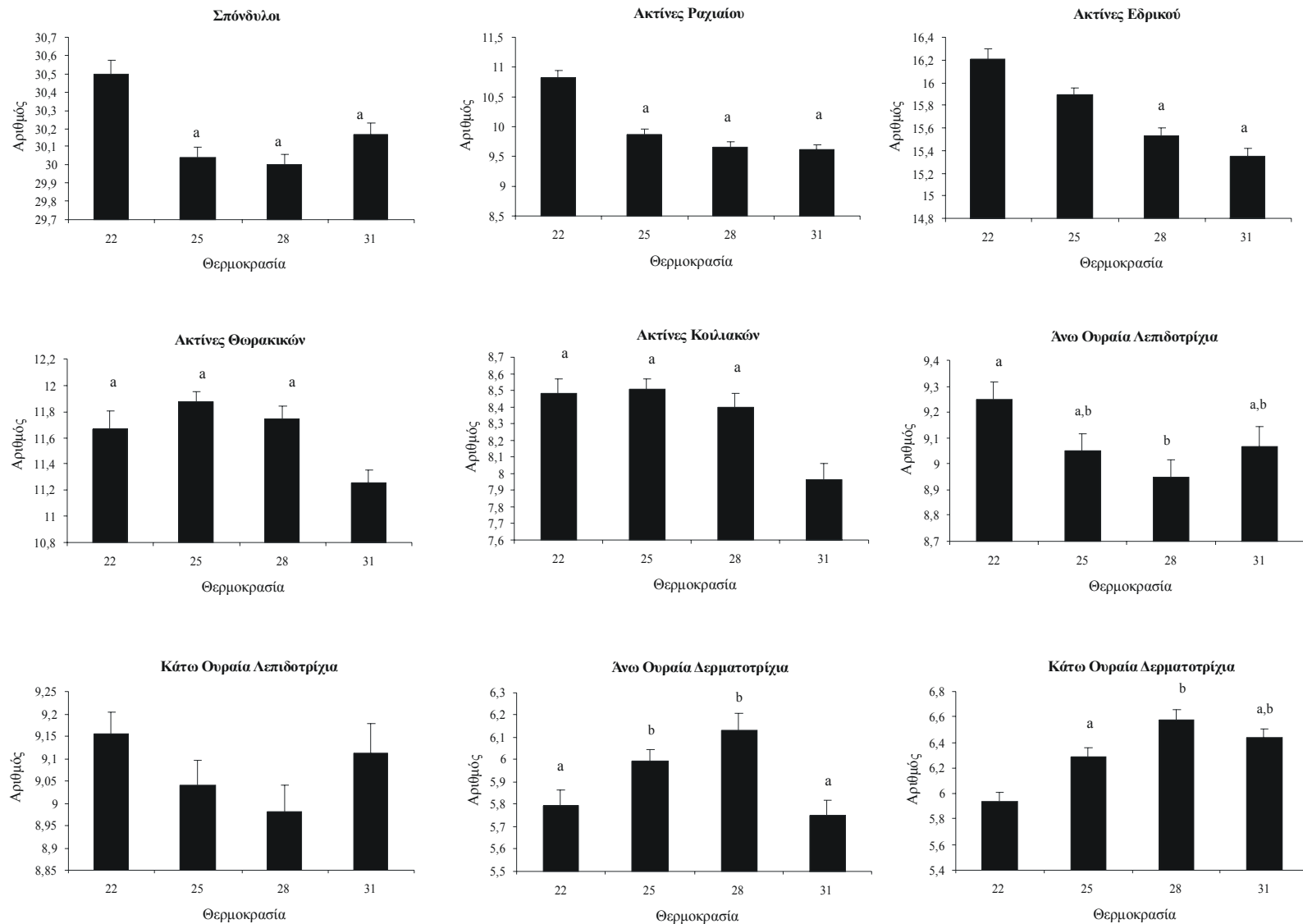
Πίνακας 2.8: Ολικό μήκος (mm) \pm S.D. όλων των δειγμάτων (n) που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη των μεριστικών.

$T^{\circ}C$	<i>TL</i>	<i>SD</i>	<i>min</i>	<i>max</i>	<i>n</i>
22	13,19	1,42	10,47	16,98	96
25	13,45	1,32	10,79	16,98	100
28	13,77	1,51	10,47	16,66	101
31	13,27	1,41	10,79	17,61	89

Πίνακας 2.9: Αριθμός (μέσος όρος, M.O.) μεριστικών χαρακτήρων των πληθυσμών που αναπτύχθηκαν στους 22, 25, 28 και 31 $^{\circ}C$.

<i>Χαρακτήρας</i>	$T^{\circ}C$	<i>M.O. \pm S.D.</i>	<i>Ελάχιστο</i>	<i>Μέγιστο</i>
Σπόνδυλοι	22	30,5 \pm 0,71	29	32
	25	30,04 \pm 0,57	29	31
	28	30 \pm 0,58	29	32
	31	30,17 \pm 0,59	29	31
Ραχιαίες ακτ.	22	10,83 \pm 1,03	9	14
	25	9,86 \pm 1,03	9	13
	28	9,66 \pm 0,84	9	13
	31	9,62 \pm 0,68	9	12
Εδρικές ακτ.	22	16,21 \pm 1,08	13	20
	25	15,89 \pm 0,75	14	18
	28	15,52 \pm 0,89	13	20
	31	15,35 \pm 0,77	14	18
Θωρακικές ακτ.	22	11,67 \pm 1,33	9	15
	25	11,88 \pm 0,71	10	14
	28	11,74 \pm 0,99	9	15
	31	11,26 \pm 0,89	9	14
Κοιλιακές ακτ.	22	8,47 \pm 0,73	6	9
	25	8,51 \pm 0,61	6	9
	28	8,4 \pm 0,79	6	10
	31	7,97 \pm 0,71	6	9
Άνω Ουρ. Λεπ.	22	9,25 \pm 0,63	8	11

	25	9,05 ± 0,66	8	11
	28	8,95 ± 0,64	8	10
	31	9,07 ± 0,70	7	10
Κάτω Ουρ. Λεπ.	22	9,16 ± 0,47	8	10
	25	9,04 ± 0,55	8	11
	28	8,98 ± 0,60	8	10
	31	9,11 ± 0,63	8	10
Άνω Ουρ. Δερμ.	22	5,79 ± 0,72	5	8
	25	5,99 ± 0,52	5	7
	28	6,13 ± 0,77	4	9
	31	5,75 ± 0,63	5	7
Κάτω Ουρ. Δερμ.	22	5,94 ± 0,68	5	8
	25	6,29 ± 0,69	5	8
	28	6,58 ± 0,77	5	8
	31	6,44 ± 0,66	5	8



Εικόνα 2.6: Αριθμός των μεριστικών στοιχείων (Μέσος ± S.E.) των zebrafish της μελέτης (n=89-101). Τα ίδια γράμματα (π.χ. a, b) υποδηλώνουν στατιστική ομοιότητα (Mann-Whitney U-test).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εξωτερική μορφολογία και ιδιαίτερα το σχήμα του σώματος των ψαριών έχει μελετηθεί εκτενώς από πολλούς ερευνητές σε πολλά διαφορετικά είδη ψαριών. Υπάρχουν πολυάριθμες μελέτες που περιγράφουν μορφολογικές διαφοροποιήσεις εκτρεφόμενων και φυσικών πληθυσμών και τους πιθανούς παράγοντες που προκαλούν αυτές τις διαφοροποιήσεις (Blaxter 1976, Divanach 1985, Matsuoka 1987, Wimberger 1992, Junquera & Perez-Gándaras 1993, Corti *et al.* 1996, Ellis *et al.* 1997, Mamuris *et al.* 1998, Tudela 1999, Hard *et al.* 2000, Pakkasmaa & Piironen 2001, Salini *et al.* 2003, Turan 2004, Turan *et al.* 2006). Παρόλα αυτά, υπάρχει έλλειψη μελετών που να εστιάζουν στην επίδραση της θερμοκρασίας στο σχήμα του σώματος και ειδικότερα σε άτομα που προκύπτουν από πειραματική εκτροφή. Εξαίρεση αποτελεί η εργασία των Georgakoroulou *et al.* (2007a), στην οποία κατεγράφη ότι το σχήμα του σώματος λαβρακιών που εκτράφηκαν στους 15°C ήταν πιο λεπτό από εκείνο των ίδιων ψαριών που εκτράφηκαν στους 20°C.

Στην παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε μια σαφής διαφοροποίηση στο σχήμα του σώματος ανάμεσα στις τέσσερις ομάδες που χρησιμοποιήθηκαν, υποδεικνύοντας έτσι την ισχυρή επίδραση της αναπτυξιακής θερμοκρασίας στο χαρακτήρα αυτό. Τα αποτελέσματα της DFA έδειξαν ότι οι αποστάσεις που διαδραμάτισαν τον πιο σημαντικό ρόλο ήταν οι d4-5, d12-13, d4-13, d7-8 and d5-6 (Πίν. 2.4). Είναι εμφανές λοιπόν ότι οι πιο ευμετάβλητοι μορφομετρικοί χαρακτήρες εντοπίστηκαν στο οπίσθιο μέρος του σώματος. Ανάμεσα τους, οι αποστάσεις d4-12 (ανάμεσα στα πρόσθια άκρα των βάσεων του ραχιαίου και του εδρικού πτερυγίου) και d4-5 (ανάμεσα στο πρόσθιο και το οπίσθιο άκρο της βάσης του ραχιαίου πτερυγίου) ήταν εκείνες που κύρια συνεισέφεραν στη διαφοροποίηση του σχήματος (Εικ. 2.5). Είναι επίσης σημαντικό να τονιστεί ότι η παρατηρούμενη διαφοροποίηση στο σχήμα του σώματος αυξήθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας, όπως φαίνεται και από τη μελέτη των αποστάσεων «Mahalanobis» (Πίν. 2.6)

Η ποικιλότητα που παρατηρείται στο σχήμα του σώματος των ιχθύων μπορεί να εξηγηθεί από τη γενικότερη μορφολογική πλαστικότητα που αυτοί παρουσιάζουν στα διαφορετικά περιβάλλοντα λόγω του διαφορετικού προτύπου ανάπτυξης των μυών και των οστών (Wimberger 1992, μηχανική – λειτουργική προσέγγιση). Επιπρόσθετα, οι φυσικοχημικές ιδιότητες του νερού (πυκνότητα, ιξώδες κ.α.) επηρεάζονται έντονα από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες και ιδιαίτερα τη θερμοκρασία. Έτσι, είναι πιθανό ότι οι διαφορετικές συνθήκες του μέσου στο οποίο τα ψάρια ζουν και κολυμπούν να απαιτούν και διαφορετικές κινητικές αντιδράσεις οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν στην παρατηρούμενη μορφολογική διαφοροποίηση κατά την αναπτυξιακή περίοδο. Με άλλα λόγια, όπως επισημαίνει ο Wimberger (1992), εάν η πλαστικότητα είναι αποτέλεσμα του “stress” και των διάφορων μηχανικών ερεθισμάτων, τότε η πλαστικότητα της συμπεριφοράς είναι αποτέλεσμα και της μορφολογικής πλαστικότητας. Επίσης, είναι γνωστό ότι το περιβάλλον επιδρά διαφορετικά στο ρυθμό αύξησης των διαφόρων τμημάτων και οργάνων του σώματος των ψαριών, μεταβάλλοντας με αυτόν τον τρόπο το σχετικό ρυθμό αύξησής τους (μεταβολική-αναπτυξιακή προσέγγιση (Seikai *et al.* 1986, Lindsey 1988, Murray & Beacham 1989, Κουμουνδούρος 1998).

Από την άλλη, είναι επίσης γνωστό ότι η θερμοκρασία επηρεάζει την ανάπτυξη των μυών (Johnston 1993, Nathanailides *et al.* 1995, Alami-Durante *et al.* 2000, Ayala *et al.* 2001, Wilkes *et al.* 2001, Johnston 2006, Koumoundouros *et al.* 2009a) με περαιτέρω πιθανές επιδράσεις στην εξωτερική μορφολογία (Johnston 2006, Koumoundouros *et al.* 2009a). Είναι επίσης γνωστό ότι η θερμοκρασία επιδρά στον αριθμό και τη διάμετρο των λεγόμενων «αργών» και «γρήγορων» μυϊκών ινών (Johnston 2006, Koumoundouros *et al.* 2009a). Επομένως, δεδομένου ότι ο τύπος κολύμβησης του zebrafish είναι ο «subca-rangiform» (Plaut & Gordon 1994) που επιτυγχάνεται με τη χρήση του πίσω μισού μέρους του σώματος του ψαριού (1/2 - 2/3 του συνολικού σωματικού μυϊκού ιστού) το οποίο είναι το πιο ευμετάβλητο (παρούσα μελέτη), προκύπτει ότι οι διαφορές στο σχήμα του σώματος προκαλούνται από διαφορές στην ποσότητα και/ή στο μέγεθος των μυϊκών ινών ή από τη σχετική κατανομή του μυϊκού ιστού των εκτρεφόμενων σε διαφορετικές θερμοκρασίες ψαριών.

Πολλές μελέτες στο παρελθόν έχουν συγκρίνει τους μεριστικούς χαρακτήρες σε πληθυσμούς του ίδιου είδους και έχουν καταλήξει σε διαφορές. Οι περισσότερες εξ' αυτών απλώς υποθέτουν ότι οι παρατηρούμενες διαφορές οφείλονται σε διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες των φυσικών ενδιαιτημάτων των πληθυσμών (Tudela 1999, O'Reilly & Horn 2004, Turan 2004, Turan *et al.* 2006) ενώ λίγες είναι εκείνες που συνδέουν άμεσα τη θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης με τη μεριστική διαφοροποίηση (Lindsey 1988, Blaxter 1992, Murray & Beacham 1989, Georgakopoulou *et al.* 2007a).

Στην παρούσα μελέτη, αποδείχθηκε ότι η θερμοκρασία που επικρατεί κατά την οντογένεση του zebrafish έχει έντονη επίδραση στον τελικό αριθμό των μεριστικών του στοιχείων. Στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των μεριστικών των ακραίων θερμοκρασιών (22 και/ή 31°C) σε σχέση με τις υπόλοιπες. Ο αριθμός των σπονδύλων και των ακτίνων του ραχιαίου πτερυγίου διαφοροποιήθηκαν στατιστικά στους 22°C. Στις ακτίνες των θωρακικών και κοιλιακών πτερυγίων, τα ψάρια των 31°C διαφοροποιήθηκαν από τα υπόλοιπα ενώ στις ακτίνες του εδρικού, η διαφοροποίηση εντοπίστηκε μεταξύ των χαμηλών (22 και 25°C) και των υψηλών (28 και 31°C) θερμοκρασιών. Εξαίρεση αποτέλεσαν οι ακτίνες του ουραίου πτερυγίου (λεπιδοτρίχια και δερματοτρίχια) όπου δεν παρατηρήθηκε κάποια συγκεκριμένη τάση.

Το zebrafish φαίνεται να είναι ένα εξαιρετικά ποικιλόμορφο είδος (σε σχέση με το φαινότυπο του). Οι Ferreri *et al.* (2000) μελέτησαν τα μεριστικά στοιχεία σε φυσικούς και εκτρεφόμενους (σε μία συνθήκη όμως) πληθυσμούς zebrafish και διαπίστωσαν ότι σε πολλές από τις μελετημένες ανατομικές περιοχές, οι φυσικοί πληθυσμοί επέδειξαν μεγαλύτερη ποικιλότητα από ότι οι εκτρεφόμενοι. Τα εκτρεφόμενα δείγματα της συγκεκριμένης μελέτης αναπτύχθηκαν σε μία σταθερή θερμοκρασία εργαστηρίου, σε αντίθεση βεβαίως με τα άγρια, και αυτό το γεγονός από μόνο του μπορεί να εξηγήσει τη διαφορετική ποικιλότητα που παρουσίασαν κάποια μεριστικά στοιχεία.

Συγκρίνοντας τα τωρινά δεδομένα με αυτά παλαιότερων εργασιών στο zebrafish (Axelrod & Shultz 1955, Dentry & Lindsey 1978, Ferreri *et al.* 2000, Bird & Mabee 2003), διαπιστώνεται ότι αφενός βρίσκονται σε συμφωνία όσον αφορά στους αριθμούς και αφετέρου ότι τα μεριστικά της παρούσας εργασίας είναι αρκετά πιο ποικίλα από αυτά

των άλλων εργασιών (με την εξαίρεση ίσως των άγριων από την εργασία των Ferreri *et al.* 2000).

Αυτό που είναι γενικότερα γνωστό είναι ότι το αναπτυσσόμενο σε χαμηλότερες θερμοκρασίες νερού ψάρι εμφανίζει υψηλότερο αριθμό μεριστικών στοιχείων από εκείνο που αναπτύσσεται σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Murray & Beacham 1989). Αυτό έρχεται σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη, όπου με την εξαίρεση των ακτίνων του ουραίου πτερυγίου, όλες οι άλλες μεριστικές ομάδες που εξετάστηκαν παρουσίασαν είτε μεγαλύτερους αριθμούς σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (σπόνδυλοι, ακτίνες ραχιαίου και εδρικού πτερυγίου) ή μικρότερους αριθμούς σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες (ακτίνες θωρακικών και κοιλιακών πτερυγίων). Οι ακτίνες του ουραίου πτερυγίου (άνω και κάτω λεπιδοτρίχια και δερματοτρίχια) δεν παρουσίασαν κάποια συγκεκριμένη τάση και σε κάποιες περιπτώσεις δεν παρουσίασαν ούτε καν διαφοροποίηση ανάμεσα στις θερμοκρασίες. Εξαίρεση αποτελούν τα κάτω ουραία δερματοτρίχια που εμφανίστηκαν σε στατιστικά υψηλότερους αριθμούς στις χαμηλές θερμοκρασίες του πειράματος.

Έχει καταδειχθεί στο παρελθόν ότι ο αριθμός των μεριστικών στοιχείων υποβάλλεται συνεχώς σε περιβαλλοντικές επιδράσεις από τη γονιμοποίηση μέχρι και τον πλήρη σχηματισμό τους (Lindsey 1988) ή απλά μόνο κατά τη διάρκεια της νυμφικής περιόδου (Taning 1952, Fowler 1970). Οι Georgakopoulou *et al.* (2007a) έδειξαν πρόσφατα στο λαβράκι ότι η επίδραση της θερμοκρασίας από το στάδιο της 50% επιβολής (half-epiboly stage) μέχρι τη μεταμόρφωση είναι αρκετή ώστε να προκαλέσει μόνιμες αλλαγές στον τελικό αριθμό των ακτίνων πολλών πτερυγίων. Τα παραπάνω συμφωνούν απόλυτα με τα παρόντα ευρήματα καθώς όπως αποδείχθηκε, η επίδραση της θερμοκρασίας από το στάδιο του αυγού μέχρι και τη μεταμόρφωση έχει δραματική επίδραση στον τελικό αριθμό των μεριστικών.

Όσον αφορά στον αριθμό των κέντρων των σπονδύλων, που αποτελούν διαφορετική περίπτωση από τις ακτίνες των πτερυγίων, οι Lindsey & Ali σε μια παλιά εργασία (1965) πρότειναν ότι ο τελικός τους αριθμός μπορεί να τροποποιηθεί μόνο κατά τη διάρκεια της πρώιμης εμβρυογένεσης. Σε μια επίσης παλιά μελέτη των Dentry & Lindsey (1978) στο zebrafish, αναφέρθηκε ότι σε κάποιες περιπτώσεις οι αριθμοί των σπονδύλων ψαριών που εκτράφηκαν στην ίδια θερμοκρασία νερού επηρεάστηκε από τις

θερμοκρασιακές συνθήκες στις οποίες βρίσκονταν οι γεννήτορες πριν και κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης. Στην παρούσα εργασία, όλα τα άτομα που έχουν χρησιμοποιηθεί ως γεννήτορες, διατηρούνταν καθ'όλη τη διάρκεια της ζωής τους (από το αυγό μέχρι και τη δική τους ωοτοκία) στην ίδια και σταθερή θερμοκρασία των 28°C.

Η παρούσα εργασία έδειξε ξεκάθαρα ότι ο αριθμός των σπονδύλων επηρεάζεται από τη θερμοκρασία όταν αυτή εφαρμόζεται κατά τη διάρκεια του εμβρυικού και των νυμφικών σταδίων, θα ήταν όμως εξαιρετικά ενδιαφέρον να γίνει προσπάθεια να απομονωθεί το ακριβές οντογενετικό παράθυρο όπου η θερμοκρασία επιδρά όχι μόνο στους σπονδύλους, αλλά και στα υπόλοιπα μεριστικά στοιχεία καθώς και στο σχήμα του σώματος. Για να γίνει αυτό, απαιτείται η διενέργεια ενός πειράματος, κατά προτίμηση με το ίδιο θερμοκρασιακό εύρος με το παρόν πείραμα αλλά με στοχευόμενη σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια εφαρμογή διαφορετικών θερμοκρασιών σε διάφορους συνδυασμούς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΗ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΦΥΛΟΥ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΖΕ- BRA FISH

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε αντίθεση με τα ανώτερα σπονδυλωτά, όπου ο γονοχωρισμός και η ισχυρή γενετική «καθοδήγηση» όσον αφορά τη διαφοροποίηση του φύλου είναι ο κανόνας, τα ψάρια περιλαμβάνουν είδη που αναπαράγονται με γονοχωριστικούς, ερμαφροδιτικούς (διαδοχικούς ή σύγχρονους) και παρθενογενετικούς μηχανισμούς (Yamamoto 1969 Strüssmann & Nakamura 2002). Ακόμη όμως και στα γονοχωριστικά είδη, η τελική μοίρα των αναπτυσσόμενων γονάδων μπορεί να καθοριστεί από μια ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ γενετικών και περιβαλλοντικών (φυσικών, χημικών ή κοινωνικών) παραγόντων με τρόπο τέτοιο ώστε συχνά το φαινοτυπικό φύλο δε συνάδει με το γενοτυπικό (Baroiller *et al.* 1999, Strüssmann & Nakamura 2002). Αποτέλεσμα των παραπάνω, αποτελεί το ότι δεν υπάρχει σήμερα ένα απλό ενιαίο μοντέλο που να εξηγεί τη γενετική βάση του φυλοκαθορισμού στα ψάρια (Barroiler *et al.* 1999, Devlin & Nagahama 2002).

Από όλους τους περιβαλλοντικούς παράγοντες που έχουν μελετηθεί έως σήμερα (π.χ. θερμοκρασία, ιχθυοφόρτιση, pH, κ.τ.λ.), η θερμοκρασία φαίνεται να είναι ο πιο καθοριστικός για το φύλο (Barroiler *et al.* 1999), σε μια διαδικασία που ονομάζεται θερμοεξαρτώμενος φυλοκαθορισμός (temperature sex determination, TSD). Η διαφοροποίηση του φύλου στα ψάρια ρυθμίζεται από στεροειδείς ορμόνες (sex steroid hormones) οι οποίες με τη σειρά τους ρυθμίζονται από διάφορα γονίδια που ελέγχουν ένζυμα παραγωγής στεροειδών (steroidogenic enzymes, Baroiller *et al.* 1999). Η παρουσία του TSD –τουλάχιστον στην πλειοψηφία των μελετημένων ειδών- οφείλεται στην απορύθμιση/διακοπή της στεροειδογένεσης κατά την αρχή του γοναδικού σχηματισμού μέσω του ελέγχου της έκφρασης του γονιδίου της αρωματάσης (Strüssmann & Nakamura 2002, Godwin *et al.* 2003). Παρόλα αυτά, σχετικά συχνά, έχει αποδοθεί σε πολλά είδη ψαριών ύπαρξη του φαινομένου του TSD ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι συγκεκριμένων αποδείξεων όπως για παράδειγμα την παρουσία χρωμοσωμάτων του φύλου. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, η ταυτοποιημένη ύπαρξη φυλετικών

χρωμοσωμάτων σε ένα οργανισμό, αποτελεί χαρακτηριστικό γνώρισμα στις περιπτώσεις του γενοτυπικού φυλοκαθορισμού (genotypic sex determination, GSD) και όχι του θερμοκρασιακού (Devlin & Nagahama 2002, Ospina-Alvarez & Piferrer 2008).

Το TSD στα ψάρια, πρωτοπαρουσιάστηκε στο Atlantic silverside (*Menidia menidia*), όπου οι υψηλές ή οι χαμηλές θερμοκρασίες έδειξαν να οδηγούν σε female- or male-biased πληθυσμούς, αντίστοιχα (Conover & Kynard 1981). Από τότε, το TSD έχει αναφερθεί σε πολλά είδη ψαριών με μεγάλη ποικιλία ως προς τον τρόπο που το επηρεάζει η θερμοκρασία (Barroiler *et al.* 1999, Devlin & Nagahama 2002, Strüssmann & Nakamura 2002, Godwin *et al.* 2003, Ospina-Alvarez & Piferrer 2008).

Το zebrafish, που αποτελεί τον υπό μελέτη οργανισμό της παρούσας διατριβής, θεωρείται οργανισμός-μοντέλο για όλα τα είδη της έρευνας και χρησιμοποιείται ευρύτατα από πλήθος εργαστηρίων σε όλο τον πλανήτη (Lawrence 2007). Παραδόξως όμως, η επίδραση του περιβάλλοντος και ειδικότερα της θερμοκρασίας στην οντογένεση αυτού του είδους δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, ενώ πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας στη διαφοροποίηση του φύλου (Uchida *et al.* 2004, Ospina-Alvarez & Piferrer 2008).

Το zebrafish είναι ένα αδιαφοροποίητο γονοχωριστικό είδος το οποίο εμφανίζει νεανικό ερμαφροδιτισμό. Στις 10-12 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση (dpf), οι γονάδες όλων των ατόμων ανεξάρτητα από την γενετική προδιάθεση αρχίζουν να διαφοροποιούνται σε ωοθήκες. Οι ωοθήκες συνεχίζουν να αναπτύσσονται μέχρι και τις 23-25 dpf, μετά από τις οποίες αρχίζει η οριστική διαφοροποίηση του φύλου. Η ανάπτυξη των ωοθηκών συνεχίζεται στα θηλυκά, ενώ στα αρσενικά πραγματοποιείται εκφυλισμός των ωοθηκών παράλληλα με την ανάπτυξη των όρχεων (Takahashi 1977). Οι περισσότεροι ερευνητές υποστηρίζουν ότι η διαφοροποίηση του φύλου (ή αλλιώς η αναστροφή του φύλου) ολοκληρώνεται περίπου στις 30-35 dpf (Takahashi 1977) όμως, πρόσφατα βρέθηκαν άτομα zebrafish με αναπτυσσόμενες αρσενικές γονάδες ακόμα και στις 49 dpf (Maack & Segner 2003). Η τελική ωρίμανση των γονάδων επιτυγχάνεται την 60η dpf ενώ η πρώτη ωοτοκία λαμβάνει χώρα περίπου την 75η dpf. Είναι σημαντικό να τονιστεί ότι οι παραπάνω τιμές ανταποκρίνονται μόνο σε άτομα του είδους τα οποία μεγαλώνουν σε θερμοκρασία 28°C. Επειδή όμως πρόκειται για χαρακτηριστικά που

επιρεάζονται πάρα πολύ από τη θερμοκρασία της ανάπτυξης, είναι λογικό να παρατηρείται κάποια επιβράδυνση ή επιτάχυνση αυτών των διεργασιών ανάλογα με την επικρατούσα κάθε φορά θερμοκρασία.

Στόχος της παρούσας εργασίας, ήταν η διευκρίνιση τυχόν επίδρασης της θερμοκρασίας κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής του zebrafish στη διαμόρφωση του φύλου του.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δειγματοληψία

Η εκτροφή τερματίστηκε μετά τη μεταμόρφωση στις 94-107 ημέρες μετά την εκκόλαψη (dph), όπου τα ψάρια είχαν μέσο ολικό μήκος (TL) of 29.2 ± 2.6 – 34.0 ± 2.3 mm ανάλογα με τη θερμοκρασία εκτροφής (από 31°C έως 22°C). Από κάθε επανάληψη του πειράματος συλλέχθηκαν τυχαία 25 άτομα, τα οποία αναισθητοποιήθηκαν (ethylenglycol-monophenylether, Merck, 0.2-0.5 ml l⁻¹), φωτογραφήθηκαν ατομικά με ψηφιακή μηχανή (Olympus C-5050) και συντηρήθηκαν σε διάλυμα φορμαλδεΰδης-γλουταραλδεΰδης (4% formaldehyde: 1% gluteraldehyde, McDowell and Trump, 1976).

Ιστολογία Γονάδων

Αρχικά, σε κάθε δείγμα, κοβόταν και αφαιρούνταν το κεφάλι και η ουρά και έπειτα οι κοιλότητες του σώματος αφυδατώνονταν σε σειρά αιθανόλης 70–95%. Για τον εγκλεισμό στη ρητίνη (glycol methacrylate resin, Technovit 7100, Heraeus Kulzer, GmbH, Γερμανία), το σώμα του ψαριού κοβόταν στη μέση, κατά μήκος του επιμήκη άξονα και τα δύο κομμάτια τοποθετούνταν στο ίδιο κελί ώστε για το ένα οι τομές να ακολουθούν πρόσθια και για το άλλο οπίσθια πορεία. Οι σειριακές τομές πραγματοποιούνταν σε πάχος 3–5 mm σε μικροτόμο (Biocut 2035, Reichert Jung, Γερμανία) χρησιμοποιώντας αναλώσιμες λεπίδες. Μετά το στέγνωμα, οι αντικειμενοφόροι με τις τομές επεξεργάζονταν με χρωστική (methylene blue/azure II/basic fuchsin, Bennett *et al.*, 1976) και εξετάζονταν σε μικροσκόπιο φωτός (Olympus BX 40) για την παρουσία ωοθηκών ή όρχεων.

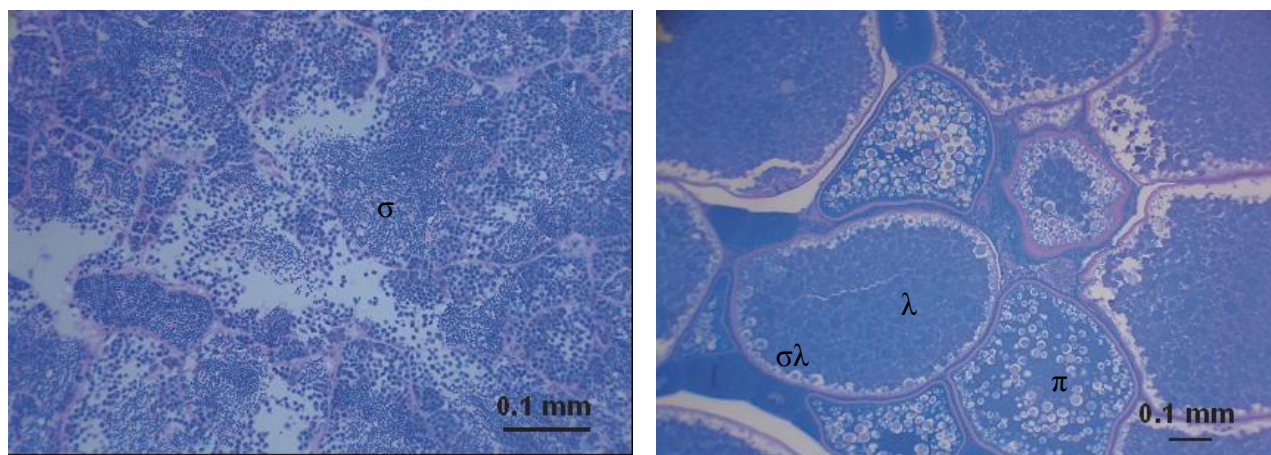
Στατιστική ανάλυση

Για τη σύγκριση των ποσοστών επιβίωσης, της αναλογίας του φύλου μεταξύ των πληθυσμών και της αναλογία φύλου κάθε συνθήκης με το θεωρητικό 1:1, χρησιμοποιήθηκε το G-test (Sokal & Rohlf 1995). Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 95%.

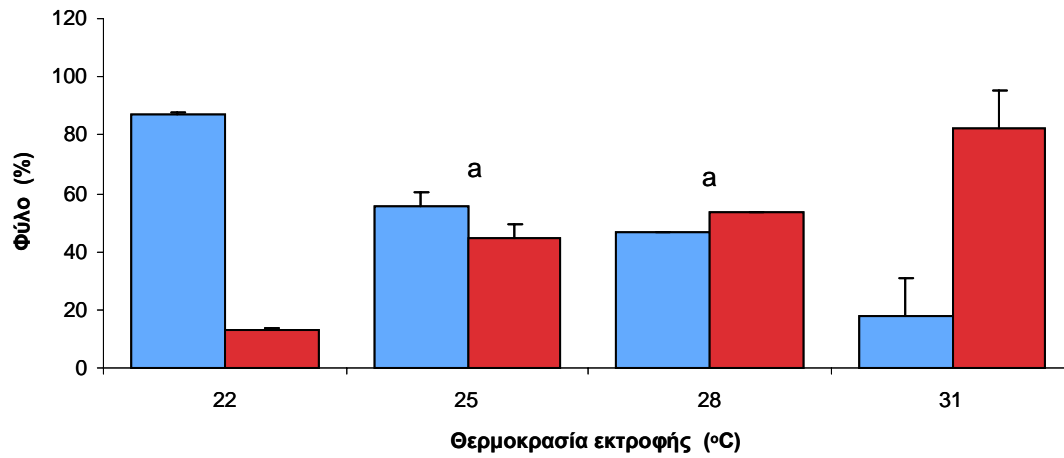
Η ιστολογική ανάλυση των γονάδων πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών από την κα. Μαρία Παπαδάκη.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Οι ρυθμοί επιβίωσης μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών δε διέφεραν στατιστικά (88-92%, $p>0,05$). Η ιστολογική ανάλυση των γονάδων (Εικ. 4.1) αποκάλυψε ότι οι χαμηλότερες θερμοκρασίες οδηγούν σε αρρενοποίηση του πληθυσμού ενώ οι υψηλές σε κυριαρχία των θηλυκών (Εικ. 4.2). Οι πληθυσμοί που εκτράφηκαν στους 22 και 31°C διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους αλλά και συγκρινόμενοι με τη θεωρητική αναλογία φύλου 1:1 ($p<0.01$).



Εικόνα 4.1: Φωτογραφίες ιστολογικών τομών γονάδων zebrafish. Στα αριστερά διακρίνεται μια ώριμη γονάδα αρσενικού ατόμου γεμάτη με σπερματοζώαρια (σ) και στα δεξιά μια ώριμη γονάδα θηλυκού ατόμου στη φάση της λεκιθογένεσης, όπου τα ωοκύτταρα περιέχουν τόσο λέκιθο (λ) όσο και σταγόνες λιπιδίων (σλ) και ο πυρήνας (π) είναι κεντρικά τοποθετημένος.



Εικόνα 4.2: Ποσοστό αρσενικών (μπλε χρώμα) και θηλυκών (κόκκινο χρώμα) ατόμων zebrafish σε πληθυσμούς ($n = 2$) που εκτράφηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν μέσο όρο \pm τυπική απόκλιση (S.D.). Το γράμμα "a" υποδεικνύει τις αναλογίες φύλου που δε διέφεραν στατιστικά σημαντικά από την αναλογία 1:1 (G-statistic; $p > 0.05$).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μεταβολή της αναλογίας του φύλου του zebrafish σε αυτή τη μελέτη από επικράτηση των αρσενικών σε επικράτηση των θηλυκών καθώς η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 22 στους 31°C δείχνει ότι ακόμη σε ένα είδος, το TSD έχει ισχυρή παρουσία. Η ύπαρξη TSD στο zebrafish, αν και αποδεικνύεται μέσω των παρόντων πειραμάτων, αμφισβητείται τελευταία κυρίως επειδή μια σειρά από πρόσφατες επιστημονικές δημοσιεύσεις υποστηρίζει ότι η παρουσία του TSD σε ένα είδος πρέπει να συνοδεύεται από συγκεκριμένες αποδείξεις. Έτσι, οι Ospina-Alvarez & Piferrer (2008), χρησιμοποιώντας μια μικρή τροποποίηση των κριτηρίων των Valenzuela *et al.* (2003) και του Conover (2004) προτείνουν ότι για να ισχύει το φαινόμενο του TSD σε ένα είδος ψαριού, πρέπει να πληρούνται οι δύο παρακάτω συνθήκες:

- i) Να απουσιάζουν τα φυλετικά χρωμοσώματα, και
- ii) οι αλλαγές της αναλογίας του φύλου (λόγω θερμοκρασίας) να λαμβάνουν χώρα μέσα στο εύρος των θερμοκρασιών ανάπτυξης του είδους (range of developmental temperatures, RTD) το οποίο περιλαμβάνει τη θερμοευαίσθητη περίοδο και όχι μέσα στο εύρος της φυσικής θερμοκρασίας (range of natural temperature, RNT) όπου το είδος συνήθως διαβιεί (και κατά κανόνα είναι πολύ ευρύτερο).

Αν και τα φυλετικά χρωμοσώματα στο zebrafish δεν έχουν ακόμη αναγνωριστεί (Chiang *et al.* 2001, Wang *et al.* 2007), οι Uchida *et al.* (2002) σε μελέτη τους σχετικά με το κληρονομικό πρότυπο γενετικά θηλυκών ατόμων zebrafish, υποστηρίζουν ότι το γενετικό φύλο του είδους καθορίζεται από XY χρωμοσώματα. Εάν ισχύει αυτό, και σύμφωνα πάντα με τη θεωρία των Ospina-Alvarez & Piferrer (2008) τότε μάλλον ο φυλοκαθοριστικός μηχανισμός στο zebrafish δεν είναι θερμοκρασιακά (TSD) αλλά γενοτυπικά εξαρτώμενος (GSD). Σύμφωνα με αυτήν τη θεωρία, οι αλλαγές στην αναλογία του φύλου που παρατηρήθηκαν στην παρούσα εργασία λόγω μεταβολής της θερμοκρασίας θα μπορούσαν να οφείλονται ακριβώς στην επίδραση της θερμοκρασίας στο GSD, ένα φαινόμενο που οι συγκεκριμένοι συγγραφείς αναφέρουν ως «GSD+TE» (Temperature Effects). Παρόλα αυτά όμως, εκείνο που προκύπτει από την παρούσα

εργασία και είναι πραγματικά σημαντικό είναι ότι με τον ένα ή τον άλλο τρόπο, η θερμοκρασία ανάπτυξης επιφέρει αδιαμφισβήτητες αλλαγές στην αναλογία του φύλου των πληθυσμών zebrafish.

Είναι ενδιαφέρον να τονιστεί ότι όσον αφορά στο δεύτερο κριτήριο, υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις σχετικά με τον ορισμό του RTD στο zebrafish. Οι Ospina-Alvarez & Piferrer (2008) αναφέρονται στην εργασία των Froese & Pauly (2008) που τοποθετούν το RTD στο zebrafish ανάμεσα στους 26 και 29°C. Από την άλλη, πρόσφατες μελέτες (Engeszer *et al.* 2007, Spence *et al.* 2008) υποστηρίζουν ότι το RTD στο zebrafish τοποθετείται σε πιο υψηλές θερμοκρασίες και μπορεί να κυμαίνεται από τους 27°C έως και τους 34°C. Εάν ισχύει αυτό, τότε τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας δείχνουν ότι όντως υπάρχει μεταβολή στην αναλογία του φύλου μέσα στο RTD (από 50% αρσενικά στους 28°C σε σχεδόν 17% στους 31°C), γεγονός που αν συνδυαστεί με την απουσία φυλετικών χρωμοσωμάτων, υποδεικνύει ύπαρξη του TSD ακόμη και με τα κριτήρια των Ospina-Alvarez & Piferrer (2008).

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση του φύλου στο zebrafish έχει μελετηθεί στο παρελθόν από τους Uchida *et al.* (2004). Οι εν λόγω ερευνητές χρησιμοποίησαν γενετικά θηλυκά άτομα (genetic all-females), τα οποία αφού μεγάλωσαν στις θερμοκρασίες των 28.5, 35 and 37°C (για 15 και 25 ημέρες μετά την εκκόλαψη), τα εξέτασαν ως προς το φύλο. Διαπίστωσαν ότι η γοναδική αρρενοποίηση που συντελέστηκε ήταν αντίστοιχα 0, 68.8 και 100%, δεδομένα που φαίνεται ότι έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Όταν όμως οι ίδιοι συγγραφείς εξέθρεψαν άγριου τύπου άτομα zebrafish στις ίδιες θερμοκρασίες με τις προηγούμενες, δεν παρατήρησαν καμία αλλαγή στην αναλογία του φύλου των διαφόρων πληθυσμών (D. Uchida unpublished in Uchida *et al.* 2004). Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι, όπως δηλώνουν οι ίδιοι, ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποίησαν για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων τους ήταν 16 άτομα στους 28,5°C, 15 άτομα στους 35°C και μόλις 5 άτομα στους 37°C για την μελέτη των γενετικά θηλυκών, ενώ δεν ανέφεραν τίποτα για τα άγριου τύπου άτομα. Έτσι, οι ακραίες αυτές θερμοκρασίες (35 και 37°C) που χρησιμοποίησαν οι εν λόγω ερευνητές φαίνεται ότι επιδρούν στην αναλογία του φύλου

μόνο όταν εφαρμόζονται σε γενετικά θηλυκά άτομα zebrafish και δεν έχουν καμία επίδραση στα άγριου τύπου.

Ένα επιπλέον δεδομένο που πρέπει να συνεκτιμηθεί για τον διαχωρισμό των αποτελεσμάτων των Uchida *et al.* (2004) από αυτών της παρούσας μελέτης είναι ότι οι θερμοκρασίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την επιτυχή εκτροφή ατόμων zebrafish δεν πρέπει να υπερβαίνουν τους 34°C (Schirone & Gross 1968). Μια άλλη ειδοποιός διαφορά μεταξύ των δύο μελετών είναι το γεγονός ότι οι Uchida *et al.* (2004) χρησιμοποίησαν «χρονικά παράθυρα» (time windows) προκειμένου να εφαρμόσουν τις διαφορετικές θερμοκρασίες. Οι Shang *et al.* (2006) προτείνουν ότι η θερμο-ευαίσθητη περίοδος για τον φυλοκαθορισμό στο zebrafish είναι μεταξύ της 10^{ης} και της 42^{ης} ημέρας μετά την εκκόλαψη (dph). Είναι πιθανό λοιπόν το αναπτυξιακό παράθυρο που χρησιμοποίησαν οι Uchida *et al.* (2004) (15^η με 25^η dph) να μην περιελάμβανε ολόκληρη τη θερμο-ευαίσθητη περίοδο του συγκεκριμένου είδους και ως εκ τούτου τα συμπεράσματά τους δεν μπορούν να γενικευθούν. Τέλος, πρέπει να τονιστεί ότι ανάμεσα στα πρότυπα του φυλοκαθορισμού σε σχέση με τη θερμοκρασία που προτείνουν οι Ospina-Alvarez & Piferrer (2008), το zebrafish – όπως προκύπτει από την παρούσα εργασία- ανήκει στο δεύτερο πρότυπο (οι χαμηλές θερμοκρασίες προκαλούν την κυριαρχία των αρσενικών ενώ οι υψηλές αντίστοιχα των θηλυκών) και γίνεται έτσι το πρώτο είδος ψαριού από τα μελετηθέντα μέχρι σήμερα που ανήκει σε αυτήν την κατηγορία.

Η επίδραση της αφθονίας της τροφής και επομένως του ρυθμού ανάπτυξης στη διαφοροποίηση του φύλου στο zebrafish αποτέλεσε αντικείμενο έρευνας από τους Lawrence *et al.* (2008). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα άτομα με τους μεγαλύτερους ρυθμούς ανάπτυξης είχαν περισσότερες πιθανότητες να γίνουν θηλυκά από ότι τα αδέρφια τους που ταΐζονταν λιγότερο και επομένως παρουσίαζαν αισθητά χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης. Το τελευταίο έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καθώς οι υψηλές αναπτυξιακές θερμοκρασίες στο zebrafish (μέσα στο προτεινόμενο εύρος για φυσιολογική εκτροφή (Schirone & Gross 1968, Matthews *et al.* 2002)) οδηγούν σε υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης (προσωπικά αδημοσίευτα αποτελέσματα, Lawrence 2007). Έχει επίσης προταθεί ότι ο κύριος περιβαλλοντικός

παράγοντας για τη διαφοροποίηση του φύλου στο zebrafish είναι ο ρυθμός ανάπτυξης και ότι αυτός ευθύνεται για κάθε περίπτωση φυλετικής διαφοροποίησης που περιλαμβάνει φυλο-ειδικές διαφορές στους ρυθμούς ανάπτυξης (Lawrence *et al.* 2008). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν δημοσιευτεί και για άλλα είδη ψαριών (Pavlidis *et al.* 2000, Koumoundouros *et al.* 2002a).

Μελετώντας τα πρότυπα του TSD στα ερπετά, ο Pieau (1996) έκανε την υπόθεση ότι υπάρχει μια συγκεκριμένη θερμοκρασία η οποία αναφέρεται ως «pivotal temperature», όπου η αναλογία του φύλου των εκεί παραγόμενων πληθυσμών διατηρείται στο 50:50. Καθώς το zebrafish είναι μεταξύ των οργανισμών που παρουσιάζουν αντίστροφη αναλογία φύλου ανάμεσα σε υψηλές και χαμηλές θερμοκρασίες και βασιζόμενοι στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, υποθέτουμε ότι η «pivotal» θερμοκρασία στο είδος αυτό βρίσκεται κάπου μεταξύ των 25 και 28°C. Παρομοίως, σε προηγούμενες μελέτες στο pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) (Strüssmann *et al.* 1996, 1997), βρέθηκε ότι το ποσοστό των θηλυκών ατόμων στον πληθυσμό μειωνόταν από 100% στους 19°C σε 0% στους 29°C ενώ οι κεντρικά ενδιάμεσες θερμοκρασίες παρήγαγαν πληθυσμούς με το ίδιο ποσοστό μεταξύ των δύο φύλων. Στο zebrafish, φαίνεται επίσης να υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ της αναλογίας του φύλου και της θερμοκρασίας εκτροφής αν και στην προκειμένη περίπτωση η σχέση αυτή είναι αντίθετη με ότι συμβαίνει στο pejerrey. Αυτό μπορεί να σημαίνει ότι εάν στην παρούσα εργασία είχε μελετηθεί ένα ευρύτερο θερμοκρασιακό φάσμα, θα μπορούσαν επίσης να είχαν παραχθεί μονοφυλετικοί πληθυσμοί στα δύο άκρα του. Η εφαρμογή της ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης στα αποτελέσματα του zebrafish δείχνει ότι το θεωρητικό απόλυτο (100%) και μηδενικό (0%) ποσοστό αρσενικών ατόμων στον πληθυσμό μπορεί να επιτευχθεί στους 20 και στους 34°C, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να αποτελέσουν εργαλείο για πολλούς ερευνητές που χρησιμοποιούν το zebrafish ως μοντέλο (Key & Devine 2003), καθώς επιτρέπουν την παραγωγή ή την αποφυγή πληθυσμών συγκεκριμένης φυλετικής κυριαρχίας, χωρίς τη χρήση στεροειδών ορμονών οι παρενέργειες των οποίων ίσως θέτουν σε κίνδυνο τα προσδοκώμενα αποτελέσματα.

Είναι γνωστό ότι ο περιβαλλοντικός καθορισμός του φύλου μπορεί να έχει μεγάλη προσαρμοστική σημασία για τους φυσικούς πληθυσμούς (Godwin *et al.* 2003). Τα άτομα, μεγαλώνοντας σε έναν πληθυσμό, θα διαλέξουν το φύλο τους με βάση τις δυνατότητες για καλύτερη ανάπτυξη που προσφέρει το εκάστοτε περιβάλλον (Charnov & Bull 1977). Δηλαδή, θα επιλέξουν τελικά να διαφοροποιηθούν σε εκείνο το φύλο που θα τους επιτρέψει να προσαρμοστούν καλύτερα στο περιβάλλον τους και επομένως να ολοκληρώσουν τη μεταφορά των γονιδίων τους με τη μέγιστη επιτυχία (Charnov & Bull 1977). Το zebrafish, που επιδεικνύει τόσο ευμετάβλητο θερμο-εξαρτώμενο φυλοκαθορισμό, θα μπορούσε κατά συνέπεια να ανταποκριθεί επιτυχώς σε πολλά διαφορετικά περιβάλλοντα.

Από την άλλη, θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι η κρίσιμη αναλογία φύλου για τη καλύτερη επιτυχή διαίωσιση ενός είδους είναι εκείνη που ήδη επικρατεί στη θερμοκρασία του φυσικού οικοσυστήματος του είδους. Πιθανές κλιματικές αλλαγές λόγω της παγκόσμιας αύξησης της θερμοκρασίας, θα οδηγήσουν την καθιερωμένη αναλογία φύλου των φυσικών πληθυσμών σε απόκλιση και έτσι θα θέσουν σε κίνδυνο την αναπαραγωγική επιτυχία των επόμενων γενεών, άρα την επιβίωση του είδους. Κάτι τέτοιο όμως δεν πρόκειται να συμβεί στο zebrafish, καθώς οι υψηλότερες θερμοκρασίες θα οδηγήσουν σε πληθυσμιακή κυριαρχία των θηλυκών, η έλλειψη των οποίων σύμφωνα με τον Westerfield (1995) αποτελεί τον πρωταρχικό περιοριστικό παράγοντα για την αναπαραγωγική απόδοση ενός πληθυσμού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΗΝ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΚΟΛΥΜΒΗΣΗΣ ΙΧΘΥΔΙΩΝ ZEBRAFISH

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κολυμβητική ικανότητα

Η κολυμβητική ικανότητα ενός ψαριού αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό για την επιβίωση του (Jones *et al.* 1974), καθώς η μέγιστη τιμή της μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την απόκτηση τροφής, την εύρεση ταιριού, την αποφυγή δυσμενών καταστάσεων και άλλα (Drücker 1996). Οι Reidy *et al.* (2000) υποστηρίζουν ότι η ικανότητα κίνησης (δηλαδή η κολυμβητική ικανότητα για τα ψάρια) αποτελεί χαρακτηριστικό που επηρεάζει άμεσα τη «Δαρβινική προσαρμογή» (Darwinian fitness). Γι' αυτό, το πόσο γρήγορα μπορεί να κολυμπήσει ένα ψάρι και για πόση ώρα μπορεί να διατηρήσει την ταχύτητά του, έχουν αποτελέσει αντικείμενο επισταμένης μελέτης και έρευνας (Hammer 1995).

Στην περίπτωση του zebrafish, υπάρχουν ορισμένες μελέτες που έχουν ασχοληθεί με την κολυμβητική ικανότητα των νυμφικών σταδίων (π.χ. Budick & O'Malley 2000, Levin *et al.* 2004) και πολύ λίγες δημοσιευμένες εργασίες που αναφέρονται στην κολυμβητική ικανότητα των ενήλικων ατόμων. Η πρώτη, χρονολογικά (Plaut & Gordon 1994), εξετάζει το μεταβολισμό της κολύμβησης σε κλωνοποιημένα αγρίου τύπου άτομα. Μερικά χρόνια αργότερα, ο Plaut (2000) μελέτησε την επίδραση του μεγέθους των πτερυγίων στην κολυμβητική ικανότητα και συμπεριφορά του zebrafish. Τέλος, οι Widmer *et al.* (2006), εξέτασαν την επίδραση της έλλειψης οξυγόνου κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στην κολυμβητική ικανότητα του zebrafish. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι σε καμία από τις παραπάνω εργασίες δε γίνεται λόγος για το φύλο των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν, γεγονός που γεννά ερωτήματα σχετικά με την επίδραση του εν λόγω παράγοντα στην διακύμανση των αποτελεσμάτων που παρατηρείται.

Τύποι κολύμβησης

Η κολύμβηση ορίζεται ως η διαδικασία προώθησης του ψαριού καθώς ελίσσεται μέσα στο νερό (του οποίου η πυκνότητα είναι περίπου ίδια με αυτή του ψαριού). Γενικά, υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι κολύμβησης:

- 1) «**sustained**» (σταθερής ταχύτητας): κολυμβήσεις που μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλα χρονικά διαστήματα (μεγαλύτερα από 200 min), χωρίς να καταλήγουν σε μυϊκή κόπωση.
- 2) «**prolonged**» (παρατεταμένες): κολυμβήσεις μικρότερης διάρκειας (20 sec-200 min) από τις «sustained» που καταλήγουν σε μυϊκή κόπωση.
- 3) «**burst**» (εκτίναξης): κολυμβήσεις που μπορούν να διατηρηθούν από τα ψάρια για μικρές χρονικές περιόδους (μικρότερες από 20 sec) και χαρακτηρίζονται από μία αρχική φάση επιτάχυνσης (μη σταθερής κολύμβησης), η οποία ακολουθείται από μία σταθερή φάση που ορίζεται ως «sprint» (Beamish 1978).

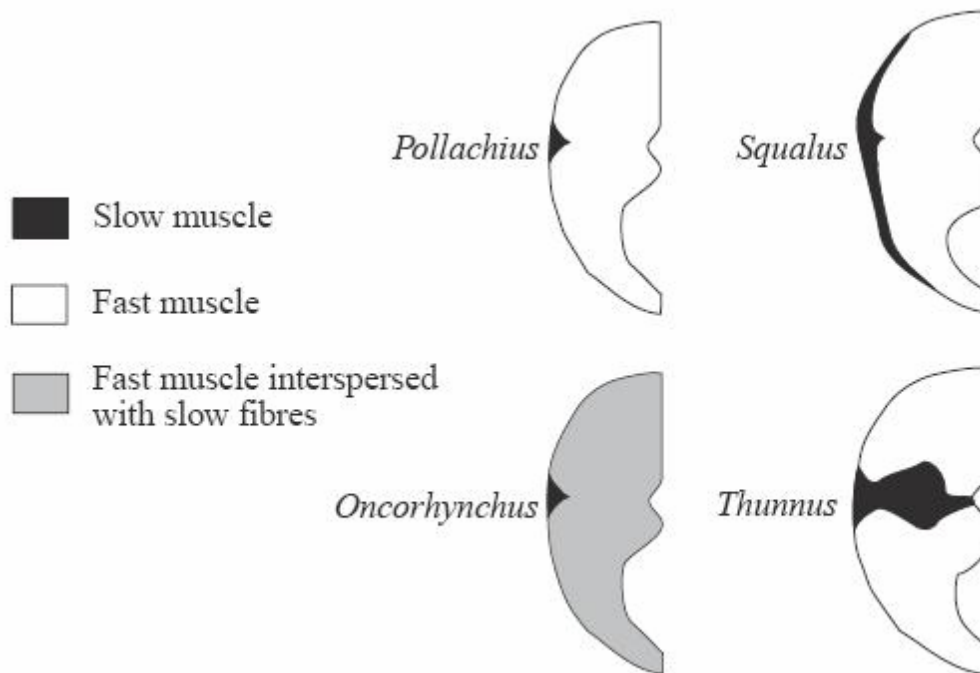
Μια πολύ σημαντική έννοια που αφορά στις παρατεταμένες κολυμβήσεις, αποτελεί η «κρίσιμη» ταχύτητα (critical velocity, U_{crit}), η οποία ορίστηκε από τον Brett (1964) ως η μέγιστη ταχύτητα (submaximum) που μπορεί να διατηρήσει ένα ψάρι για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (Beamish 1978) και η οποία αποτελεί την πιο εύκολη μέθοδο εκτίμησης της κολυμβητικής ικανότητας (Plaut 2001). Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως δείκτης της κολυμβητικής επίδοσης των ατόμων zebrafish.

Τύποι μυών που συμμετέχουν στην κολύμβηση

Περίπου το 40-60% της ολικής μάζας του σώματος, στα περισσότερα ψάρια είναι μύες που συμμετέχουν στην κίνηση (locomotor musculature), ποσοστό μεγαλύτερο από τα υπόλοιπα σπονδυλωτά (Bone 1978). Γι' αυτό, η ολική ποσότητα των μυών στο σώμα

ενός ψαριού καθώς και τα ποσοστά των διαφόρων τύπων μυϊκών ινών σε αυτό, επηρεάζουν σημαντικά την κολυμβητική του ικανότητα.

Υπάρχουν δύο κύριοι τύποι μυών υπεύθυνοι για την κολύμβηση. Οι κόκκινοι που συστέλλονται αργά (slow-twitch) και οι λευκοί που συστέλλονται γρήγορα (fast-twitch), ενώ έχει παρατηρηθεί και η ύπαρξη ενός ενδιάμεσου στρώματος, ροζ μυών σε μερικά είδη (Johnston 1981). Ο λευκός μυς καταλαμβάνει το 80-100% της διατομής ενός ψαριού σε συγκεκριμένα σημεία (Altringham & Ellerby 1999), ενώ το ποσοστό του κόκκινου μυός διαφέρει στα διάφορα είδη και αποκαλύπτει ορισμένα στοιχεία για τις συνήθειές τους (Bone 1978) (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1. Διαγραμματικές διατομές που απεικονίζουν την κατανομή των («γρήγορων») λευκών και («αργών») κόκκινων μυών (Altringham & Ellerby 1999).

Για σταθερής ταχύτητας κολύμβηση, τα ψάρια χρησιμοποιούν τους κόκκινους μύες που, επειδή λειτουργούν αερόβια, είναι ανθεκτικοί στην κόπωση και έχουν χαμηλή

ταχύτητα συστολής (shortening) (Bone *et al.* 1978). Έτσι, είδη που εξειδικεύονται σε τέτοια κολύμβηση υψηλών αποστάσεων, έχουν υψηλότερο ποσοστό κόκκινων μυών στο σώμα τους. Όμως, υποστηρίζεται ότι και οι ροζ μύες λαμβάνουν μέρος στην κολύμβηση σταθερής ταχύτητας, εξαιτίας των «ενδιάμεσων» χαρακτηριστικών τους, δηλαδή τον υψηλότερο ρυθμό χαλάρωσης και τη μέγιστη ταχύτητα συστολής (Martinez *et al.* 2002).

Στην παρατεταμένη κολύμβηση (prolonged), εκτός από τους κόκκινους μύες, συμμετέχουν επίσης οι άσπροι και οι ροζ ειδικά όταν οι ταχύτητες κολύμβησης πλησιάζουν κοντά στη μέγιστη (>92-93% της U_{crit} , Jones 1982, Johnston & Goldspink 1973a,b). Επίσης, σε πειράματα με σολομό (*Oncorhynchus nerka*), σε ταχύτητα μεγαλύτερη από το 80% της U_{crit} , δε μετρήθηκε καθόλου ηλεκτρική δραστηριότητα στους κόκκινους μύες (Webb 1971). Αυτό που ισχύει σε γενικές γραμμές πάντως είναι ότι στις μικρές ταχύτητες χρησιμοποιούνται μόνο οι κόκκινοι μύες και όσο η ταχύτητα κολύμβησης αυξάνεται, αυξάνει και ο ρυθμός χτύπων της ουράς και οι λευκοί μύες χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο (Bone *et al.* 1978).

Οι μικρής διάρκειας, δυνατές εκτινάξεις (sprints), δηλαδή οι «burst» κολυμβήσεις, στηρίζονται σε συστολή των αναερόβιων, γλυκολυτικών λευκών μυών (Hammer 1995, Martinez *et al.* 2002) που βασίζονται σε αναερόβιες πηγές ενέργειας (Hammer 1995)

Παράγοντες που επηρεάζουν την κολυμβητική ικανότητα

Περιβαλλοντικοί παράγοντες

Οι κυριότεροι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την κολυμβητική ικανότητα των ψαριών, είναι η θερμοκρασία, η συγκέντρωση του οξυγόνου, η συγκέντρωση του διοξειδίου του άνθρακα, οι διάφοροι ρυπαντές, η αλατότητα (Beamish 1978), το φώς και η τροφή (Hammer 1995).

Σε όλους τους υδρόβιους οργανισμούς, που χρησιμοποιούν οξυγόνο για την αναπνοή τους, η κατανάλωσή του μπορεί να περιορίσει την κολυμβητική ικανότητα.

Υπάρχει δηλαδή ένα όριο συγκέντρωσης του οξυγόνου, κάτω από το οποίο, η κολυμβητική ικανότητα των οργανισμών μειώνεται (Beamish 1978) και το οποίο, σύμφωνα με τον Hammer (1995), τοποθετείται περίπου στο 70% της ποσότητας που απαιτείται για τον κορεσμό του νερού. Ο όρος «κρίσιμη συγκέντρωση οξυγόνου» (critical oxygen concentration), εισήχθη από τον Kutty (1968) για να περιγράψει τη συγκέντρωση του οξυγόνου, κάτω από την οποία τα ψάρια είναι ανίκανα να διατηρήσουν σταθερές ή παρατεταμένες ταχύτητες (Beamish 1978). Η αδυναμία των ψαριών να κολυπήσουν σε χαμηλές συγκεντρώσεις οξυγόνου, δεν αποδίδεται σε κόπωση, καθώς τα ψάρια ξεκινούν να κολυμπούν όταν τα επίπεδα του οξυγόνου αυξάνονται, αλλά σε κάποιο μηχανισμό αντίληψης (αίσθησης) της συγκέντρωσης του οξυγόνου (Beamish 1978). Σε περίπτωση χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και παρατεταμένης κολύμβησης, οι Steffensen & Farrell (1998) αναφέρουν ότι τα είδη που εμφανίζουν σύστημα στεφανιαίας κυκλοφορίας (coronal circulation), έχουν σημαντικό πλεονέκτημα έναντι εκείνων που δεν έχουν. Τα περισσότερα ψάρια, αντιδρούν στην υποξία με μείωση των χτύπων της καρδιάς ή βραδυκαρδία, όπως υποστηρίζουν οι Korsmeyer *et al.* (1996), οι οποίοι έδειξαν ότι οι ραγδαία αυξανόμενες αερόβιες απαιτήσεις, καθιστούν τη μεταφορά του οξυγόνου και τη μεταβολική ικανότητα των κόκκινων μυών ανεπαρκή για διατήρηση υψηλών αερόβιων κολυμβητικών ταχυτήτων στον κιτρινόπτερο τόνο, *Thunnus albacares* (Bonnaterre 1788).

Το διοξείδιο του άνθρακα επηρεάζει τη συγγένεια της αιμοσφαιρίνης για το οξυγόνο και το μεταβολικό ρυθμό των ψαριών (Beamish 1978). Λίγα όμως είναι γνωστά για την επίδραση της συγκέντρωσής του στην κολύμβηση, με εξαίρεση τη μελέτη των Dahlberg *et al.* (1968), οι οποίοι διαπίστωσαν μείωση της «μέσης τελικής κολυμβητικής ταχύτητας» με αύξηση της συγκέντρωσης του CO₂ στο coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum 1792) αλλά όχι και στο largemouth bass, *Micropterus salmoides* (Lacépède 1802). Τέλος, ο Basu (1959), παρατήρησε μειωμένη κατανάλωση οξυγόνου σε τέσσερα είδη ψαριών, σε υψηλά επίπεδα CO₂.

Οι ρυπαντές που έχουν μεγαλύτερο αντίκτυπο στην κολυμβητική ικανότητα του ψαριού, είναι εκείνοι που επηρεάζουν την ανταλλαγή των αναπνευστικών αερίων και τα μεταβολικά μονοπάτια που συμμετέχουν στη μεταφορά της ενέργειας (Beamish 1978).

Οι κυριότεροι ρυπαντές που μέχρι σήμερα έχει αποδειχθεί ότι επιδρούν (αρνητικά) στην κολυμβητική επίδοση των ψαριών είναι η αμμωνία, ο χαλκός, οι ίνες από πολτοποιημένο ξύλο κωνοφόρων (conifer pulpwood fiber), το υδρόθειο, το PCP (sodium pentachlorophenate) και το BKME (bleached kraft mill effluent) (Howard 1975, Beamish 1978, Randall & Tsui 2002, Wicks *et al.* 2002).

Γενικά, δεν έχει παρατηρηθεί σημαντική επίδραση της αλατότητας στην κολυμβητική ικανότητα νεαρών και ενηλίκων ψαριών. Παρόλα αυτά, παρατηρήθηκαν αλλαγές στο μεταβολικό ρυθμό, εξαιτίας της ενέργειας που απαιτείται για την οσμωρύθμιση σε περιπτώσεις μεταβολής της αλατότητας (Beamish 1978).

Οι συνθήκες φωτός παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην κολύμβηση των ψαριών (Hammer 1995, Young 2004), καθώς ο ρετροπισμός ενεργοποιείται από οπτικά ερεθίσματα. Αλλαγές στην ένταση του φωτισμού, φαίνεται να έχουν σημαντική επίδραση στις κρίσιμες ταχύτητες των ψαριών που κολυμπούν στη στήλη του νερού (ως αποτέλεσμα αλλαγών στον οπτικό προσανατολισμό), όμως οι ταχύτητες αυτές δεν δείχνουν να επηρεάζονται σε περιπτώσεις βενθικών ψαριών (Hammer 1995). Ο Young (2004), διαπίστωσε επίδραση της φωτοπεριόδου και της εναλλαγής ημέρας-νύχτας, στη U_{crit} του delta smelt, *Hypomesus transpacificus* (McAllister 1963) και του wakasagi, *Hypomesus nipponensis* (McAllister 1963).

Τέλος, η τροφή (ποιότητα και ποσότητα) αποτελεί έναν ακόμα σημαντικό παράγοντα που φαίνεται να επηρεάζει την κολυμβητική ικανότητα των ψαριών (Hammer 1995, Wagner *et al.* 2004). Ο Beamish (1989), παρατήρησε ότι η κρίσιμη ταχύτητα του lake trout, *Salvelinus namaycush* (Walbaum 1792) παρουσίασε αύξηση όταν αυξήθηκε το πρωτεϊνικό περιεχόμενο στην τροφή. Οι Wagner *et al.* (2004), έδειξαν ότι αντικατάσταση (75%) των λιπιδικών συμπληρωμάτων αντσούγιας στο σιτηρέσιο του σολομού του Ατλαντικού, *Salmo salar* (L. 1758) (που θεωρούνται καλύτερα και χρησιμοποιούνται ευρέως στις εμπορικές τροφές) από λιπιδικά συμπληρώματα πουλερικών, οδήγησε σε μείωση της αρχικής κολυμβητικής ικανότητας (16% U_{crit}). Όμως η αντικατάσταση από φυτικά έλαια (flax oil και sunflower oil), δεν επηρέασε την κολυμβητική ικανότητα.

Βιολογικοί παράγοντες

Οι σημαντικότεροι βιολογικοί παράγοντες που επηρεάζουν την κολυμβητική ικανότητα των ψαριών, είναι το μέγεθος (μήκος και βάρος), το φύλο και η υγεία του ψαριού (Beamish 1978).

Το μήκος είναι ο πιο σημαντικός βιολογικός παράγοντας που επιδρά στην κολυμβητική ικανότητα των ψαριών (Beamish 1978, Koumoundouros *et al.* 2002b, Koumoundouros *et al.* 2009a,b). Οι Brett & Glass (1973), μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με το μήκος, στους ενεργούς μεταβολικούς ρυθμούς του κόκκινου σολωμού, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum 1792) και συμπέραναν ότι διπλασιασμός του μήκους του σώματος του ψαριού είχε μεγαλύτερη επίδραση στη U_{crit} από διπλασιασμό της θερμοκρασίας. Αρχικά είχε προταθεί ότι οι σταθερές και οι παρατεταμένες ταχύτητες είναι ανάλογες με το (μήκος)^{0,5}, εξαιτίας της υπόθεσης ότι ο όγκος του ψαριού και ο ανάλογος όγκος των μυών είναι ανάλογες με το (μήκος)². Άλλοι υποστηρίζουν ότι η μέγιστη ταχύτητα είναι ανεξάρτητη από το μήκος και μόνο η επιφάνεια των βραγχίων είναι σημαντική (Beamish 1978). Συνήθως, η σχέση του μήκους με την κολυμβητική ικανότητα περιγράφεται από την εξίσωση:

$$\log u = a + b (\log l)$$

Όπου u η κολυμβητική ταχύτητα και l το μήκος (Beamish 1978).

Η διαφορετικά:

$$Y = a X^b$$

Όπου Y η κολυμβητική ταχύτητα και X το μήκος (Hammer 1995).

Αρκετές μέθοδοι έχουν περιγραφεί για τη διόρθωση της ταχύτητας όταν το μήκος ποικίλει. Έτσι, η σχετική κολυμβητική ικανότητα, εκφρασμένη σε $l \text{ sec}^{-1}$, επιτρέπει τη

σύγκριση ψαριών με διαφορετικά μήκη. Οι σχετικές ταχύτητες εκτίναξης μεγαλύτερης διάρκειας, οι σχετικές παρατεταμένες καθώς και οι σχετικές κρίσιμες ταχύτητες είναι γενικά μεγαλύτερες στα μικρότερα άτομα. Αυτό συμβαίνει κυρίως εξαιτίας της αυξημένης υδροδυναμικής αντίστασης που εμφανίζουν τα μεγαλύτερα άτομα, η οποία ξεπερνά το πλεονέκτημα της μεγαλύτερης μεταβολικής ικανότητας και της αυξημένης μυϊκής μάζας. Συνήθως, η κολυμβητική ικανότητα συσχετίζεται με το μήκος, όμως έχει περιγραφεί και με βάση το βάρος (Beamish 1978).

Σημαντικός παράγοντας που επίσης επιδρά στην κολυμβητική ικανότητα, είναι ο «δείκτης ευρωστίας» (condition factor) του ψαριού που εκφράζει το βάρος του ψαριού σε σχέση με το μήκος του και περιγράφεται συνήθως τον παράγοντα K που προκύπτει ως εξής:

$$K = W / (a \cdot TL^b)$$

Όπου W το βάρος και TL το μήκος του ατόμου (Bolger & Connolly 1989).

Τα τελευταία χρόνια, έχει μελετηθεί αρκετά η επίδραση του μεγέθους και του σχήματος των πτερυγίων στην κολυμβητική ικανότητα των ψαριών. Ο Plaut (2000) χρησιμοποιώντας zebrafish αγρίου τύπου, με μακριά πτερύγια και χωρίς ουραίο πτερύγιο, απέδειξε ότι τα αγρίου τύπου είναι τα πλέον προσαρμοσμένα σε κολυμβήσεις σταθερής ταχύτητας. Τα μακριά πτερύγια οδηγούν σε μείωση της κολυμβητικής ικανότητας, ενώ η παντελής έλλειψη του ουραίου πτερυγίου έχει ακόμα χειρότερα αποτελέσματα.

Η υγεία του ψαριού παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στην κολυμβητική του ικανότητα. Η ύπαρξη σοβαρών παθολογικών καταστάσεων, σύμφωνα με τους Tiernay & Farrell (2004), συνδέεται είτε με μείωση της ταχύτητας κολύμβησης, είτε με τη μείωση του ποσοστού αποκατάστασης (recovery ratio). Μάλιστα θεωρούν ότι στο μέλλον, η κολυμβητική ικανότητα θα μπορεί να αποτελέσει μέτρο εκτίμησης της υγείας του ψαριού. Έχει παρατηρηθεί, ακόμα, ότι οι επιμολύνσεις με παράσιτα περιορίζουν κατά πολύ την κολυμβητική ικανότητα. Για παράδειγμα, σχετικά σοβαρά μολυσμένες καφέ πέστροφες, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum 1792) με τον τρηματώδη *Bolboporus*

confuses, εμφάνισαν μειωμένες παρατεταμένες ταχύτητες (κατά 35%) σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα ψάρια ελέγχου (control) (Beamish 1978). Ακόμα όμως και σε περιπτώσεις όπου τα μολυσμένα άτομα δεν εμφάνισαν μεγάλες αποκλίσεις στις ταχύτητες κολύμβησης από τα άτομα ελέγχου, τα πρώτα κολυμπούσαν για πολύ μικρότερα χρονικά διαστήματα από ότι τα δεύτερα (Beamish 1978). Γενικά, η επίδραση βακτηριακών και ιικών μολύνσεων στην κολυμβητική ικανότητα δεν έχει μελετηθεί λεπτομερώς (Beamish 1978, Swanson *et al.* 2002). Πρόσφατα, οι Swanson *et al.* (2002), μελέτησαν την επίδραση της χρόνιας μόλυνσης με *Mycobacterium* spp. στο delta smelt και έδειξαν ότι μειώνει αρκετά την ικανότητα για έντονη κολύμβηση με σταθερή ταχύτητα (οι ταχύτητες των ψαριών μειώθηκαν 20% κατά μέσο όρο).

Ο ρόλος της θερμοκρασίας

Είναι γενικά αποδεκτό, ότι η θερμοκρασία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην κολυμβητική ικανότητα των ψαριών και υπάρχουν πολλές σχετικές δημοσιευμένες εργασίες (Beamish 1978, Fuiman & Batty 1997, Wieser & Kaufmann 1998, Johnson *et al.* 1998, Ojanguren & Brana, 2000, Dickson *et al.* 2002, Koumoundouros *et al.* 2002b, Wilson *et al.* 2002, Franklin *et al.* 2003, Koumoundouros *et al.* 2009a,b). Οι διάφοροι φυσιολογικοί μηχανισμοί που είναι συνδεδεμένοι με την κολύμβηση, διαφέρουν ανάλογα με την κατηγορία της κίνησης (σταθερής ταχύτητας, παρατεταμένη ή εκτίναξη). Οπότε είναι λογικό και η επίδραση που ασκεί σε αυτούς η θερμοκρασία να διαφέρει (Beamish 1978).

Στις κολυμβήσεις σταθερής ταχύτητας και στις παρατεταμένες κολυμβήσεις, όπου οι αερόβιες διαδικασίες συνεισφέρουν ως επί το πλείστον στην παραγωγή του ATP (adenosine triphosphate), η επίδραση της θερμοκρασίας γίνεται καλύτερα κατανοητή μέσω της σχέσης της με την κατανάλωση οξυγόνου, αφού το ποσοστό οξυγόνου που μπορεί να καταναλώσει ένα ψάρι εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία και άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Beamish 1978). Σε πολλές μελέτες, που έχουν ποσοτικοποιήσει την επίδραση της θερμοκρασίας στη συνεχή κολύμβηση των τελεόστεων, έχει διατυπωθεί ότι ο μεταβολικός ρυθμός και η μέγιστη διατηρήσιμη («sus-

tainable») ταχύτητα, γενικά αυξάνουν με τη θερμοκρασία (Dickson *et al.* 2002). Σε μερικές περιπτώσεις, όμως, παρατηρείται μείωση των παραπάνω μεταβλητών σε υψηλές θερμοκρασίες που πλησιάζουν το μέγιστο που συναντούν στο περιβάλλον τους τα διάφορα είδη (Dickson *et al.* 2002). Ο Beamish (1978), αναφέρει χαρακτηριστικά ότι μέσα σε μία θερμική κλίμακα ανοχής, οι παρατεταμένες ταχύτητες τυπικά αυξάνουν με τη θερμοκρασία μέχρι κάποιο μέγιστο και έπειτα μειώνονται. Σε παρόμοια συμπεράσματα κατέληξαν οι Ojanguren & Brana (2000) και οι Koumoundouros *et al.* (2002b) οι οποίοι μελέτησαν τις καμπύλες του χρόνου αντοχής στην κολύμβηση σε σχέση με τη θερμοκρασία, της νεαρής καφέ πέστροφας και ιχθυδίων λαβρακιού αντίστοιχα, και διαπίστωσαν ότι εμφάνισαν ίδιο πρότυπο με τις καμπύλες που αναφέρει ο Beamish (1978).

Η θερμοκρασία όμως, μπορεί να επιδράσει και έμμεσα, εξαιτίας των αλλαγών που προκαλεί στο ιξώδες (viscosity - μ) του νερού και άρα στις υδροδυναμικές συνθήκες (Von Herbing 2002). Έτσι, όπως αναφέρει ο Von Herbing (2002), υπάρχουν δύο θεωρίες για το πώς επηρεάζει η θερμοκρασία την κολυμβητική ικανότητα των ιχθυονυμφών. Η πρώτη υποστηρίζει ότι στις μικρές νύμφες, οι τροποποιήσεις που προκαλεί η αλλαγή της θερμοκρασίας στο ιξώδες του νερού είναι πιο σημαντικές από τις ίδιες τις αλλαγές της θερμοκρασίας (σε ίδιο ιξώδες). Αυτό όμως δεν ισχύει και για τις μεγάλες νύμφες, στις οποίες οι αλλαγές στη φυσιολογία, προέρχονται κυρίως από αλλαγές στη θερμοκρασία (Fuiman & Batty 1997). Η δεύτερη θεωρία, σε αντίθεση με την πρώτη, υποστηρίζει ότι σε όλες τις νύμφες, οι αλλαγές της θερμοκρασίας προκαλούν μεταβολές στη φυσιολογία των μυών, κάτι που έχει πολύ μεγαλύτερη επίδραση στην κολυμβητική ικανότητα απ' ότι οι θερμοεπαγόμενες αλλαγές στο ιξώδες (Wieser & Kauffman 1998).

Αν και η επίδραση της θερμοκρασίας εκτροφής στο μυϊκό σύστημα των ψαριών έχει μελετηθεί εκτενώς (Matschak & Stickland 1995, Johnston *et al.* 1997, Xie *et al.* 2001, Ayala *et al.* 2003, Lopez Albors *et al.* 2003, Alami-Durante *et al.* 2006, Albokhadaim *et al.* 2007), εντούτοις μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχε ούτε μία δημοσιευμένη εργασία πάνω στην επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην κολυμβητική ικανότητα των ατόμων σε μεταγενέστερα στάδια. Η εργασία των Koumoundouros *et al.* (2009a) είναι η πρώτη που καταπιάνεται με αυτό το, απαιτητικό πειραματικά, εγχείρημα πάνω στο

λαβράκι. Οι συγγραφείς, χρησιμοποιώντας 2 διαφορετικές θερμοκρασίες εκτροφής (15 και 20°C), διαπίστωσαν ότι τα άτομα εκείνα που προέρχονταν από τη χαμηλότερη θερμοκρασία επεδείκνυαν μεγαλύτερες επιδόσεις στις δοκιμές κολύμβησης. Διερευνώντας τα αίτια του αποτελέσματος αυτού, κατέληξαν στο ότι τα άτομα της χαμηλότερης θερμοκρασίας παρουσίαζαν μεγαλύτερο ποσοστό κόκκινων μυών σε σχέση με τους λευκούς, και μεγαλύτερο αριθμό κόκκινων μυϊκών ινών από ότι τα άτομα της υψηλότερης θερμοκρασίας.

Στην παρούσα μελέτη, ερευνήθηκε η επίδραση 4 διαφορετικών θερμοκρασιών ανάπτυξης (22, 25, 28 και 31°C) στην κολυμβητική ικανότητα του zebrafish σε σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα μετά την εφαρμογή τους.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Τα πειράματα για τον υπολογισμό της κολυμβητικής ικανότητας των ψαριών πραγματοποιήθηκαν σε μία θερμοκρασία κοινή για όλα τα άτομα, η οποία δεν ήταν ταυτόσημη με καμία από τις θερμοκρασίες εκτροφής. Όλοι οι πειραματικοί πληθυσμοί εγκλιματίστηκαν στη νέα αυτή θερμοκρασία πριν τη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Η θερμοκρασία που επιλέχθηκε για τον εγκλιματισμό και την διεξαγωγή των πειραμάτων κολύμβησης ήταν η ενδιάμεση από τις τέσσερις θερμοκρασίες εκτροφής που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή 26,5°C. Η θερμοκρασία αυτή θεωρήθηκε ότι είναι η πιο κατάλληλη επειδή είναι μέσα στο θερμοκρασιακό εύρος που προτιμά το zebrafish στη φύση (24-30°C, Lawrence 2007) και απέχει εξίσου από τις ακραίες τιμές θερμοκρασίας ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Η περίοδος του εγκλιματισμού διήρκεσε περίπου 1,5 μήνα (47 ημέρες κατά μέσο όρο, Πίνακας 5.1), που ήταν το βέλτιστο χρονικό διάστημα ώστε ο εγκλιματισμός να είναι πλήρης, αλλά και τα ψάρια να μην υπερβούν το κατάλληλο μέγεθος για τις ασκήσεις κολύμβησης. Πρέπει να αναφερθεί, ότι κατά την περίοδο του εγκλιματισμού, ελέγχονταν συνεχώς οι συνθήκες του νερού, όπως και κατά την περίοδο της εκτροφής.

Για να διασφαλιστεί η σωστή διαδικασία του εγκλιματισμού, έγιναν τυχαίες δειγματοληψίες από όλους τους πληθυσμούς και μετρήθηκαν το σωματικό βάρος και το TL των ατόμων, πριν και μετά τον εγκλιματισμό (Πίνακας 5.1). Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι όλα τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν στις ασκήσεις κολύμβησης ήταν αρσενικά και ότι έμεναν νηστικά μία ημέρα πριν την άσκηση.

Πίνακας 5.1. Έναρξη και λήξη εγκλιματισμού των διαφορετικών πληθυσμών στην κοινή θερμοκρασία των 26,5°C, σε ημέρες μετά την εκκόλαψη (dph).

	Έναρξη εγκλιματισμού	Λήξη εγκλιματισμού
22°C	101	144
25°C	99	149
28°C	100	148
31°C	97	143
Μέσος Όρος	~ 99	146

Υπολογισμός κολυμβητικής ικανότητας

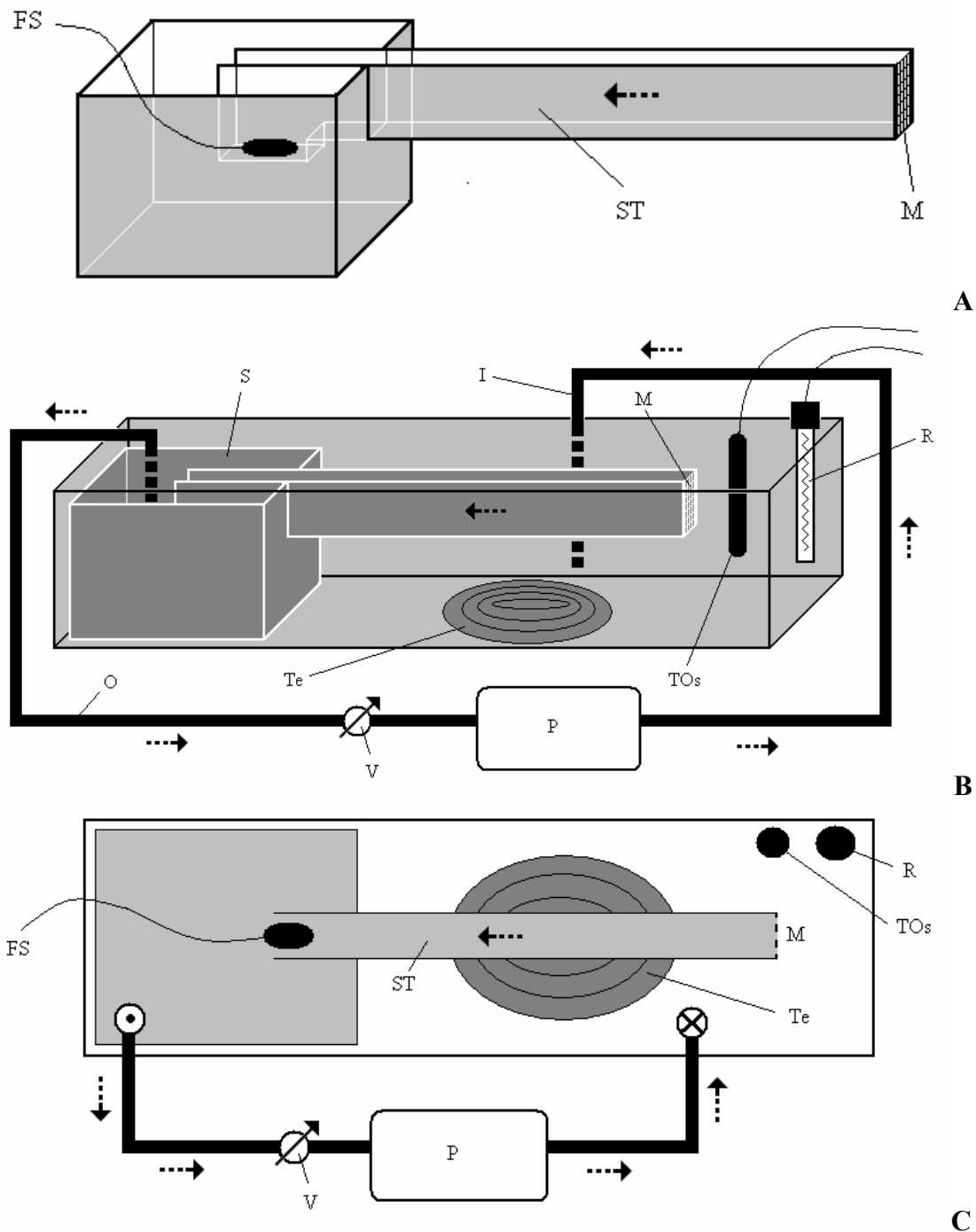
Η κολυμβητική ικανότητα των ατόμων zebrafish, μελετήθηκε με τη μέθοδο που εισήγαγε ο Brett (1964), δηλαδή με τον υπολογισμό της «κρίσιμης ταχύτητας» (critical velocity, U_{crit}). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι τα ψάρια γενικά τείνουν να διατηρούν τη θέση τους ενάντια στο ρεύμα. Προς τούτο τα ψάρια τοποθετούνταν σε κάποιο αγωγό κολύμβησης και αναγκάζονταν να κολυμπήσουν αντίθετα στο ρεύμα το οποίο αυξάνονταν με σταθερό βήμα σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα έως ότου το ψάρι κουραστεί και παρασυρθεί τελικά από το ρεύμα. Σε αυτό το σημείο, η μέτρηση τέλειωνε και υπολογίζονταν η U_{crit} .

Η συσκευή κολύμβησης

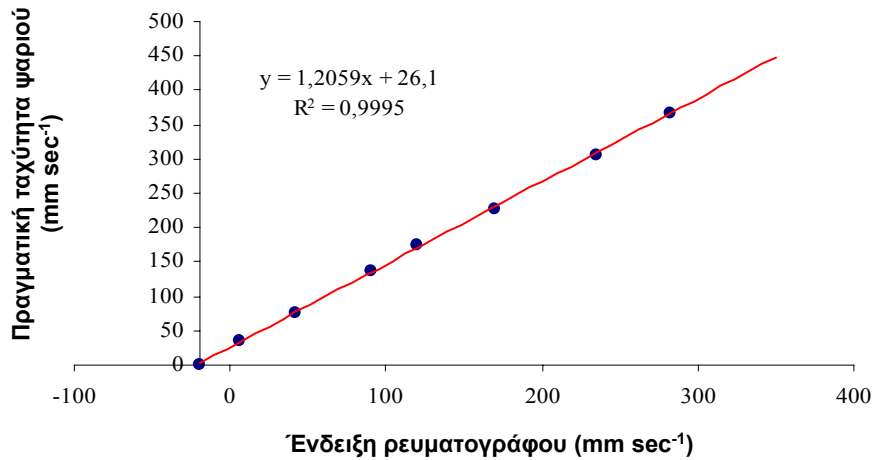
Όλα τα πειράματα μέτρησης της κολυμβητικής ικανότητας έγιναν σε μία ειδικά σχεδιασμένη συσκευή από τους Koumoundouros *et al.* (2002b) (Εικόνα 5.2), η οποία διαθέτει τρία συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι των αντίστοιχων συσκευών που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν: α) είναι κατάλληλη για μετρήσεις σε μικρού μεγέθους ψάρια όπως το zebrafish, β) χαρακτηρίζεται από υψηλή ακρίβεια και γ) λειτουργεί σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης καθώς το κανάλι κολύμβησης είναι ανοιχτό από πάνω (με όσα πλεονεκτήματα συνεπάγεται αυτό για την καλύτερη απόδοση των ψαριών).

Η συσκευή κολύμβησης (Εικόνα 5.2) αποτελείται από ένα κανάλι (swimming tunnel, ST) μήκους 70 cm, πλάτους 5 cm και βάθους 4,5 cm και έναν κλειστό θάλαμο (swimming chamber, S). Είναι κατασκευασμένη στο σύνολό της από γυαλί και είναι τοποθετημένη σε ένα ενυδρείο χωρητικότητας 130 l (Εικόνα 5.2) ώστε να γεμίζει με νερό. Με τη χρήση αντλιών (EHEIM, 2217, Germany), απορροφάται νερό από τον κλειστό θάλαμο κολύμβησης και επιστρέφει στο ενυδρείο, δημιουργώντας έτσι το απαραίτητο ρεύμα νερού μέσα στο κανάλι κολύμβησης.

Η επιθυμητή κάθε φορά ένταση ρεύματος επιτυγχάνεται με την βοήθεια ρυθμιζόμενης βαλβίδας στην αντλία (V). Η ταχύτητα του ρεύματος στο θάλαμο κολύμβησης υπολογίζεται με τη χρήση ηλεκτρονικού ρευματογράφου (Valeport, Model 801, UK) κατάλληλα προσαρμοσμένου μέσα στο κανάλι κολύμβησης. Για πιο ακριβή μέτρηση της πραγματικής ταχύτητας του ψαριού μέσα στο θάλαμο κολύμβησης, κατασκευάζονταν καθημερινά μία «πρότυπη καμπύλη» με αντιστοίχιση μετρήσεων του ρευματογράφου σε συγκεκριμένη θέση της βαλβίδας με την πραγματική απόδοση της αντλίας, η οποία υπολογιζόταν με μέτρηση του όγκου νερού που διοχέτευε σε συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Στη συνέχεια, συνυπολογίζοντας τον όγκο του νερού που περνούσε από τη διατομή του καναλιού και την επιφάνεια των ψαριών κατασκευαζόταν η πρότυπη καμπύλη (Εικόνα 5.3) με τη βοήθεια του Excel (Microsoft office, USA).



Εικόνα 5.2. Η συσκευή κολύμβησης (σύμφωνα με Koumoundouros *et al.* 2002b). A, τρισδιάστατη άποψη της συσκευής κολύμβησης; B, τρισδιάστατη άποψη της συσκευής μέσα στο ενδρείο κολύμβησης; C, κάτοψη της συσκευής και του ενδρείου κολύμβησης. FS, αισθητήρας ρευματογράφου; ST, κανάλι κολύμβησης; M, προστατευτικό δίχτυ; S, θάλαμος κολύμβησης; O, σωλήνας εξόδου; V, βαλβίδα ρύθμισης ροής; P, αντλία; I, σωλήνας εισόδου; Te, ψυκτική συσκευή; TOs, αισθητήρας θερμοκρασίας και συγκέντρωσης οξυγόνου; R, αντίσταση με θερμοστάτη.



Εικόνα 5.3. Παράδειγμα πρότυπης καμπύλης για την αντιστοίχιση της ένδειξης του ρευματογράφου με την πραγματική ταχύτητα του ψαριού στο κανάλι κολύμβησης.

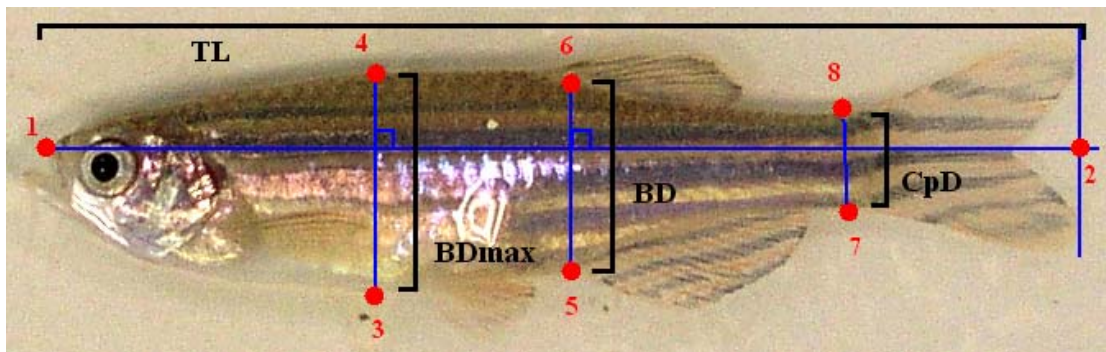
Για να μην δραπετεύουν τα ψάρια από το κανάλι κολύμβησης, ένα προστατευτικό δίχτυ είναι τοποθετημένο στο σημείο όπου εισέρχεται το νερό ενώ η ανάδρομη διαφυγή αποφεύγεται με τη χρήση οπτικών και ηχητικών ερεθισμάτων. Η συσκευή κολύμβησης, είναι επίσης εξοπλισμένη με αντιστάσεις με θερμοστάτη και ψυκτικό μηχάνημα για την αποτελεσματική ρύθμιση της θερμοκρασίας καθώς και με αισθητήρα μέτρησης της συγκέντρωσης του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό και της θερμοκρασίας για την παρακολούθηση των συνθηκών του νερού. Η ομογενής κίνηση του νερού σε όλο το βάθος και μήκος του καναλιού κολύμβησης ελέγχθηκε με τη χρήση χρωστικής.

Η άσκηση κολύμβησης

Πριν την έναρξη της άσκησης, τα ψάρια αφήνονταν για 15 περίπου λεπτά να εγκλιματιστούν στη συσκευή κολύμβησης. Στη συνέχεια τοποθετούνταν στο κανάλι κολύμβησης, σε ρεύμα με ταχύτητα ίση με δύο μήκη σώματος ανά δευτερόλεπτο (2 TL sec⁻¹). Έπειτα το ρεύμα αυξανόταν κατά 1 TL sec⁻¹ κάθε 10 λεπτά, μέχρι το ψάρι να μην μπορεί πλέον να διατηρήσει τη θέση του ενάντια στο ρεύμα. Όταν το ψάρι δηλαδή παρασυρόταν από το ρεύμα χωρίς να αντιδρά σε οπτικοακουστικά ερεθίσματα, θεωρούνταν εξουθενωμένο και τελείωνε η άσκηση.

Τα εξουθενωμένα άτομα συλλαμβάνονταν με τη βοήθεια απόχης και αναισθητοποιούνταν (ethylenglycolmonophenylether, Merck, 0,2-0,3 ml l⁻¹), φωτογραφίζονταν ατομικά με ψηφιακή μηχανή (Olympus, Camedia C5050 Zoom) και ζυγίζονταν σε ζυγαριά ακριβείας. Επίσης εξετάζονταν μακροσκοπικά για τυχόν ύπαρξη μορφοανατομικών παραμορφώσεων. Στην περίπτωση που διαπιστώνονταν τέτοιες ανωμαλίες, το ψάρι εξαιρούνταν από τη μελέτη. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου γινόταν η μέτρηση του πάχους του σώματος (body width, BW).

Οι υπόλοιποι σημαντικοί μορφομετρικοί χαρακτήρες [δηλαδή ολικό μήκος (TL), ύψος σώματος (body depth, BD), μέγιστο ύψος σώματος (maximum body depth, BDmax) και ύψος ουραίου μίσχου (caudal peduncle depth, CpD)] μετρήθηκαν στον υπολογιστή μετά από τοποθέτηση οκτώ «σημείων αναφοράς» (landmarks) στις ψηφιακές φωτογραφίες (Εικόνα 5.4), με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος ανάλυσης εικόνας (tpsDig, version 2.04, James Rohlf) και του Microsoft Excel (2003).



Εικόνα 5.4. Τα landmarks (1-8) που τοποθετήθηκαν σε κάθε φωτογραφία και οι μορφομετρικοί χαρακτήρες που μετρήθηκαν (TL, BDmax, BD, CpD).

Υπολογισμός της U_{crit}

Όπως έχει αναφερθεί, η εκτίμηση της κολυμβητικής ικανότητας στη συγκεκριμένη μελέτη, πραγματοποιήθηκε με τον υπολογισμό της κρίσιμης ταχύτητας (U_{crit}). Η U_{crit} υπολογίζεται από τον τύπο:

$$U_{crit} = U_i + [U_{ii} (T_i / T_{ii})] \text{ (Brett, 1964)}$$

Όπου, U_i η υψηλότερη ταχύτητα που διατηρήθηκε για ολόκληρο χρονικό διάστημα, U_{ii} το βήμα αύξησης της ταχύτητας (30, 32,5 ή 35 mm sec⁻¹ ανάλογα με το TL), T_i ο χρόνος που πέρασε στην τελευταία ταχύτητα μέχρι να επέλθει η κόπωση και T_{ii} το καθορισμένο χρονικό διάστημα (στην παρούσα μελέτη 10 min) που μεσολαβούσε ανάμεσα στις αλλαγές της ταχύτητας.

Πρέπει να αναφερθεί, ότι το TL των ατόμων μέσα σε κάθε πληθυσμό δεν ήταν σταθερό όπως είναι φυσικό, αλλά είχε ένα εύρος που κυμαινόταν από 30 έως 40 mm TL περίπου. Όμως η ακριβής μέτρησή του TL κάθε ατόμου πριν την άσκηση κολύμβησης ήταν αδύνατη, καθώς οι επιπρόσθετοι χειρισμοί θα οδηγούσαν σε στρες το οποίο ως γνωστό, επηρεάζει σημαντικά την κολυμβητική επίδοση (Kieffer 2000). Έτσι, επειδή το βήμα αύξησης της ταχύτητας (που είναι άμεσα συνυφασμένο με το TL) είναι πολύ σημαντικό να είναι όσο το δυνατόν πιο ακριβές για την εξαγωγή ακριβέστερων συμπερασμάτων, γινόταν πριν από την έναρξη της άσκησης εμπειρική εκτίμηση του μήκους (οπτικά) και στη συνέχεια, αν η ακριβής μέτρηση του TL (στις ψηφιακές φωτογραφίες) δε συμφωνούσε με το βήμα αύξησης της ταχύτητας που εφαρμόστηκε κατά την άσκηση (± 5 mm TL), τότε το άτομο εξαιρούνταν από τη μελέτη.

Επειδή λοιπόν το TL των ατόμων που μελετήθηκαν δεν ήταν ακριβώς ίδιο, μετά τον υπολογισμό της U_{crit} γινόταν ο υπολογισμός της «σχετικής κρίσιμης ταχύτητας» (relative critical velocity, RU_{crit}) η οποία επειδή εκφράζεται σε TL sec⁻¹ επιτρέπει τη σύγκριση ατόμων με διαφορετικά μήκη σώματος. Δηλαδή:

$$RU_{crit} = U_{crit} / TL \text{ (Beamish 1978).}$$

Για τον έλεγχο της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην κολυμβητική επίδοση των ατόμων χρησιμοποιήθηκε το μη παραμετρικό Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance test (δεν υπήρχε ομοιογένεια διασπορών), ενώ για την εύρεση των διαφορών μεταξύ των ομάδων αλλά και μεταξύ των επαναλήψεων χρησιμοποιήθηκε το μη-παραμετρικό Mann-Whitney U test.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα στοιχεία δειγματοληψίας (TL και βάρος) από τους 4 πληθυσμούς πριν και μετά τον εγκλιματισμό, παρουσιάζονται στους Πίνακες 5.2 και 5.3. Τα ψάρια εμφάνισαν σημαντική αύξηση στο μήκος και στο βάρος κατά την περίοδο του εγκλιματισμού (Πίνακας 5.4) γεγονός που υποδηλώνει ότι προσαρμόστηκαν στη νέα συνθήκη θερμοκρασίας.

Πίνακας 5.2. Στοιχεία δειγματοληψίας πριν τον εγκλιματισμό στην κοινή θερμοκρασία. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι τυχαίου δείγματος 15 ατόμων από κάθε επανάληψη. TL, ολικό μήκος; W, βάρος σώματος; S.D., τυπική απόκλιση.

<i>Θερμοκρασία</i>	<i>Επανάληψη</i>	<i>TL (mm)</i>	<i>S.D.</i>	<i>W (g)</i>	<i>S.D.</i>
22°C	A	30,09	1,79	0,29	0,08
	B	29,98	2,71	0,28	0,05
25°C	A	27,41	3,35	0,24	0,09
	B	26,72	4,59	0,25	0,12
28°C	A	26,39	2,86	0,20	0,07
	B	27,57	2,68	0,22	0,07
31°C	A	26,91	2,21	0,20	0,05
	B	28,31	2,38	0,24	0,07
Μέσος Όρος		27,928		0,244	

Πίνακας 5.3 Στοιχεία δειγματοληψίας μετά τον εγκλιματισμό στην κοινή θερμοκρασία. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι 50 ατόμων από κάθε επανάληψη που συμμετείχαν στην άσκηση κολύμβησης. TL, ολικό μήκος; W, βάρος σώματος; S.D., τυπική απόκλιση; n, αριθμός δειγμάτων.

<i>Θερμοκρασία</i>	<i>Επανάληψη</i>	<i>TL (mm)</i>	<i>S.D.</i>	<i>W (g)</i>	<i>S.D.</i>	<i>n</i>
22°C	A	32,46	1,74	0,35	0,05	12
	B	33,17	1,44	0,35	0,05	12
25°C	A	31,83	2,59	0,33	0,08	12
	B	33,23	1,66	0,36	0,06	11
28°C	A	32,68	1,98	0,37	0,06	18
	B	32,38	1,97	0,34	0,06	18
31°C	A	33,15	1,52	0,37	0,06	18
	B	32,09	1,68	0,33	0,06	17
Μέσος Όρος		32,62		0,35		

Κολυμβητική ικανότητα

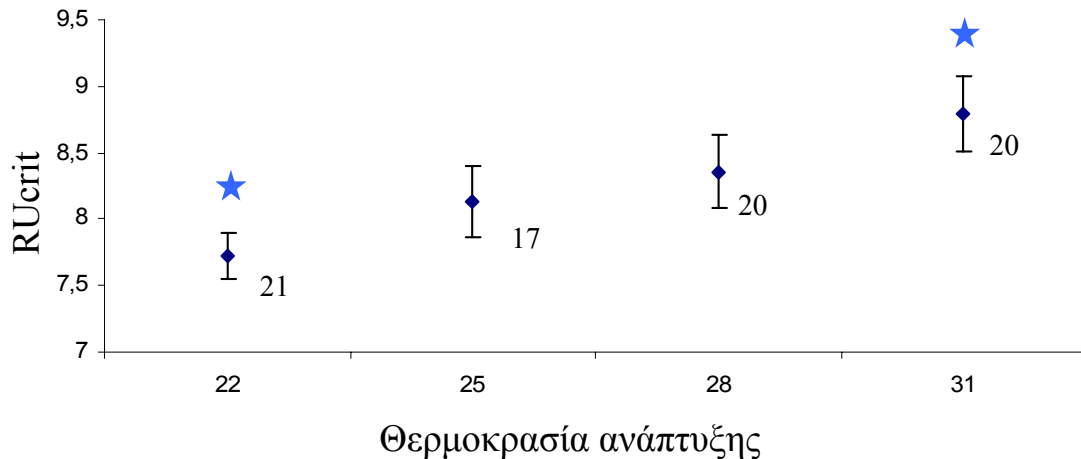
Η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των δεδομένων έδειξε ότι η θερμοκρασία εκτροφής είχε στατιστικά σημαντική επίδραση στην κολυμβητική ικανότητα των ατόμων ($H_{(3, N=78)} = 9,996, p < 0,05$, Kruskal-Wallis). Επίσης σε όλες τις περιπτώσεις δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επαναλήψεων του πειράματος (Α και Β) ($p > 0,05$, Mann-Whitney).

Τα αποτελέσματα της άσκησης για τον υπολογισμό της κολυμβητικής ικανότητας των αρσενικών ατόμων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.4.

Πίνακας 5.4. Σχετική κρίσιμη ταχύτητα, RU_{crit} (\pm S.D., τυπική απόκλιση; S.E., τυπικό σφάλμα) των ατόμων του πειράματος (n).

Θερμοκρασία	Επανάληψη	RU_{crit} ($TL\ sec^{-1}$)	\pm S.D.	\pm S.E.	n	Μέσος όρος επαναλήψεων
22°C	A	7,68	0,52	0,17	10	7,72
	B	7,76	0,99	0,30	11	
25°C	A	8,05	1,18	0,42	8	8,13
	B	8,20	1,09	0,36	9	
28°C	A	8,23	1,00	0,33	9	8,36
	B	8,46	1,45	0,44	11	
31°C	A	8,69	1,18	0,37	10	8,79
	B	8,89	1,39	0,44	10	

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα, τα αρσενικά που προήλθαν από εκτροφή σε 22°C, εμφάνισαν τη χαμηλότερη σχετική κρίσιμη ταχύτητα. Τα άτομα από 25 και 28°C φάνηκε να έχουν σχεδόν όμοια κολυμβητική ικανότητα, ενώ τα αρσενικά άτομα από 31°C εμφάνισαν τις υψηλότερες τιμές σχετικής κρίσιμης ταχύτητας. Από τα στοιχεία του Πίνακα 5.5 προέκυψε η εικόνα 5.5, που παρουσιάζει τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τα άτομα των δύο επαναλήψεων.



Εικόνα 5.5. RU_{crit} (\pm S.E., τυπικό σφάλμα) αρσενικών ατόμων στις 4 διαφορετικές θερμοκρασίες που χρησιμοποιήθηκαν. Οι αριθμοί δείχνουν τον αριθμό των ατόμων (N). ★, $P < 0.05$.

Από τη σύγκριση των διαφορετικών θερμοκρασιακών ομάδων, προκύπτει ότι τα άτομα από τους 22°C διέφεραν στατιστικά σημαντικά από αυτά από τους 31°C, ενώ οι υπόλοιποι πληθυσμοί δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά στη σχετική κρίσιμη ταχύτητα (Εικόνα 5.5).

Τέλος, τα δεδομένα των μετρήσεων μετά την άσκηση κολύμβησης καθώς και αυτά που μετρήθηκαν στις ψηφιακές φωτογραφίες μετά την τοποθέτηση των landmarks, παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.5. Για όλους τους χαρακτήρες αυτών, η στατιστική επεξεργασία (Mann-Whitney U-test) έδειξε ότι δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των ατόμων που προέρχονται από διαφορετική θερμοκρασία ανάπτυξης ($P > 0.05$).

Πίνακας 5.5. Μορφομετρικοί χαρακτήρες των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν στην άσκηση κολύμβησης (\pm S.D., τυπική απόκλιση). TL, ολικό μήκος; W, βάρος; BW, πάχος σώματος; BDmax, μέγιστο ύψος σώματος; BD, ύψος σώματος; CpD, ύψος ουραίου μίσχου.

	TL (mm)	\pm S.D.	W (g)	\pm S.D.	BW (mm)	\pm S.D.	BDmax (mm)	\pm S.D.	BD (mm)	\pm S.D.	Cpd (mm)	\pm S.D.
22	32,66	1,60	0,349	0,04	4,773	0,32	6,736	0,36	5,695	0,37	3,011	0,19
25	32,29	2,51	0,335	0,07	4,744	0,43	6,493	0,57	5,554	0,58	3,004	0,30
28	32,71	1,82	0,347	0,05	4,882	0,24	6,770	0,45	5,789	0,44	2,961	0,23
31	33,11	2,06	0,357	0,07	4,816	0,48	6,663	0,54	5,666	0,47	2,933	0,24

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Από την παρούσα εργασία, προκύπτει ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης κατά τα πρώτα στάδια της ζωής, επιδρά σημαντικά στη μετέπειτα ικανότητα του ατόμου να κολυμπάει αφού τα άτομα που εκτράφηκαν στους 22°C διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τα αντίστοιχα των 31°C, παρουσιάζοντας τη χαμηλότερη RU_{crit} , ενώ τα προερχόμενα από τις ενδιάμεσες θερμοκρασίες άτομα εμφάνισαν αντίστοιχα ενδιάμεσες κολυμβητικές επιδόσεις. Με την εξαίρεση μιας πολύ πρόσφατης εργασίας (Koumoundouros *et al.* 2009a), δεν υπάρχουν παρόμοια δημοσιευμένα αποτελέσματα σε κανένα είδος ψαριού καθώς οι υπάρχουσες μελέτες περιορίζονται στις άμεσες επιδράσεις της θερμοκρασίας κατά τις μετρήσεις της κολύμβησης (Johnston & Temple 2002, Koumoundouros *et al.* 2002b, McClelland *et al.* 2006, Koumoundouros *et al.* 2009b). Στην εργασία των Koumoundouros *et al.* (2009a), οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν δύο θερμοκρασίες ανάπτυξης (15 και 20°C) στο λαβράκι και αφού έφεραν εις πέρας τις δοκιμές κολύμβησης σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες νερού (15, 20, 25 και 28°C) διαπίστωσαν ότι τα άτομα με τη χαμηλότερη θερμοκρασιακά ιστορία (15 °C) ήταν αισθητά καλύτεροι κολυμβητές από εκείνα της υψηλής θερμοκρασίας (20°C). Αν και τα αποτελέσματα των Koumoundouros *et al.* (2009a) είναι αντίθετα από αυτά της παρούσας διατριβής καθώς διαπιστώνουν ότι η χαμηλότερη θερμοκρασία ανάπτυξης ευνοεί την κολυμβητική ικανότητα, εντούτοις το βασικό κοινό συμπέρασμα στο οποίο καταλήγουν και οι δύο εργασίες είναι ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης επηρεάζει τη μετέπειτα κολυμβητική ικανότητα των ατόμων.

Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί ποικιλοτρόπως: η θερμοκρασία ανάπτυξης επιδρά και επηρεάζει την οντογένεση των μυών (Johnston 1981,1993,2006, Koumoundouros *et al.* 2009a) επιφέροντας έτσι διαφορές στη μυϊκή μάζα (μέγεθος και αριθμός μυϊκών ινών) που οδηγούν σε διαφοροποίηση της κολυμβητικής επίδοσης. Οι Koumoundouros *et al.* (2009a) απέδειξαν ότι τα άτομα της χαμηλότερης θερμοκρασίας (που ήταν και καλύτεροι κολυμβητές) παρουσίαζαν μεγαλύτερο ποσοστό κόκκινων μυών

(σε σχέση με τους λευκούς) και μεγαλύτερο αριθμό κόκκινων μυϊκών ινών από ότι τα άτομα της υψηλότερης θερμοκρασίας.

Εκτός από την οντογένεση των μυών, η θερμοκρασία ανάπτυξης επιδρά σημαντικά και στο σχήμα του σώματος (Georgakopoulou et al. 2007a, Κεφ. 2, παρούσα διατριβή) και στους μεριστικούς χαρακτήρες (Blaxter 1992, Georgakopoulou et al. 2007a, Κεφ. 3, παρούσα διατριβή). Όπως είδαμε και στην εισαγωγή, το μέγεθος και το σχήμα είναι χαρακτήρες που επηρεάζουν την κολυμβητική ικανότητα. Οι Georgakopoulou et al. (2007a) μελετώντας το σχήμα του σώματος σε λαβράκια που είχαν αναπτυχθεί σε δύο θερμοκρασίες (15 ή 20°C), απέδειξαν ότι τα άτομα της χαμηλότερης θερμοκρασίας διέθεταν πιο λεπτό και επίμηκες σώμα από εκείνα της υψηλότερης, γεγονός που συμβάλει στην επίτευξη καλύτερων κολυμβητικών επιδόσεων, όπως προκύπτει από τους Koumoundouros et al. (2009a). Στην παρούσα εργασία, προσπαθήσαμε μετρώντας κάποιους εξωτερικά εμφανείς και εύκολα υπολογίσιμους μορφομετρικούς χαρακτήρες (TL, W, BDmax, BD, BW και CpD) να διαπιστώσουμε εάν κάποιος από αυτούς διαφοροποιείται αρκετά (μόνος του-αυτόνομα) ανάμεσα στις θερμοκρασίες ώστε να αποτελεί μία σαφή-άμεση ένδειξη της συμμετοχής του στην διαφοροποίηση της κολυμβητικής ικανότητας. Δεν προέκυψε όμως κάποια τέτοια συσχέτιση.

Οι McClelland et al (2006) σε εργασία τους πάνω σε αμφίβολης όμως ποιότητας και προέλευσης άτομα zebrafish (τα προμηθεύτηκαν από τοπικό κατάστημα κατοικίδιων ζώων της περιοχής τους) προσπάθησαν να μετρήσουν την κολυμβητική ικανότητα (U_{crit}) αφού πρώτα υπέβαλαν τα ενήλικα ψάρια τους σε παραμονή στους 18°C (από τους 28°C όπου ζούσαν κανονικά) για τέσσερις εβδομάδες. Μετά το πέρας των τεσσάρων εβδομάδων (και ύστερα από την κατάλληλη επαναφορά τους στην αρχική θερμοκρασία) έκαναν τις δοκιμές κολύμβησης και διαπίστωσαν ότι δεν παρουσίαζαν καμία διαφορά από εκείνα που είχαν παραμείνει όλο αυτό το διάστημα στους 28°C (control). Το αποτέλεσμα αυτό, σε συνάρτηση με το αντίστοιχο της παρούσας εργασίας, συνηγορεί στο ότι για να επιφέρει μόνιμη αλλαγή η θερμοκρασία, θα πρέπει να έχει επιδράσει κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης των ατόμων (εμβρυικό, νυμφικό στάδιο) και όχι απλά κάποια στιγμή στη ζωή τους.

Στην παρούσα μελέτη, τα άτομα εμφάνισαν σχετικές κρίσιμες ταχύτητες κολύμβησης που είχαν εύρος από 7,7 μήκη σώματος ανά δευτερόλεπτο ($TL \text{ sec}^{-1}$) έως 8,8 $TL \text{ sec}^{-1}$, με το μέσο όρο να είναι περίπου στα 8,3 $TL \text{ sec}^{-1}$. Οι τιμές αυτές, βρίσκονται σε συμφωνία με τις αντίστοιχες που υπολόγισαν οι Widmer *et al.* (2006) όπου η RU_{crit} κυμάνθηκε μεταξύ 8,5 και 9,5 $SL \text{ sec}^{-1}$ για zebrafish που μεγάλωσαν και ασκήθηκαν σε συνθήκες παρόμοιες με της παρούσας εργασίας. Οι συγγραφείς χρησιμοποίησαν το σταθερό μήκος (SL) για να εκφράσουν την RU_{crit} , έτσι η τιμή αυτή γίνεται ακόμα χαμηλότερη αν υπολογιστεί σε $TL \text{ sec}^{-1}$.

Ο Plaut (2000) από την άλλη αναφέρει ότι τα zebrafish άγριου τύπου ανέπτυξαν σχετικές κρίσιμες κολυμβητικές ταχύτητες της τάξεως των 15,5 $SL \text{ sec}^{-1}$ (περίπου 12,6 $TL \text{ sec}^{-1}$). Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκε παρόμοια κολυμβητική επίδοση, γεγονός που χρήζει εξήγησης καθώς το αρκετά μεγαλύτερο μέγεθος των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν από τον Plaut 2000 (44,3 mm TL έναντι 34,4 mm TL στην παρούσα εργασία) θα έπρεπε να οδηγεί σε χαμηλότερες RU_{crit} . Αυτό συμβαίνει, διότι η κολυμβητική ικανότητα αυξάνεται μη αναλογικά με την αύξηση του μήκους του σώματος (Jones *et al.* 1974, Beamish 1978, Hammer 1995), με αποτέλεσμα η σχετική κολυμβητική επίδοση να μειώνεται. Σε παρόμοιες τιμές κολύμβησης κατέληξαν και οι McClelland *et al.* (2006) σε δοκιμές που διεξήγαγαν σε αρκετά μεγάλο μεγέθους (~30 mm BL) ενήλικα άτομα zebrafish.

Σε προηγούμενη τους εργασία, οι Plaut & Gordon (1994) υπέβαλλαν άγριου τύπου άτομα zebrafish σε κολύμβηση ταχύτητας έως και 13 $SL \text{ sec}^{-1}$, χωρίς όμως να διαπιστώσουν κόπωση. Και σε αυτή την περίπτωση, αν και η ταχύτητα εκφράζεται σε $SL \text{ sec}^{-1}$ τα άτομα είναι αισθητά μεγαλύτερα (33,9 mm SL), οπότε θα έπρεπε να εμφανίζουν χαμηλότερη RU_{crit} από την αντίστοιχη της παρούσας εργασίας.

Ένας παράγοντας που θα μπορούσε να συμβάλλει στην παρατηρούμενη διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων είναι η διαφορετική θερμοκρασία κολύμβησης που εφαρμόστηκε, η οποία στην περίπτωση των μελετών των Plaut (2000), Plaut & Gordon (1994) και McClelland *et al.* (2006) ήταν 28°C, ενώ στην παρούσα εργασία ήταν 26,5°C και όπως είναι γνωστό σε υψηλότερες θερμοκρασίες κολύμβησης (έως κάποιο μέγιστο), επιτυγχάνονται υψηλότερες επιδόσεις (Beamish 1978, Koumoundouros *et al.* 2002b).

Επίσης, η μεθοδολογία της άσκησης κολύμβησης που ακολούθησαν οι Plaut (2000) και Plaut & Gordon (1994), διέφερε από εκείνη της παρούσας μελέτης στο ότι εφάρμοσαν μικρότερα χρονικά διαστήματα μεταξύ των βημάτων αύξησης της ταχύτητας (5 min αντί για 10 min που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη). Είναι λογικό λοιπόν να υποθέσει κανείς (αν και δεν υπάρχει σχετική μελέτη στην παγκόσμια βιβλιογραφία) ότι εάν τα ψάρια κολυμπούν για μικρότερα χρονικά διαστήματα στην κάθε ταχύτητα, θα καταφέρουν τελικά να επιτύχουν μεγαλύτερες U_{crit} πριν εξουθενωθούν. Τέλος, η συσκευή κολύμβησης που χρησιμοποιήθηκε στις προηγούμενες μελέτες είχε διαφορετικά χαρακτηριστικά, γεγονός που θα μπορούσε επίσης να συμβάλλει στην παρατηρούμενη απόκλιση των U_{crit} . Είναι αξιοσημείωτο ότι τα zebrafish έχουν μία εκπληκτική ικανότητα εντοπισμού των σημείων με μειωμένη ροή νερού (turbid water) και επιλέγουν τα σημεία αυτά κατά την κολύμβηση, ιδιαίτερα όταν η ταχύτητα της ροής στην οποία υποβάλλονται είναι πολύ υψηλή (Προσωπικές παρατηρήσεις). Στη συσκευή κολύμβησης που χρησιμοποίησαν οι Plaut (2000) και Plaut & Gordon (1994), ο θάλαμος κολύμβησης ήταν κλειστός και έτσι δεν επέτρεπε χειρισμούς (οπτικο-ακουστικά ερεθίσματα) ώστε να αποτρέπεται η κολύμβηση των ατόμων σε σημεία με μειωμένη ροή. Έτσι, αν τα ψάρια κολυμπούσαν για μεγάλα χρονικά διαστήματα σε σημεία του καναλιού με μικρότερη ταχύτητα ροής από τη θεωρητική, μπορούσαν να επιτύχουν υψηλότερες U_{crit} .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.

ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΣΤΟ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΣΤΟΥΣ ΜΥΕΣ ΤΟΥ ZEBRAFISH

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ενέργεια που απαιτείται από έναν οργανισμό για τις μεταβολικές του δραστηριότητες (όπως η κίνηση, η ανάπτυξη και η διατήρηση) προέρχεται από τα οργανικά υλικά με μια σειρά διεργασιών που καταλύονται από μια ποικιλία μεταβολικών ενζύμων. Μετρώντας κανείς τη δραστηριότητα βασικών μεταβολικών ενζύμων, μπορεί να αντλήσει πληροφορίες για την ενέργεια που παράγεται και συνεπώς θα μπορούσαν αυτά τα ένζυμα να χρησιμοποιηθούν ως βιοχημικοί δείκτες (Houlihan *et al.* 1993, Ferron & Leggett 1994). Η γλυκόλυση αποτελεί μια πολύ σημαντική πηγή μεταβολικής ενέργειας η οποία κάτω από αναερόβιες συνθήκες οδηγεί στην παραγωγή γαλακτικού οξέος και η τύχη της αντίδρασης ρυθμίζεται από το ένζυμο δευδρογενάση (De Silva & Anderson 1995). Ο κύκλος του κιτρικού οξέος από την άλλη αποτελεί το πιο σημαντικό μονοπάτι παραγωγής ενέργειας στους μύες των ψαριών που λειτουργούν κάτω από αναερόβιες συνθήκες (Alp *et al.* 1976, Somero & Childress 1985).

Τόσο στον αερόβιο, όσο και στον αναερόβιο μεταβολισμό, η απόδοση των υπεύθυνων κάθε φορά ενζύμων έχει βρεθεί να αντιδρά σε διάφορους παράγοντες επηρεάζοντας έτσι την παραγωγή της ενέργειας αλλά και την διαθεσιμότητα αυτής κάτω από διαφορετικές συνθήκες (Houlihan *et al.* 1993, Ferron & Leggett 1994). Έτσι, μελέτες έχουν δείξει μια σημαντική σχέση μεταξύ των ενζύμων που ρυθμίζουν την παραγωγή της ενέργειας και της σωματικής αύξησης σε διάφορα είδη ψαριών (Mathers *et al.* 1992a,b, Pelletier *et al.* 1993a,b). Επίσης, αυτά τα ένζυμα είναι ευαίσθητα στο καθεστώς χορήγησης της τροφής σε νύμφες και ενήλικα άτομα πολλών ειδών ψαριών και παρουσιάζουν μειωμένη δράση στην έλλειψη τροφής (Sullivan & Somero 1983, Clarke *et al.* 1992, Yang & Somero 1993). Επιπλέον έχει βρεθεί ότι αποτελούν ευαίσθητους δείκτες της θερμοκρασίας εγκλιματισμού (Guderley & Gawlicka 1992). Οι Yang & Somero (1993) έδειξαν ότι υπάρχει έντονη εξάρτηση μεταξύ του βάθους στο οποίο βρίσκεται ένα ψάρι και της μεταβολικής δράσης των ενζύμων του με τα τελευταία να αποδίδουν καλύτερα στα υψηλότερα στρώματα της θάλασσας. Ακόμη, έχει γίνει μια σειρά από άλλες μελέτες που συνδέουν το γαλακτικό οξύ με το «stress» που προέρχεται από τους χειρισμούς κατά την εκτροφή (Barnett & Pankhurst 1998, Thomas *et al.* 1999),

με τους εποχιακούς κύκλους (Wells & Mcardle 2002) και με την τοξικότητα των νερών (Sancho *et al.* 1999).

Πέρα όμως από όλα τα παραπάνω, ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια μελετούνται ευρέως οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στον μεταβολισμό των ψαριών σε συνάρτηση με την έντονη άσκηση (Milligan & Girard 1993, Chaplin *et al.* 1997, Thomas *et al.* 1999, Paton *et al.* 2001). Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στους μύες των ψαριών κατά την άσκηση καθώς και η ταχύτητα της αποδόμησής του αργότερα αποτελεί χαρακτηριστικό ιδιαίτερης σημασίας καθώς είναι άμεσα συνυφασμένο με την ικανότητα του οργανισμού για κολύμβηση (Beamish 1978, Wood 1991, Milligan 1996, Kieffer 2000).

Η ενέργεια που απαιτείται για τη συστολή των μυών, προέρχεται από υδρόλυση της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP) σε διφωσφορική αδενοσίνη (ADP) και ανόργανο φωσφορικό άλας (phosphate). Η πορεία του ATP μέσω του καταβολισμού οργανικών ενώσεων, μπορεί να γίνει είτε σε αερόβιες είτε σε αναερόβιες συνθήκες. Ο αερόβιος μεταβολισμός, είναι πιο αποδοτικός σε επίπεδο παραγωγής ενέργειας, αλλά και οι δύο προσφέρουν συγκεκριμένα πλεονεκτήματα στην κολύμβηση των τελεόστεων (Beamish 1978).

Στην περίπτωση των κολυμβήσεων σταθερής ταχύτητας, η μεταφορά της ενέργειας επιτυγχάνεται μέσω αερόβιων διαδικασιών (Beamish 1978, Jones 1982, Guderley 2004), έτσι ώστε η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται να είναι ανάλογη του έργου που εκτελείται. Στην ουσία, η μεταβολική απαίτηση (metabolic demand) ισοδυναμεί με τη μεταβολική παροχή (metabolic supply), ενώ η παραγωγή άχρηστων μεταβολικών προϊόντων (waste products) αντισταθμίζεται από την απομάκρυνσή – αποικοδόμησή τους (Jones 1982). Κύρια πηγή ενέργειας σε αυτές τις κολυμβήσεις, είναι τα λιπαρά οξέα με μακριές αλυσίδες και δευτερευόντως οι πρωτεΐνες και το γλυκογόνο (Beamish 1978).

Εκ πρώτης όψεως, οι παρατεταμένες κολυμβήσεις φαίνεται να στηρίζονται σε αερόβιο μεταβολισμό (Guderley 2004). Στην πραγματικότητα όμως, η ενέργεια που χρησιμοποιούν τα ψάρια σε αυτές, προέρχεται από αερόβιο αλλά και από αναερόβιο μεταβολισμό, με τη συνεισφορά του δεύτερου να αυξάνει όσο αυξάνει η ένταση της

άσκησης (Beamish 1978). Γι' αυτό, εκτός από τους «αργούς» κόκκινους μύες (που χρησιμοποιούνται κατά την αερόβια άσκηση), ροζ και άσπρες μυϊκές ίνες παίρνουν μέρος στις κολυμβήσεις αυτές, ειδικά σε ταχύτητες κοντά στην U_{crit} (Jones 1982). Όταν ξεπεραστεί η ικανότητα του αερόβιου μεταβολισμού, σε περιπτώσεις έντονης «prolonged» κολύμβησης, το ATP συντίθεται από αναερόβια γλυκόλυση του αποθηκευμένου στους μύες γλυκογόνου και το τελευταίο προϊόν της γλυκόλυσης, το γαλακτικό οξύ, διαχέεται από τους μύες προς την κυκλοφορία του αίματος (Beamish 1978). Σε τέτοιου τύπου κολυμβήσεις, η κόπωση επέρχεται εξαιτίας α) της διακοπής της παροχής μεταβολιτών στους μύες (Jones 1982), β) της εξάντλησης των αποθεμάτων γλυκογόνου στους μύες και γ) της υπερβολικής συσσώρευσης γαλακτικού οξέως σε αυτούς (Beamish 1978).

Σε περιπτώσεις εξαιρετικά έντονης άσκησης, μπορεί να επέλθει θάνατος κατά τη διάρκεια της ανάνηψης του ψαριού, μετά το τέλος της άσκησης (recovery period), πιθανώς εξαιτίας της διαταραχής της ισορροπίας οξέων-βάσεων μαζί με τη μειωμένη συγγένεια της αιμοσφαιρίνης για οξυγόνο και – σε περιπτώσεις περίσσειας γαλακτικού οξέως – τη μειωμένη συγγένεια για διοξειδίο του άνθρακα. Αν δεν επέλθει τελικά θάνατος, η αυξημένη κατανάλωση οξυγόνου από το ψάρι, δε συμβάλλει μόνο στην κάλυψη των αναγκαίων μεταβολικών αναγκών, αλλά και στην αποκατάσταση των αποθηκευμένων στους μύες αποθεμάτων ATP, φωσφορικής κρεατίνης (creatine phosphate) και γλυκογόνου (Beamish 1978).

Το stress που συνδέεται με την εξαντλητική άσκηση είναι φαινόμενο αρκετά συχνό κυρίως στις εγκαταστάσεις ιχθυοκαλλιέργειας. Ακόμη, χειρισμοί των ψαριών όπως μεταφορά, διαλογή και χρησιμοποίηση αποχών, έχουν μεγάλη πιθανότητα να επηρεάζουν σημαντικά το μεταβολισμό των ψαριών (Moyes & West 1995). Τέτοιοι παράγοντες stress συχνά συνδέονται ακόμη και με θάνατο. Για αυτόν ακριβώς το λόγο, σε πλήθος μελετών έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στην ανάρρωση των ψαριών μετά από έντονο stress ή άσκηση και στο πώς και πότε επανέρχεται ο μεταβολισμός στα φυσιολογικά επίπεδα (Milligan & Girard 1993, Barnett & Pankhurst 1998, Thomas *et al.* 1999, Paton *et al.* 2001). Η ανάρρωση ενός ατόμου έπειτα από έντονο stress εξαρτάται

από το είδος του ψαριού, από την κατάσταση στην οποία αυτό βρίσκεται και φυσικά από όλους τους εμπλεκόμενους περιβαλλοντικούς παράγοντες (Rossiter 1996).

Λόγω της μεγάλης μεταβολικής σημασίας του, τόσο τα επίπεδα του γαλακτικού οξέος στους μύες, όσο και οι ρυθμοί απομάκρυνσης τους κατά την περίοδο της ξεκούρασης (recovery) έχουν γίνει αντικείμενο μελέτης πολλών συγγραφέων κυρίως όμως σε ψάρια οικονομικής σημασίας όπως τα λαβράκια (Young & Cech 1993, 1994, Davison 1997, Suski *et al.* 2006, Sfakianakis & Kentouri *in press*) ο σολομός του Ατλαντικού (Davison 1997, Thomas *et al.* 1999, Hyvarinen *et al.* 2004) και η ιριδίζουσα πέστροφα (Milligan & Girard 1993, Davison 1997, Milligan 1996, Richards *et al.* 2002, Clutterham *et al.* 2004). Βέβαια, οι περισσότεροι ερευνητές που ασχολούνται με το θέμα, μελετούν κυρίως τις επιπτώσεις που έχει το «angling» (σύλληψη ψαριών και απελευθέρωσή τους) στους φυσικούς πληθυσμούς για να ελαχιστοποιήσουν τις αρνητικές συνέπειες του ιδιόμορφου αυτού παιχνιδιού (Gustaveson *et al.* 1991, Kieffer *et al.* 1995, 2002, Wilkie *et al.* 1996, Milligan 1996, Kieffer 2000, Suski *et al.* 2003, 2006, Clutterham *et al.*, 2004).

Όσον αφορά στο zebrafish, δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα δημοσιευμένες εργασίες σχετικά με το γαλακτικό οξύ στους μύες του, ενώ υπάρχουν μόλις δύο αναφορές για το γαλακτικό οξύ στο σύνολο του σώματός του (Plaut & Gordon 1994, Widmer *et al.* 2006). Επίσης, είναι γενικότερα λίγες οι εργασίες που έχουν ασχοληθεί με το γαλακτικό οξύ σε μύες ψαριών (Young & Cech 1993, 1994, Davison 1997, Hardewig *et al.* 1998, Milligan *et al.* 2000, Richards *et al.* 2002). Μελέτες της επίδρασης της θερμοκρασίας του νερού στα επίπεδα του γαλακτικού οξέος (στο αίμα ή στο σύνολο του σώματος) υπάρχουν πολλές (Hochachka 1988, Moyes *et al.* 1992, Milligan *et al.* 2000, Richards *et al.* 2002, Galloway & Kieffer 2003, Hyvarinen *et al.* 2004, Sfakianakis & Kentouri *in press*) αλλά η παρούσα εργασία είναι η μοναδική που εξετάζει την επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης.

Στην παρούσα εργασία λοιπόν μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας εκτροφής στο μέγιστο επίπεδο που μπορεί να ανέλθει η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στους μύες (κατά την έντονη άσκηση) και στην ταχύτητα απομάκρυνσής του μετά την άσκηση και κατά τη διάρκεια της ξεκούρασης/αποκατάστασης (recovery). Και τα

δύο αυτά χαρακτηριστικά έχουν άμεση σχέση με την ικανότητα κολύμβησης του ατόμου καθώς ρυθμίζουν το φυσικό εκείνο «εμπόδιο» που ονομάζεται μυϊκή κόπωση (Wood 1991).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Όπως και στο Κεφ. 4, η θερμοκρασία που επιλέχθηκε για τον εγκλιματισμό των ψαριών, ήταν η ενδιάμεση από τις τέσσερις θερμοκρασίες εκτροφής που χρησιμοποιήθηκαν, δηλαδή 26,5°C. Επίσης, οι διαδικασίες εγκλιματισμού και συλλογής των ατόμων έγιναν με τον τρόπο που περιγράφονται στο Κεφ. 5.

Σκοπός του πειράματος αυτού ήταν, αφού υπολογιστούν τα μέγιστα επίπεδα συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέως στους μύες των ιχθυδίων λόγω έντονης άσκησης, να εκτιμηθεί ο ρυθμός απομάκρυνσής του μετά την άσκηση και κατά την περίοδο της ξεκούρασης (recovery).

Προς τούτο, τα άτομα υπεβλήθησαν σε κολύμβηση μέχρι την πλήρη εξουθένωσή τους, δηλαδή μέχρι να μη μπορούν πλέον να αντιδράσουν στο ρεύμα και να παρασύρονται από αυτό. Για να υπολογιστεί η ταχύτητα απομάκρυνσης του γαλακτικού οξέως από τους μύες, και άρα ο χρόνος που χρειάζεται ο οργανισμός για να επανέλθει σε φυσιολογικά επίπεδα (επίπεδα πριν την άσκηση) τα άτομα, μόλις διαπιστωνόταν η πλήρης εξουθένωσή τους, τοποθετούνταν σε χωριστά ενυδρεία (σε νερό της ίδιας θερμοκρασίας με αυτό της συσκευής κολύμβησης σε συνθήκες σκότους) μέχρι και τη στιγμή της δειγματοληψίας τους.

Στο σύνολό της, η διαδικασία κολύμβησης και δειγματοληψίας συνοψίζεται στα εξής:

- Αφού υπολογίζονταν το μέσο TL σε δείγμα 5 ατόμων, ρυθμίζονταν η συσκευή κολύμβησης σε ρεύμα νερού ίσο με 2 TL/sec. Τα ψάρια τοποθετούνταν μέσα στο κανάλι τρεξίματος και κάθε 10 λεπτά η ταχύτητα αυξανόταν κατά περίπου 1,5-2 TL/sec μέχρι και την πλήρη εξουθένωση.
- Οι δειγματοληψίες που έγιναν στις τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες ήταν επτά κάθε φορά και συμπεριελάμβαναν:
 1. 5 άτομα πριν την άσκηση (A, αρχή άσκησης)
 2. 5 άτομα τη στιγμή της πλήρους εξουθένωσης (T, τέλος άσκησης)

3. 5 άτομα που είχαν ξεκουραστεί για μισή ώρα (0,5h)
4. 5 άτομα που είχαν ξεκουραστεί για μία ώρα (1h)
5. 5 άτομα που είχαν ξεκουραστεί για τρεις ώρες (3h)
6. 5 άτομα που είχαν ξεκουραστεί για έξι ώρες (6h)
7. 5 άτομα που είχαν ξεκουραστεί για εννιά ώρες (9h)

Πρέπει να σημειωθεί ότι δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στο να αποφευχθούν επιπρόσθετοι χειρισμοί που ενδεχομένως θα προκαλούσαν στρες στα ψάρια, προκειμένου να αποφευχθεί οποιαδήποτε αύξηση των επιπέδων γαλακτικού οξέος (Grutter & Pankhurst 2000, Fanouraki *et al.* 2007, Wilkinson *et al.* 2008). Επίσης, οι διαδικασίες δειγματοληψίας, συντήρησης και μέτρησης του γαλακτικού οξέος, πραγματοποιήθηκαν με συνεχή χρήση γαντιών. Τα δείγματα που εμφάνισαν εξαιρετικά μεγάλες τιμές γαλακτικού οξέος (πολλαπλάσιες των υπόλοιπων δειγμάτων) εξαιτίας κάποιας πιθανής επιμόλυνσης, εξαιρέθηκαν από τη μελέτη. Στο σύνολο, χρησιμοποιήθηκαν 140 άτομα για τη μελέτη του γαλακτικού οξέος.

Διαδικασία ομογενοποίησης

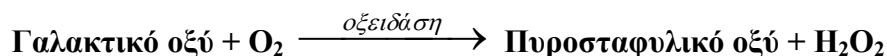
Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέως χρησιμοποιήθηκε ολοκληρωμένο σύστημα μέτρησής του (kit LactPap, 61 192, bioMérieux, France). Επειδή όμως το kit αυτό είναι σχεδιασμένο για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέως στο πλάσμα και όχι στους ιστούς, οι ιστοί έπρεπε να μετατραπούν σε διάλυμα μετρήσιμο από το kit. Έτσι εφαρμόστηκε η διαδικασία ομογενοποίησης που προτείνεται από τους Barnett & Pankhurst (1998).

Τα δείγματα αποψύχθηκαν και αφαιρέθηκαν τα περιττά μέρη (σπλαχνική μάζα, πτερύγια κλπ). Έπειτα, επιλέχθηκαν περίπου 150 mg ιστού από το οπίσθιο τμήμα του ψαριού που βρίσκονται στην πλειοψηφία τους οι λευκοί μύες. Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με χρήση ηλεκτρικού μαχαιριού (Ultra Turrax, T25 basic, IKA Labortechnik, Germany) παρουσία 1,5 ml 0,6 M perchloric acid (PCA) για κάθε 150 mg ιστού. Στη συνέχεια, το ομογενοποιημένο διάλυμα φυγοκεντρήθηκε για 15 min στις 3000

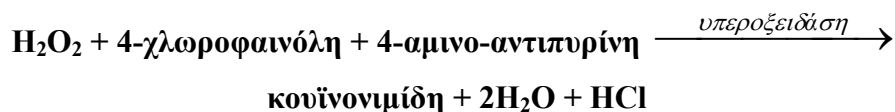
rpm και διαχωρίστηκε το υπερκείμενο διάλυμα (Barnett & Pankhurst 1998) στο οποίο μπορούσε πλέον να υπολογιστεί η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέως με τη βοήθεια του kit.

Μέτρηση συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος

Η αρχή της μεθόδου του kit είναι ενζυματική – χρωματομετρική: το γαλακτικό οξύ του ιστού αντιδρά με το μοριακό οξυγόνο (O₂) παρουσία του ενζύμου οξειδάση του γαλακτικού οξέος, με αποτέλεσμα να μετατρέπεται σε πυροσταφυλικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου (H₂O₂).



Στη συνέχεια το υπεροξειδίο του υδρογόνου αντιδρά με 4-χλωροφαινόλη και 4-αμινο-αντιπυρίνη που περιέχονται στο αντιδραστήριο εργασίας (Reagent 3, R3, Πίνακας 4). Από την αντίδραση αυτή παράγονται κουϊνονιμίδη (quinoneimine), νερό (H₂O) και υδροχλώριο (HCl).



Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στο ομογενοποιημένο διάλυμα, ακολουθήθηκαν τα εξής βήματα, σύμφωνα με το πρωτόκολλο του kit (βλ. και Πίνακα Δ1):

1. Αρχικά κατασκευάστηκε το αντιδραστήριο εργασίας (R3) με την προσθήκη 10 ml ρυθμιστικού διαλύματος (pH = 6.8, Reagent 2, R2) στο φιαλίδιο που περιείχε τα ένζυμα σε λυοφιλοποιημένη μορφή.

2. Τοποθετήθηκαν με πιπέτα Gilson 10 μl από το διάλυμα κάθε δείγματος και 1 ml από το αντιδραστήριο εργασίας (R3) σε φιαλίδια erpendorf.
3. Κατασκευάστηκαν επίσης σε φιαλίδια erpendorf α) το τυφλό διάλυμα (blank) προσθέτοντας 1 ml από το αντιδραστήριο εργασίας και β) το πρότυπο διάλυμα (standard) προσθέτοντας 1 ml από το αντιδραστήριο εργασίας και 10 μl από το αντιδραστήριο γνωστής συγκέντρωσης (3.00 mmol LAC l^{-1} , Reagent 1, R1).
4. Έγινε ανάδευση των φιαλιδίων σε αναδευτήρα (Vortex) και τα δείγματα επώαστηκαν για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Τέλος, τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε ειδικές πλαστικές κυβέττες και μετρήθηκε η απορρόφησή τους έναντι τυφλού, σε μήκος κύματος 505 nm στο φωτόμετρο (Helios, Thermo Scientific, USA).

Πίνακας 6.1. Πρωτόκολλο του LactPap (61 192), της bioMérieux.

	<i>Τυφλό (Blank)</i>	<i>Πρότυπο (Standard)</i>	<i>Δείγμα</i>
Αντιδραστήριο R1	-	10 μl	-
Δείγμα	-	-	10 μl
Αντιδραστήριο R3	1 ml	1 ml	1 ml

Η ένταση του χρώματος και η απορρόφηση του διαλύματος στα 505 nm, είναι ανάλογες της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στον ιστό. Ο υπολογισμός της ποσότητας του γαλακτικού οξέος ανά βάρος ιστού (σε $\mu\text{mol g}^{-1}$) γίνεται με τον τύπο:

$$\left[\left(\left(\left(\left(\text{Ab}_\Delta / \text{Ab}_\text{S} \right) \times \text{C} \right) / 1000 \right) \times 10 / 1000 \right) \times 1650 / 10 \right] \times 1000 / \text{W} \times 1000$$

Όπου: Ab_Δ = τιμή απορρόφησης δείγματος,

Ab_S = τιμή απορρόφησης πρότυπου διαλύματος (standard),

C = συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος (σε mmol l^{-1}),

W = βάρος ιστού (σε mg),

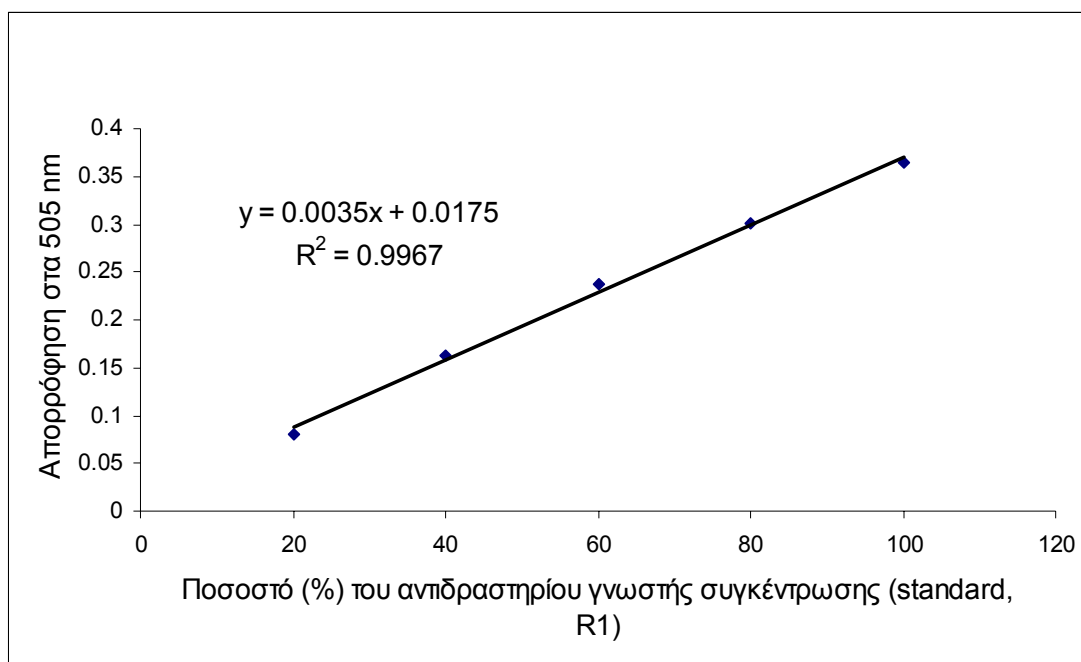
10 (μl): ο όγκος του υπερκείμενου διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε,

1650 (μl): ο όγκος του ομογενοποιημένου με PCA διαλύματος (κατά προσέγγιση)

Για να ελεγχθεί η πιστότητα των μετρήσεων του φωτόμετρου, πραγματοποιήθηκε «δοκιμή γραμμικότητας» (linearity test, Πίνακας 6.2, Εικόνα 6.1) μετρώντας πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις (100%, 80%, 60%, 40% και 20%) του αντιδραστηρίου γνωστής συγκέντρωσης που παρεχόταν από το kit (R1).

Πίνακας 6.2. Οι μετρήσεις του φωτόμετρου για τις 5 συγκεντρώσεις του linearity test.

<i>Ποσοστό του αντιδραστηρίου γνωστής συγκέντρωσης (R1)</i>	<i>Απορρόφηση στα 505 nm</i>
100%	0,364
80%	0,301
60%	0,237
40%	0,162
20%	0,081



Εικόνα 6.1. Το διάγραμμα που προέκυψε από το linearity test. Το R^2 είναι πολύ κοντά στο 1, άρα η μέθοδος μπορεί να χαρακτηριστεί γραμμική.

Η διαδικασία ομογενοποίησης των ιστών και μέτρησης της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε εξολοκλήρου στο Εργαστήριο Βιοχημείας της Δρ. Ε. Παπακωνσταντή, στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Για την ανάλυση των δεδομένων του γαλακτικού οξέος, πραγματοποιήθηκαν τα μη παραμετρικά Kruskal-Wallis και Mann-Whitney U τεστ για την εύρεση των διαφορών μεταξύ των ομάδων. Όλη η επεξεργασία των δεδομένων και η στατιστική ανάλυση, πραγματοποιήθηκαν σε ηλεκτρονικό υπολογιστή με τη χρήση του Microsoft Excel (2003) και του Statistica (7.0.61.0, StatSoft).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα του γαλακτικού οξέος για τα ψάρια όλων των θερμοκρασιών που χρησιμοποιήθηκαν δίνονται στους παρακάτω πίνακες (6.3-6.6) και στην εικόνα 6.2.

Πίνακας 6.3: Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος (μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση) στις διαφορετικές δειγματοληπτικές περιόδους στα άτομα των 22 °C.

Χρόνος	Μέσος όρος	Τυπ. Απόκλιση
A	12,80	0,96
T	19,22	2,36
0,5H	15,60	1,20
1H	12,63	0,76
3H	8,38	0,71
6H	8,19	1,37
9H	8,39	0,18

Πίνακας 6.4: Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος (μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση) στις διαφορετικές δειγματοληπτικές περιόδους στα άτομα των 25 °C.

Χρόνος	Μέσος όρος	Τυπ. Απόκλιση
A	10,80	1,20
T	19,15	2,53
0,5H	10,92	0,67
1H	8,81	0,58
3H	8,40	1,51
6H	7,38	0,76
9H	8,49	1,46

Πίνακας 6.5: Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος (μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση) στις διαφορετικές δειγματοληπτικές περιόδους στα άτομα των 28 °C.

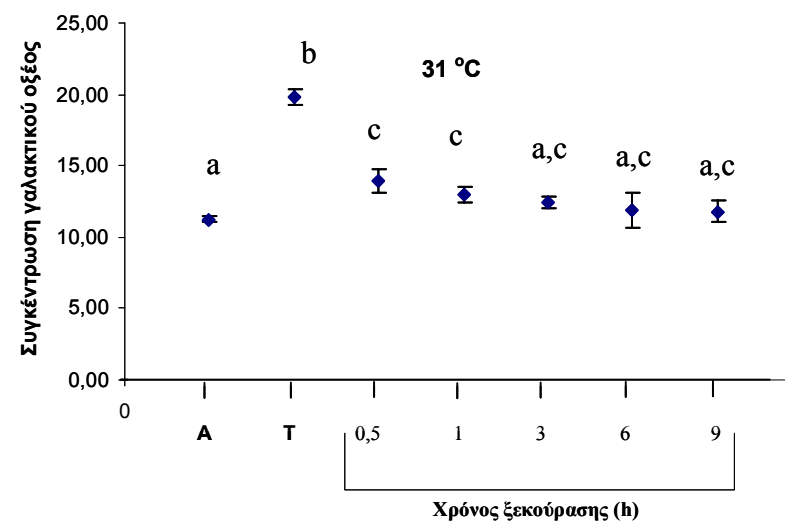
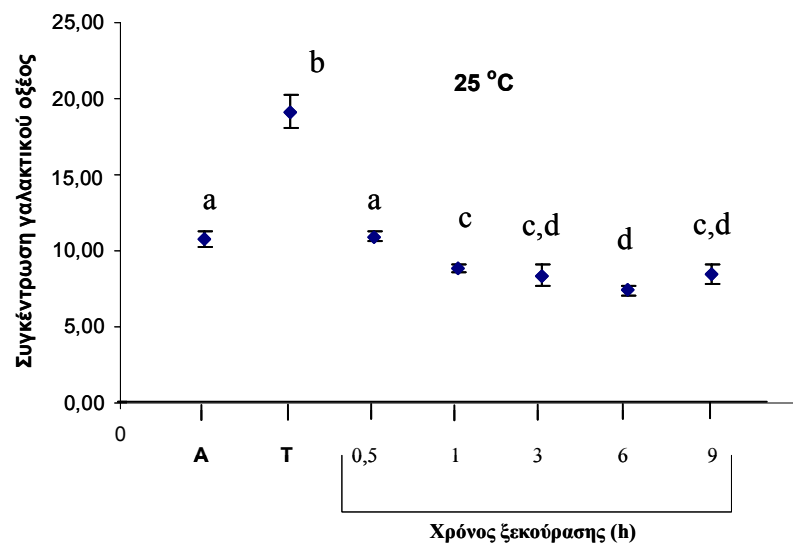
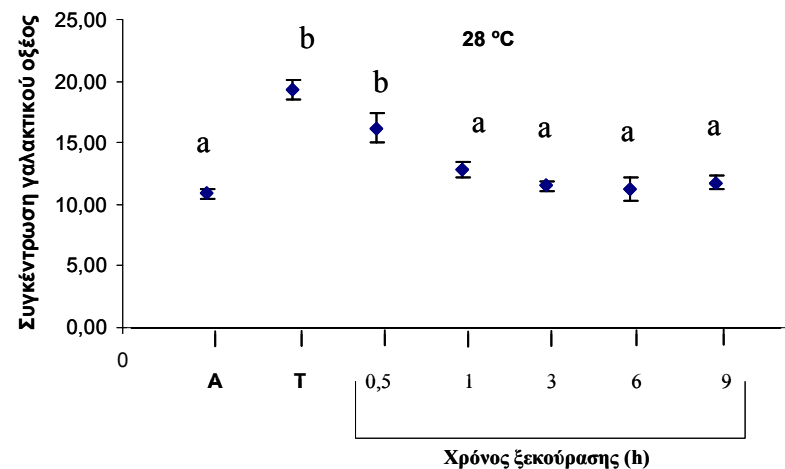
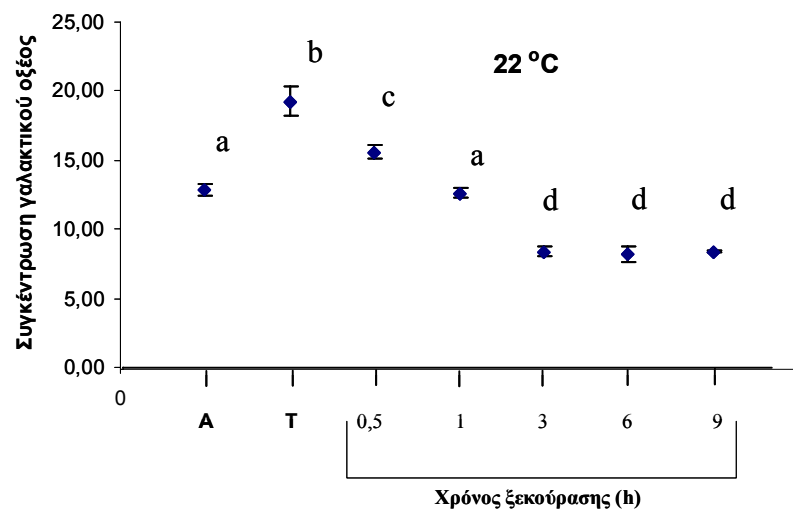
Χρόνος	Μέσος όρος	Τυπ. Απόκλιση
A	10,85	0,92
T	19,31	1,73
0,5H	16,17	2,61
1H	12,79	1,51
3H	11,48	0,74
6H	11,19	2,19
9H	11,76	1,28

Πίνακας 6.6: Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος (μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση) στις διαφορετικές δειγματοληπτικές περιόδους στα άτομα των 31 °C.

Χρόνος	Μέσος όρος	Τυπ. Απόκλιση
A	11,26	0,57
T	19,83	1,30
0,5H	13,95	1,85
1H	12,99	1,32
3H	12,42	0,95
6H	11,91	2,76
9H	11,81	1,80

Από τα παραπάνω δεδομένα προέκυψε η εικόνα 6.2 η οποία αναπαριστά τις μεταβολικές διαφορές στους μύες των ψαριών που προέρχονται από διαφορετικές θερμοκρασίες εκτροφής.

Πραγματοποιήθηκε επίσης η εύρεση στατιστικών διαφορών μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιών σε κάθε δειγματοληπτική περίοδο (Πίνακας 6.7) ώστε να διαπιστωθεί τυχόν επίδραση της θερμοκρασίας και στα επιμέρους σημεία.



Εικόνα 6.2: Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος (Μέσος ± S.E.) σε σχέση με τη δειγματοληπτική περίοδο στις 4 διαφορετικές θερμοκρασίες. Τα διαφορετικά γράμματα υποδηλώνουν στατιστική διαφοροποίηση μεταξύ των δειγματοληπτικών περιόδων σε κάθε θερμοκρασία ($P < 0,05$)

A	25 °C	28 °C	31 °C	T	25 °C	28 °C	31 °C
22 °C	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	22 °C	-	-	-
25 °C		-	-	25 °C		-	-
28 °C			-	28 °C			-
0,5H	25 °C	28 °C	31 °C	1H	25 °C	28 °C	31 °C
22 °C	<i>P</i> <0.05	-	-	22 °C	<i>P</i> <0.05	-	-
25 °C		<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	25 °C		<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05
28 °C			-	28 °C			-
3H	25 °C	28 °C	31 °C	6H	25 °C	28 °C	31 °C
22 °C	-	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	22 °C	-	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05
25 °C		<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05	25 °C		<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05
28 °C			-	28 °C			-
9H	25 °C	28 °C	31 °C				
22 °C	-	<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05				
25 °C		<i>P</i> <0.05	<i>P</i> <0.05				
28 °C			-				

Πίνακας 6.7 Στατιστική διαφοροποίηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος σε κάθε δειγματοληπτική περίοδο ανάμεσα στις 4 διαφορετικές θερμοκρασίες. -, στατιστικά όμοια (Mann-Whitney U test).

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η συσσώρευση του γαλακτικού οξέος στους μύες και, στη συνέχεια, ο ρυθμός απομάκρυνσής (αποικοδόμησης) του από αυτούς, καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα άσκησης κάθε οργανισμού (Wood 1991). Στην παρούσα μελέτη η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στους μύες διέφερε στατιστικά σημαντικά ανάμεσα στα άτομα που βρίσκονταν σε κατάσταση ηρεμίας (control) και σε αυτά που προέρχονταν από εξουθένωση (fatigue) σε όλες τις περιπτώσεις ($p < 0.001$). Αυτό επιβεβαιώνει την ορθότητα της άσκησης κολύμβησης για την εξουθένωση των ατόμων και τον προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος μετά από αυτήν, αφού είναι γνωστό ότι η συγκέντρωσή του αυξάνεται δραστικά μόνο κατά τον αναερόβιο μεταβολισμό, σε ταχύτητες κοντά στην U_{crit} , λίγο πριν εξαντληθεί το ψάρι (Beamish 1978).

Η απόκριση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες σε συνάρτηση με την έντονη άσκηση όπως παρουσιάζεται σε αυτήν τη διατριβή, ακολουθεί το ίδιο πρότυπο με άλλες μελέτες σε άλλα είδη ψαριών (Davison 1997, Hardewig *et al.* 1998, Richards *et al.* 2002, Sfakianakis & Kentouri *in press*). Σύμφωνα με αυτό, η συγκέντρωση ανεβαίνει συνεχώς κατά τη διάρκεια της άσκησης μέχρι να φτάσει σε ένα μέγιστο (μυϊκή κόπωση) και μετά αρχίζει να πέφτει κατά τη διάρκεια της ξεκούρασης. Σε κάποιες μελέτες, έχει αναφερθεί ότι το γαλακτικό οξύ συνεχίζει να αυξάνει σε συγκέντρωση αμέσως μετά την άσκηση και για περίπου μισή ώρα ακόμη (Richards *et al.* 2002, Sfakianakis & Kentouri *in press*), ενώ σε άλλες, το γαλακτικό φτάνει στο μέγιστο του μόλις τερματίζεται και η άσκηση (Milligan *et al.* 2000, Sfakianakis & Kentouri *in press*). Στην εργασία των Sfakianakis & Kentouri (*in press*) παρατηρήθηκαν και τα δύο πρότυπα, σαν αποτέλεσμα των διαφορετικών θερμοκρασιών νερού, όπως άλλωστε είχε συμβεί και στο παρελθόν (Young & Cech 1993, 1994).

Εξετάζοντας τα δεδομένα (Εικ. 6.2, Πίν. 6.7), προκύπτει το συμπέρασμα ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης δεν επηρεάζει τη συγκέντρωση του γαλακτικού ούτε στην αρχή αλλά ούτε και στο τέλος της άσκησης. Εξαίρεση σε αυτό αποτελούν μόνο τα άτομα των 22 °C τα οποία διαφέρουν από όλα τα υπόλοιπα στην αρχή της άσκησης (δηλ. στην

κατάσταση ηρεμίας), γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στο αυξημένο “stress” λόγω της πολύ χαμηλής θερμοκρασίας του νερού (Milligan & Girard 1993). Συγκρίνοντας τα ψάρια των 2 ακραίων θερμοκρασιών (22°C με 31°C, Εικ. 6.2), φαίνεται ότι τα τελευταία αποκαθίστανται πιο γρήγορα αφού καταλήγουν στο «plateau» στη μισή ώρα ξεκούρασης έναντι των πρώτων που χρειάζονται 3 ώρες. Τα ψάρια των ενδιάμεσων θερμοκρασιών φαίνεται να βρίσκονται κάπου ενδιάμεσα όσον αφορά το ρυθμό αποκατάστασης των μυών τους (Εικ. 6.2). Επίσης, προκύπτει μια σαφής διαφοροποίηση μεταξύ των 2 χαμηλών (22 και 25°C) και των 2 υψηλών θερμοκρασιών (28 και 31°C) όσον αφορά στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στο τέλος της αποκατάστασης (3H, 6H, 9H; Πίνακας 6.7). Στις χαμηλές, σταθεροποιείται σε χαμηλότερα επίπεδα από ότι στις υψηλές παρότι οι τιμές τους πριν την άσκηση δε διέφεραν.

Είναι γνωστό ότι τροποποίηση της θερμοκρασίας διαβίωσης ενός ψαριού, επηρεάζει σημαντικά πλήθος φυσιολογικών διεργασιών του οργανισμού (Beamish 1970, Reeves 1977, Hochachka 1988, Hazel 1993, 1995, Somero 1995). Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι το πιο κρύο νερό εμπεριέχει μεγαλύτερες ποσότητες διαλυμένου οξυγόνου και επιβραδύνει το μεταβολικό ρυθμό στα ψάρια (Diana 1983). Επίσης, μέχρι πρόσφατα, ήταν γνωστό ότι όσο πιο κρύο ήταν το νερό κατά την περίοδο αποκατάστασης (recovery) των ψαριών, τόσο περισσότερο επιβραδύνονταν η διαδικασία αυτή (Hochachka 1988, Moyes *et al.* 1992, Milligan & Girard 1993, Richards *et al.* 2002, Galloway & Kieffer 2003, Hyvarinen *et al.* 2004). Όμως από την παρούσα εργασία δεν προκύπτει ανάλογο συμπέρασμα ενώ από τα αποτελέσματα (Εικ. 6.2), μπορεί να ειπωθεί με σιγουριά ότι οι 9 ώρες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα αυτό, είναι αρκετές για να ολοκληρωθεί η αποκατάσταση των ψαριών.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, δεν έχουν υποπέσει στην αντίληψή μας άλλες δημοσιευμένες εργασίες σχετικά με το γαλακτικό οξύ στους μύες του zebrafish ενώ είναι λίγες εκείνες που ασχολούνται με το γαλακτικό οξύ σε μύες ψαριών γενικότερα (Young & Cech 1993, 1994, Davison 1997, Hardewig *et al.* 1998, Milligan *et al.* 2000, Richards *et al.* 2002). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι η εξαγωγή ικανής ποσότητας αίματος για αναλύσεις από έναν τόσο μικρό οργανισμό είναι πρακτικά αδύνατη ενώ και η μάζα του

μυϊκού του ιστού είναι οριακά αρκετή για να τροφοδοτήσει την ανάλυση του γαλακτικού οξέος ή οποιουδήποτε άλλου βιοχημικού δείκτη.

Οι τιμές του γαλακτικού οξέος που μετρήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν κατά μέσο όρο, $11,4 \mu\text{mol g}^{-1}$ σε κατάσταση ηρεμίας και $19,38 \mu\text{mol g}^{-1}$ μετά από εξουθένωση. Σε ανάλογη εργασία, οι Widmer *et al.* (2006), μέτρησαν αισθητά μικρότερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος, σε zebrafish που εκτράφηκαν σε κανονικές συνθήκες οξυγόνου. Σε άτομα που βρίσκονταν σε κατάσταση ηρεμίας, η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος που υπολόγισαν ήταν περίπου $0,6 \mu\text{mol g}^{-1}$, ενώ σε άτομα που είχαν εξουθενωθεί, η τιμή αυτή ανερχόταν σε $2,6 \mu\text{mol g}^{-1}$ περίπου. Και εδώ, οι μετρήσεις παρουσίασαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος ατόμων που βρίσκονταν σε κατάσταση ηρεμίας και ατόμων που προέρχονταν από έντονη άσκηση και κόπωση.

Οι Plaut & Gordon (1994), που επίσης ασχολήθηκαν με τη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος σε zebrafish πριν και μετά από εξουθενωτική άσκηση, δεν παρατήρησαν στατιστικά σημαντικές διαφορές διότι δεν κατάφεραν να προκαλέσουν εξουθένωση μετά από συνεχή κολύμβηση 2 ωρών. Οι τιμές που κατέγραψαν κυμαίνονταν από $0,36 \text{mg g}^{-1}$ περίπου ($\sim 4 \mu\text{mol g}^{-1}$) πριν την άσκηση έως $0,45 \text{mg g}^{-1}$ περίπου ($\sim 5 \mu\text{mol g}^{-1}$) μετά την άσκηση.

Η παρατηρούμενη τεράστια διαφορά των εργασιών αυτών σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, μπορεί να εξηγηθεί από το γεγονός ότι οι Plaut & Gordon (1994) και Widmer *et al.* (2006) χρησιμοποίησαν διαφορετική μέθοδο (και διαφορετικό σύστημα μέτρησης - kit). Ειδικότερα, οι παραπάνω ερευνητές μέτρησαν τη συγκέντρωση του γαλακτικού σε ολόκληρο το σώμα των ψαριών (whole-body lactate concentration) ενώ στην παρούσα εργασία προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος συγκεκριμένα στους μύες. Η άποψη αυτή ενισχύεται με βάση τα αποτελέσματα των Wokoma & Johnston (1981), οι οποίοι υπολόγισαν τη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος τόσο στους λευκούς μύες όσο και σε ολόκληρο το σώμα της ιριδίζουσας πέστροφας, πριν και μετά από έντονη άσκηση. Οι τιμές συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος στις οποίες κατέληξαν ήταν αισθητά μεγαλύτερες στην περίπτωση των μυών ($44,3 \mu\text{mol g}^{-1}$ πριν και $93,2 \mu\text{mol g}^{-1}$ μετά από άσκηση) σε σχέση με ολόκληρο το

σώμα ($13,9 \mu\text{mol g}^{-1}$ πριν και $28,8 \mu\text{mol g}^{-1}$ μετά από άσκηση). Μάλιστα, υποστήριξαν ότι, ενώ μερικά λεπτά μετά την έναρξη της άσκησης άρχιζε ένας έντονος καταβολισμός του γαλακτικού οξέος του σώματος (με αποτέλεσμα να μειώνεται η μετρούμενη συγκέντρωση), η αντίστοιχη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στους μύες παρέμενε υψηλή.

Κάνοντας την παραδοχή ότι η πέστροφα έχει περίπου την ίδια κατανομή μυϊκής μάζας με το zebrafish, μπορεί να γίνει μία εκτίμηση – με βάση τα αποτελέσματα για τη συγκέντρωση του γαλακτικού σε όλο το σώμα – της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες, για τις εργασίες των Plaut & Gordon (1994) και Widmer *et al.* (2006) (Πίνακας 6.8).

Πίνακας 6.8. Μετρήσεις συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος στο σώμα και στους μύες των Wokoma & Johnston (1981) και εκτίμηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες για τους Plaut & Gordon (1994) και Widmer *et al.* (2006).

	Control		Exercise	
	[LACT] body ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	[LACT] muscle ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	[LACT] body ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	[LACT] muscle ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
Wokoma & Johnston, 1981	13,9	44,2	28,8	93,2
Plaut & Gordon, 1994	~ 4	12,72 (εκτίμηση)	~5	16,18 (εκτίμηση)
Widmer <i>et al.</i> , 2006	0,6	1,9 (εκτίμηση)	2,6	8,41 (εκτίμηση)

Οι τιμές που προκύπτουν από την εκτίμηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες για την εργασία των Plaut & Gordon (1994), είναι παρόμοιες με τις αντίστοιχες της παρούσας εργασίας. Στην περίπτωση των Widmer *et al.* (2006) η διαφορά σε σχέση με αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, είναι εμφανής ακόμα και μετά την εκτίμηση. Όμως, είναι γνωστό ότι το μέγεθος παίζει σημαντικό ρόλο στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος, με τα μεγαλύτερα άτομα να εμφανίζουν, μετά από έντονη άσκηση, πολλαπλάσιες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος σε σύγκριση με μικρότερα (Wakefield *et al.* 2004). Έτσι, επειδή το μέγεθος των ατόμων που χρησιμοποίησαν οι Widmer *et al.* (2006), ήταν αρκετά μικρότερο ($16,4 \text{ mm SL}$) από αυτό των ατόμων της παρούσας μελέτης ($34,4 \text{ mm TL}$) σε συνδυασμό με τη διαφορετική

τεχνική μέτρησης, είναι αναμενόμενο να καταλήγουν σε διαφορετικές τιμές συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος.

Παρόμοιες τιμές συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος στους μύες, με αυτές που μετρήθηκαν στο zebrafish κατά την παρούσα εργασία, φαίνεται να εμφανίζουν και άλλα είδη ψαριών. Για παράδειγμα, στην εργασία των Sfakianakis & Kentouri (in press) μελετήθηκε η απομάκρυνση του γαλακτικού οξέος από τους μύες λαυρακιών παρόμοιου μεγέθους (38,6 mm TL) μετά από εξουθενωτική άσκηση. Οι συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος στους μύες που μετρήθηκαν (12-15 $\mu\text{mol g}^{-1}$ περίπου πριν και 18-21 $\mu\text{mol g}^{-1}$ περίπου μετά την άσκηση), ήταν αρκετά όμοιες με τις μετρήσεις της παρούσας εργασίας (12,1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ πριν και 22,6 $\mu\text{mol g}^{-1}$ μετά την άσκηση).

ΕΠΙΛΟΓΟΣ

Από την παρούσα διατριβή προκύπτει ότι το υπό μελέτη είδος παρουσιάζει έντονη διαφοροποίηση σε όλους σχεδόν τους χαρακτήρες που εξετάστηκαν σε σχέση με τη θερμοκρασία ανάπτυξης. Ειδικότερα, βρέθηκε ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης επιδρά σημαντικά στη διαμόρφωση του σχήματος του σώματος, του τελικού αριθμού των μεριστικών στοιχείων των πτερυγίων και της σπονδυλικής στήλης, της αναλογίας του φύλου, της ικανότητας κολύμβησης και του μεταβολισμού του γαλακτικού οξέος στους μύες. Επίσης, αποδείχθηκε ότι επιδρά στο συνδυασμό των διαφορετικών τύπων παραμορφώσεων που φέρει κάθε άτομο, όχι όμως στο ποσοστό των μη φυσιολογικών ατόμων στον πληθυσμό. Είναι ασφαλές λοιπόν να ειπωθεί ότι το zebrafish αποδεικνύεται ιδιαίτερα «δεκτικό» στις επιδράσεις του περιβάλλοντός του, παρουσιάζει δηλαδή έντονη και ευρεία φαινοτυπική πλαστικότητα (μορφολογική και λειτουργική).

Όπως αναφέρθηκε (βλ. Εισαγωγή), τα ενδιαίτηματα του zebrafish εντοπίζονται σε κανάλια, ρυάκια, μικρές λίμνες, ορυζώνες και γενικά σε υδάτινους όγκους με στάσιμο ή χαμηλής ροής νερό που εκτός των άλλων χαρακτηρίζονται από «κλίμα μουσώνων» με έντονες εποχικές και ημερήσιες θερμοκρασιακές διακυμάνσεις (Talwar & Jhingran 1991, Pritchard *et al.* 2001). Απόρροια αυτού είναι η καταγραφή ενός μεγάλου εύρους θερμοκρασιών στις περιοχές αυτές που μπορεί να κυμαίνεται από 6 °C το χειμώνα μέχρι και πάνω από 38 °C το καλοκαίρι (Spence *et al.* 2008). Είναι επομένως απαραίτητο για ένα είδος σαν αυτό να διαθέτει την ικανότητα να προσαρμόζεται προκειμένου να αντεπεξέρχεται επιτυχώς σε τέτοιου είδους περιβαλλοντικές διαφοροποιήσεις. Η φαινοτυπική πλαστικότητα που εμφάνισε το zebrafish σε όλους τους χαρακτήρες που μελετήθηκαν δίνει μια σαφή εικόνα για τη θερμοκρασιακή του ιστορία. Παρά το γεγονός ότι τα δεδομένα της παρούσας εργασίας έχουν ληφθεί υπό εργαστηριακές συνθήκες, εντούτοις παρέχουν μια γενική εικόνα για το πώς «συμπεριφέρονται» οι οργανισμοί στο φυσικό τους περιβάλλον και μας βοηθούν να εντυπώσουμε στους μηχανισμούς επιβίωσης που διαθέτουν.

Οι θεματικές ενότητες που περιλαμβάνει η παρούσα διατριβή είναι άρρηκτα συνδεδεμένες μεταξύ τους καθώς παρουσιάζουν διαφορετικές πλευρές του ίδιου φαινομένου (πλαστικότητα) στο zebrafish. Παρόλα αυτά, ένας από τους χαρακτήρες που

μελετήθηκαν, η κολυμβητική ικανότητα, εξαρτάται περισσότερο από τους υπόλοιπους λόγω του ότι προϋποθέτει συνέργεια πολλών διαφορετικών χαρακτηριστικών (Koumoundouros *et al.* 2002b, 2009a,b, Sfakianakis & Kentouri *in press*). Από τα χαρακτηριστικά αυτά, εκείνα που επηρεάζουν την κολύμβηση και περιλαμβάνονται στην παρούσα μελέτη, είναι το σχήμα του σώματος, τα μεριστικά στοιχεία και ο μεταβολισμός του γαλακτικού οξέος. Αντιθέτως, εξαίρεση αποτελούν οι παραμορφώσεις και το φύλο, διότι αφενός τα άτομα με εμφανείς παραμορφώσεις δε χρησιμοποιήθηκαν στις μετρήσεις της κολύμβησης και αφετέρου τα άτομα που επελέγησαν για τις μετρήσεις αυτές ήταν αποκλειστικά αρσενικά.

Το σχήμα του σώματος του zebrafish, όπως αποδείχθηκε στην παρούσα εργασία, διαφέρει σημαντικά ανάλογα με τη θερμοκρασία εκτροφής (βλ. Κεφ. 2). Το γεγονός αυτό από μόνο του θα μπορούσε να εξηγήσει τις παρατηρούμενες διαφορές στην ικανότητα κολύμβησης (βλ. Κεφ. 4) καθώς μεγαλύτερα μεγέθη σώματος (του ίδιου μήκους) έχουν αποδειχθεί πιο ενεργοβόρα σε ίδιες ταχύτητες κολύμβησης (Kieffer *et al.* 1996, McDonald *et al.* 1998). Τα μεριστικά στοιχεία εξαρτώνται επίσης από τη θερμοκρασία ανάπτυξης και όπως έχει αναφερθεί στο παρελθόν αποτελούν παράγοντα που επηρεάζει δραστικά την κολυμβητική ικανότητα (τουλάχιστον τα πτερύγια εξ' αυτών, Plaut 2000). Το γαλακτικό οξύ από την άλλη πλευρά, παρουσίασε διαφορές (Κεφ. 5) κυρίως στο ρυθμό αποκατάστασης μεταξύ των δύο ακραίων θερμοκρασιών. Σύμφωνα με τον Kieffer (2000), η ικανότητα του οργανισμού να «καθαρίζει» το οξύ που συσσωρεύεται στους μύες όχι μόνο κατά την ξεκούραση (recovery) αλλά και κατά την κολύμβηση, επηρεάζει σημαντικά το χρόνο επέλευσης του πλήρους μυϊκού κάματος.

Επιπλέον, ένας εξίσου σημαντικός χαρακτήρας του οργανισμού που επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την κολυμβητική του ικανότητα, είναι ο μυϊκός ιστός. Οι Koumoundouros *et al.* (2009a) σε εργασία τους σε λαβράκια διαφορετικών θερμοκρασιών εκτροφής (15 και 20 °C) απέδειξαν ότι τα άτομα της χαμηλότερης θερμοκρασίας (που ήταν και καλύτεροι κολυμβητές) παρουσίαζαν μεγαλύτερο ποσοστό κόκκινων μυών (σε σχέση με τους λευκούς) και μεγαλύτερο αριθμό κόκκινων μυϊκών ινών σε σύγκριση με τα άτομα της υψηλότερης θερμοκρασίας. Κάτι ανάλογο είναι πιθανό να ισχύει και για το zebrafish, γεγονός που θα αποτελούσε εξαιρετικά ενδιαφέρον αντικείμενο μελλοντικής έρευνας.

Μια σημαντική παράμετρος που πρέπει να ληφθεί υπόψη κατά την ερμηνεία των αποτελεσμάτων είναι το “inbreeding” (ενδοαναπαραγωγή ή ενδογαμία). Η ενδογαμία θεωρείται φθοροποιός δύναμη για έναν πληθυσμό καθώς αναγκάζει τους γονείς να «μοιράζονται» πολλές φορές τα γονίδια τους με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συχνότητα εμφάνισης τυχόν υπολειπόμενων γενετικών διαταραχών. Αυτό συμβαίνει διότι αυξάνεται η συνολική γενετική ομοζυγωτία, η οποία έχει ως επακόλουθο την αύξηση της έκφρασης των υπολειπόμενων επικίνδυνων μεταλλάξεων στους απογόνους (Arnold 2000). Η κατάσταση αυτή αναφέρεται συχνά και ως «inbreeding depression» και ουσιαστικά σημαίνει μικρότερη ποικιλία στα γονίδια.

Πιθανά προβλήματα που μπορούν να προκύψουν από μακροχρόνια (και διαδοχική) ενδογαμία είναι μειωμένη ανάπτυξη και γονιμότητα, χαμηλότεροι ρυθμοί επιβίωσης και εκκόλαψης, αλλαγές στη συμπεριφορά και εμφάνιση μορφοανατομικών ανωμαλιών (Tave 1999). Επιπλέον, οι περισσότεροι πληθυσμοί που διατηρούνται με ενδοαναπαραγωγή για μεγάλο αριθμό γενεών μπορεί μεν να καταλήξουν σε πλήρη προσαρμογή στις συνθήκες αιχμαλωσίας (αυτό αποτελεί πλεονέκτημα), θα έχουν όμως απολέσει τις ικανότητες επιβίωσης στο φυσικό τους περιβάλλον. Ακόμη, είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι ένας μικρός αρχικός πληθυσμός που προορίζεται να χρησιμοποιηθεί σαν βάση για την παραγωγή ακόλουθων γενεών, ενδέχεται να μην είναι πλήρως αντιπροσωπευτικός (γονιδιακά) του αρχικού άγριου πληθυσμού (Tave 1999).

Είναι γνωστό ότι η επιλεκτική ενδογαμία χρησιμοποιείται ως κοινή πρακτική στην κτηνοτροφία εδώ και χιλιάδες χρόνια και όταν είναι καλά σχεδιασμένη και κατευθυνόμενη, παρουσιάζει σημαντικά (για τον κτηνοτρόφο) πλεονεκτήματα. Στα θετικά της επιλεκτικής ενδογαμίας συγκαταλέγονται κυρίως η αύξηση των ρυθμών ανάπτυξης και η ανθεκτικότητα απέναντι σε ασθένειες που ευδοκιμούν σε διάφορες εγκαταστάσεις διατήρησης πληθυσμών (Tave 1999).

Οι πληθυσμοί που διατηρεί το Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών προέρχονται από έναν αρχικό πληθυσμό 40 περίπου ατόμων ενώ τα άτομα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν έως και F4 γενεάς. Παρά το ότι ο αρχικός πληθυσμός δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλος, οι γενεές που έχουν προκύψει έως σήμερα είναι λίγες και ως εκ

τούτου δεν πληρούνται οι απαιτούμενες προϋποθέσεις για την εμφάνιση «inbreeding depression» (Pante *et al.* 2001, Shirak *et al.* 2002, Neira *et al.* 2006).

Πέρα από τα παραπάνω όμως, στα zebrafish που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα έρευνα δεν παρατηρήθηκε κάποιο άλλο πρόβλημα εκτός από την εμφάνιση μεγάλων ποσοστών παραμορφώσεων που σύμφωνα με τη μελέτη των Ferreri *et al.* (2000) εμφανίζονται και στους φυσικούς πληθυσμούς. Συνεπώς, η ύπαρξη τόσο μεγάλων ποσοστών παραμορφωμένων ατόμων zebrafish (βλ. Κεφ. 1) πρέπει να αποδοθεί σε κάποια άλλη αιτία και όχι στην ενδογαμία.

Όπως αναφέρθηκε, το zebrafish χρησιμοποιείται σε περισσότερα από 400 εργαστήρια ανά τον κόσμο την παρούσα στιγμή. Δεδομένου του γεγονότος αυτού αλλά και του διαρκούς ενδιαφέροντος μας για το «welfare» των φυσικών πληθυσμών, τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποκτούν ξεχωριστή σημασία. Για τα μεν εργαστήρια, πληροφορίες όπως η κατάληξη του φύλου ενός εκτρεφόμενου πληθυσμού ή η αεροβική του (κολυμβητική) ικανότητα μπορούν να αποδειχθούν εξαιρετικά χρήσιμες για το σχεδιασμό και την περαίωση στοχευμένων πειραμάτων. Όσον αφορά δε στους φυσικούς πληθυσμούς, πληροφορίες σχετικά με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντός τους αποκτούν όλο και μεγαλύτερη σημασία σε μια εποχή που συνεχώς μεγαλώνει η παγκόσμια ανησυχία σχετικά με τη διαρκή άνοδο της θερμοκρασίας του πλανήτη.

Είδη σαν το zebrafish, με τα συγκριτικά πλεονεκτήματα που αυτό διαθέτει (βλ. Εισαγωγή) επιτρέπουν την εκτέλεση μικρής κλίμακας πειραμάτων σε εργαστηριακές εγκαταστάσεις με αναγωγή των αποτελεσμάτων στα φυσικά περιβάλλοντα. Καθώς όμως δεν είναι πολλά τα είδη εκείνα που διαθέτουν αυτά τα πλεονεκτήματα (σε σχέση βέβαια με τις τωρινές επιστημονικές δυνατότητες) είναι επιβεβλημένο τα αποτελέσματα από λίγα και συγκεκριμένα εξ'αυτών να αποτελούν οδηγό για την πρόβλεψη της «συμπεριφοράς» και των υπολοίπων. Τα είδη αυτά -ανάμεσά τους και το zebrafish- είναι ευρέως γνωστά ως οργανισμοί-μοντέλα και κάθε πληροφορία που μπορεί να αποκτηθεί σχετικά με αυτά έχει τη δική της ξεχωριστή βαρύτητα.

Συνεπώς, είναι μάλλον περιττό να τονιστεί ότι περαιτέρω έρευνα χρειάζεται τόσο πάνω στην επίδραση της θερμοκρασίας σε μορφολογικούς και λειτουργικούς χαρακτήρες

του zebrafish όσο και στην επίδραση των υπόλοιπων περιβαλλοντικών παραγόντων (π.χ. ρύπανση, ευτροφισμός, φωτοπερίοδος, αλατότητα κ.α.). Όσον αφορά στα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, είναι σημαντικό, όπως αναφέρθηκε, να διερευνηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας εκτροφής στη διαμόρφωση του μυϊκού ιστού του οργανισμού. Επιπρόσθετα, ενδιαφέρον αντικείμενο μελέτης θα αποτελούσαν οι παραμορφώσεις του κρανίου και η κυμαινόμενη ασυμμετρία των μεριστικών στοιχείων των ζυγών πτερυγίων, θέματα που δυστυχώς δε συμπεριλήφθηκαν στην παρούσα εργασία λόγω χρονικών περιορισμών.

Αναμφίβολα όμως, η πιο ενδιαφέρουσα μελλοντική προοπτική του αντικειμένου, θα ήταν η μοριακή ταυτοποίηση των διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα και καταλήγουν στα αποτελέσματα που καταγράφονται στην παρούσα διατριβή. Η έρευνα για τους μηχανισμούς που ενεργοποιούνται ή καταστέλλονται ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος ή για τα γονίδια που εκφράζονται τελικά με στόχο τη διαμόρφωση των εκάστοτε μορφολογικών ή λειτουργικών χαρακτήρων θα ολοκλήρωνε το παρόν αντικείμενο μελέτης. Κλείνοντας, είναι περιττό να τονιστεί ότι για τις παραπάνω προοπτικές, είναι δύσκολο να βρεθεί καταλληλότερος οργανισμός μελέτης από το zebrafish.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Καμία θερμοκρασία εκτροφής δεν ευνοεί τα φυσιολογικά άτομα έναντι των παραμορφωμένων αφού τα τελευταία εμφανίστηκαν σε όλες τις συνθήκες σε ποσοστό σχεδόν 100 %.
- Όλοι οι παρατηρούμενοι τύποι παραμορφώσεων εμφανίστηκαν σε όλες τις θερμοκρασίες εκτροφής.
- Η θερμοκρασία εκτροφής επηρεάζει το συνδυασμό των διαφορετικών τύπων παραμορφώσεων που εμφανίζονται σε κάθε άτομο.
- Η ανάλυση των τύπων των παραμορφώσεων σε σχέση με την εμφάνισή τους στα διαφορετικά άτομα αποκάλυψε ότι αυτές ομαδοποιούνται σε 2 μεγάλες κατηγορίες: εκείνες της σπονδυλικής στήλης και εκείνες των πτερυγίων.
- Η θερμοκρασία εκτροφής επηρεάζει σημαντικά το σχήμα του σώματος στο zebrafish.
- Οι χαρακτήρες που κυρίως συμβάλλουν στη διαφοροποίηση του σχήματος του σώματος των ατόμων στις διαφορετικές θερμοκρασίες, εντοπίζονται στο οπίσθιο μέρος του σώματος.
- Τα ποσοστά της επανατοποθέτησης των ατόμων στη σωστή ομάδα θερμοκρασιακής ιστορίας με βάση το σχήμα του σώματος είναι ιδιαίτερα υψηλά καθώς ξεπερνούν το 90%.
- Όσο πιο μεγάλη είναι η διαφορά της θερμοκρασίας κατά την ανάπτυξη 2 πληθυσμών, τόσο πιο διαφορετικά είναι τα σχήματα των σωμάτων τους.
- Η θερμοκρασία εκτροφής επιδρά σημαντικά στον τελικό αριθμό των σπονδύλων και των ακτινών των πτερυγίων στο zebrafish.
- Οι χαμηλότερες θερμοκρασίες εκτροφής οδηγούν σε μεγαλύτερο αριθμό μεριστικών στοιχείων.
- Ο τελικός αριθμός των μεριστικών στοιχείων στα zebrafish ακόμη και της ίδιας θερμοκρασιακής ιστορίας είναι ποικίλος.

- Η θερμοκρασία εκτροφής επηρεάζει δραματικά τη διαφοροποίηση του φύλου του zebrafish. Οι χαμηλές θερμοκρασίες οδηγούν σε κυριαρχία των αρσενικών, οι υψηλές σε κυριαρχία των θηλυκών ενώ οι ενδιάμεσες σε αναλογία φύλου 1:1.
- Τα προερχόμενα από την υψηλή θερμοκρασία (31 °C) άτομα παρουσιάζουν μεγαλύτερη κολυμβητική ικανότητα από εκείνα της χαμηλής θερμοκρασίας (22 °C).
- Δε διαπιστώθηκε συσχέτιση μεταξύ κάποιου εξωτερικά εμφανούς και εύκολα μετρήσιμου μορφομετρικού χαρακτήρα με την κολυμβητική επίδοση. Οι χαρακτήρες που εξετάστηκαν ήταν το βάρος, το πάχος του σώματος, το μέγιστο ύψος του σώματος, το ύψος του σώματος και το ύψος του ουραίου μίσχου.
- Το γαλακτικό οξύ στους μύες του zebrafish αυξάνεται κατά τη διάρκεια της άσκησης και αρχίζει να μειώνεται αμέσως μετά το τέλος της κατά τη διαδικασία της ξεκούρασης.
- Η θερμοκρασία εκτροφής δεν επιδρά στη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στους μύες ούτε στην κατάσταση ηρεμίας ούτε στη χρονική στιγμή του πλήρους μυϊκού κάματος λόγω άσκησης. Εξαίρεση αποτελούν τα άτομα που προέρχονται από τη θερμοκρασία των 22 °C καθώς στην κατάσταση ηρεμίας εμφανίζουν μεγαλύτερη συγκέντρωση γαλακτικού από όλα τα υπόλοιπα.
- Η θερμοκρασία εκτροφής επηρεάζει την ταχύτητα απομάκρυνσης του γαλακτικού οξέος από τους μύες (recovery) κατόπιν ασκήσεως δεδομένου ότι τα άτομα της χαμηλότερης θερμοκρασίας δοκιμής (22 °C) καθυστέρησαν περίπου 3 ώρες για τη διαδικασία αυτή σε σχέση με τα άτομα της υψηλότερης θερμοκρασίας (31 °C). Τα ψάρια των ενδιάμεσων θερμοκρασιών βρίσκονται κάπου ενδιάμεσα όσον αφορά το ρυθμό αποκατάστασης των μυών τους.
- Το zebrafish εμφανίζει ευρεία φαινοτυπική πλαστικότητα σε όλους τους χαρακτήρες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdel I., Abellan E., Lopez-Albors O., Valdes P., Nortes M.J. & Garcia-Alcazar A., 2004. Abnormalities in the juvenile stage of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) reared at different temperatures: types, prevalence and effect on growth. *Aquaculture International*, 12:523-538.
- Afonso J.M., Montero D., Robaina L., Astorga N., Izquierdo M.S. & Gines R., 2000. Association of a lordosis-scoliosis-kyphosis deformity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) with family structure. *Fish Physiology and Biochemistry*, 22:159–163.
- Akiyama T., Murai T. & Mori K., 1986a. Role of tryptophan metabolites in inhibition of spinal deformity of chum salmon fry caused by tryptophan deficiency. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries.*, 52:1255–1259.
- Akiyama T., Murai T. & Nose T., 1986b. Oral administration of serotonin against spinal deformity of chum salmon fry tryptophan deficiency. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 52:1249–1254.
- Alami-Durante H., Bergot P., Rouel M. & Goldspink G., 2000. Effects of environmental temperature on the development of the myotomal white muscle in larval carp (*Cyprinus carpio* L.). *Journal of Experimental Biology*, 203:3675-3688.
- Alami-Durante H., Rouel M. & Kentouri M., 2006. New insights into temperature-induced white muscle growth plasticity during *Dicentrarchus labrax* early life: A developmental and allometric study. *Marine Biology*, 149:1551-1565.
- Albokhadaim I., Hammond C. L., Ashton C., Simbi B.H., Bayol S., Farrington S. & Stickland N., 2007. Larval programming of post-hatch muscle growth and activity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Biology*, 210:1735-1741.
- Albrecht G.H., 1980. Multivariate analysis and the study of form, with special reference to canonical variate analysis. *American Zoologist*, 20:679-693.
- Alp P.R., Newsholme E.A., Zammit V.A., 1976. Activities of citrate synthase and NAD + -linked isocitrate dehydrogenase in muscle from vertebrates and invertebrates. *Biochemistry Journal*, 154:689–700.
- Altringham J. D. & Ellerby D. J., 1999. Fish swimming: patterns in muscle function. *Journal of Experimental Biology*, 202:3397-3403.
- Amsterdam A. & Hopkins N., 2006. Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease. *Trends in Genetics*, 22:473-478.

- Andrades J.A., Becerra J. & Fernández-Llebrez P., 1996. Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture*, 141:1–11.
- Aritaki M. & Seikai T., 2004. Temperature effects on early development and occurrence of metamorphosis-related morphological abnormalities in hatchery-reared brown sole *Pseudopleuronectes herzensteini*. *Aquaculture*, 240:517–530.
- Arunachalam M., Johnson J.A., Sathyanarayanappa S.N., Sankaranarayanan A. & Soranam R., 2000. Cultivable and ornamental fishes from Hemavathi and Ekachi rivers, South Karnataka. p.226-227. In Ponniah A.G. and Gopalakrishnan A. (eds.) Endemic fish diversity of Western Ghats. NBFGR-NATP Publication. National Bureau of Fish Genetic Resources, Lucknow U.P., India. p. 1347.
- Axelrod H.R. & Schultz L.P., 1955. A Handbook of Tropical Aquarium Fishes. McGraw-Hill, New York.
- Axelrod H., Emmens C., Burgess W. & Pronek N., 1986. Exotic tropical fishes. Fourth expanded edition. T. F. H. Publications, Inc. United States, p. 428.
- Ayala M.D., López-Albors O., Gil F., García-Alcázar A., Abellán E., Alarcón J.A., Álvarez M.C., Ramírez-Zarzosa G. & Moreno F., 2001. Temperature effects on muscle growth in two populations (Atlantic and Mediterranean) of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 202:359-370.
- Ayala M.D., Lopez Albors O., Garcia Alcazar A., Abellan E., Latorre R., Vazquez J.M., Ramirez Zarzosa G., Martinez F. & Gil F., 2003. Effect of two thermal regimes on the muscle growth dynamics of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax* L. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 32:271-275.
- Bagarinao T. & Kungvankij P., 1986. An incidence of swimbladder stress syndrome in hatchery-reared sea bass (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture*, 51:181-188.
- Barman R.P., 1991. A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. Record of the Zoological Survey of India Occasional Papers, 137:1-91.
- Barnett C.W., & Pankhurst N.W., 1998. The effects of common laboratory and husbandry practices on the stress response of greenback flounder *Rhombosolea tapirina* (Gunther, 1862). *Aquaculture*, 162:313-329.
- Baroiller J.F., Guiguen Y., Fostier A., 1999. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 55:910–931.

- Basu S.P., 1959. Active respiration of fish in relation to ambient concentrations of oxygen and carbon dioxide. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 16:175-212. In Hammer C., 1995. Fatigue and exercise tests with fish. *Comp. Biochem. Physiol.*, A 112:1–20.
- Beamish F.W.H., 1970. Influence of temperature and salinity acclimation on temperature preference of the euryhaline fish *Tilapia nilotica*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 27:1209-1214.
- Beamish F.W.H., 1978. Swimming capacity. In *Fish Physiology*, vol. VII (ed. Randall W.S. & Hoar D.J.), Academic Press, New York, p. 101-187.
- Beamish F.W.H., Howlett J.C. & Medland T.E., 1989. Impact of diet on metabolism and swimming performance in juvenile lake trout, *Salvelinus namaycush*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46:384-388. In Hammer C., 1995. Fatigue and exercise tests with fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 112:1-20.
- Beis D. & Stainier D.Y., 2006. In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends in Cell Biology*, 16(2):105-112.
- Beis D., Bartman T., Jin S.W., Scott I.C., Amico L.A.D., Ober E.A., Verkade H., Frantsve J., Field H.A., Wehman A., Baier H., Tallafuss A., Bally-Cuif L., Chen J.N., Stainier D.Y.R. & Jungblut B., 2005. Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development. *Development*, 132:4193-4204.
- Bengtsson A., Bengtsson B.E. & Lithner G., 1998. Vertebral defects in fourhorn sculpin, *Myoxocephalus quadricornis* L., exposed to heavy metal pollution in the Gulf of Bothnia. *Journal of Fish Biology*, 33:517–529.
- Berman J., Hsu K. & Look A.T., 2003. Zebrafish as a model organism for blood diseases. *British Journal of Haematology*, 123:568–576.
- Bird N.C. & Mabee P.M., 2003. Developmental Morphology of the Axial Skeleton of the Zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). *Developmental Dynamics*, 228:337–357.
- Blaxter J.H.S., 1969. Development: eggs and larvae, In: Hoar W.S., Randall D.J., (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. III. Academic Press, New York, pp.177-252.
- Blaxter J.H.S., 1976. Reared and wild fish-how do they compare? In: Persoone G., Jaspers E. (Eds.), 10th European Symposium on Marine Biology. Belgium, September 12-13, 1975. Vol. 1. Wetteren, Universal Press, pp. 11-26.
- Blaxter J.H.S., 1988. Pattern and variety in development. In: Hoar W.S., Randall D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. XIA. Academic Press, New York. pp. 1–58.

- Blaxter J.H.S., 1992. The effect of temperature on larval fishes. *Netherlands Journal of Zoology*, 42:336–357.
- Boglione C., Marino G., Bertolini B., Rossi A., Ferreri F. & Cataudella S., 1993. Larval and post-larval monitoring in sea bass: morphological approach to evaluate finfish seed quality, in: Barnabe G, Kestemont P. (Eds.), *Production, Environment and Quality*, European aquaculture Society, Special publication no 18, Ghent, Belgium, pp.189-204.
- Boglione C., Marino G., Ferreri F., Finoia M.G., Scardi M., Fresi E. & Cataudella S., 1994. Anatomical aspects for seed quality assessment in sea bass (*Dicentrarchus labrax*): hatchery and wild populations, in: Kestemont P., Muir J., Sevilla F., Williot P. (Eds.), *Measures for success-metrology and instrumentation in Aquaculture management*. CEMAGREF Editions, GAP Cedex, France, pp. 191-197.
- Boglione C., Marino G., Fusari A., Ferreri A., Finoia M.G. & Cataudella S., 1995. Skeletal anomalies in *Dicentrarchus labrax* juveniles selected for functional swimbladder. *ICES Marine Science Symposium*, 201:163-169.
- Boglione C., Gagliardi F., Scardi M. & Cataudella S., 2001. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture*, 192(1):1-22.
- Boglione C., Costa C., Di Dato P., Ferzini G., Scardi M. & Cataudella S., 2003. Skeletal quality assessment of reared and wild sharpnose sea bream and pandora juveniles. *Aquaculture*, 227:373–394.
- Bolger T. & Connolly P.L., 1989. The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. *Journal of Fish Biology*, 34:171-182.
- Bolker J.A. & Hill C.R., 2000. Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *Journal of Fish Biology*, 56:1029–1052.
- Bone Q., 1978. Locomotor muscle in: Randall W.S, Hoar D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. VII, Academic Press, New York, pp. 101-187.
- Bone Q., Kiceniuk J. & Jones D.R., 1978. On the role of different fiber types in fish myotomes at intermediate swimming speeds. *Fishery Bulletin*, 76:691-699.
- Bresch H., Beck H., Ehlermann D., Schlaszus H. & Urbanek M., 1990. A long-term test comprising reproduction and growth of zebrafish with 4-chloroaniline. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19:419-427.
- Brett J.R., 1964. The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 21:1183-1226.

- Brett J.R. & Glass N.R., 1973. Metabolic rates and critical swimming speeds of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in relation to size and temperature. Journal of the Fisheries Research Board of Canada, 30:379-387. In: Hammer C., 1995. Fatigue and exercise tests with fish. Comparative Biochemistry and Physiology, A 112:1-20.
- Budick S.A. & O'Malley D.M., 2000. Locomotor repertoire of larval zebrafish: swimming, turning and prey capture. Journal of Experimental Biology, 203:2565-2579.
- Cabral H.N., Marques J.F., Rego A.L., Catarino A.I., Figueiredo J. & Garcia J., 2003. Genetic and morphological variation of *Synaptura lusitanica* Capello, 1868, along the Portuguese coast. Journal of Sea Research, 50:167-175.
- Cahu C., Infante J.Z. & Takeuchi T.N., 2003. Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. Aquaculture, 227(1-4):245-258.
- Carrillo J., Koumoundouros G., Divanach P. & Martinez J., 2001. Morphological malformations of the lateral line in reared gilthead sea bream *Sparus aurata* L., 1758. Aquaculture, 192:281-290.
- Clarke M.E., Clavi C.; Domeier M., Edmonds M., Walsh P.J., 1992. Effects of nutrition and temperature on metabolic enzyme activities in larval and juvenile red drum, *Sciaenops ocellatus*, and lane snapper, *Lutjanus synagris*. Marine Biology, 112:31-36.
- Clutterham S., Gamperl A.K., Wallace H.L., Crawshaw L.I. & Farrell A.P., 2004. Exhaustive exercise does not affect the preferred temperature for recovery in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Physiological and Biochemical Zoology, 77(4):611-618.
- Cobcroft J.M., Pankhurst P.M., Sadler J. & Hart P.R., 2001. Jaw development and malformation in cultured striped trumpeter *Latris lineata*. Aquaculture, 199:267-282.
- Conover D.O., 2004. Temperature-dependent sex determination in fishes, in: Valenzuela N., Lance V. (Eds.), Temperature-dependent sex determination in vertebrates. Smithsonian Books, Washington, pp. 11-20.
- Conover D.O., Kynard B.E., 1981. Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. Science, 213:577-579.
- Corti M., Loy A. & Cataudella S., 1996. Form changes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Moronidae: Teleostei), after acclimation to freshwater: an analysis using shape coordinates. Environmental Biology of Fishes, 47:165-175.
- Chaplin S.B., Munson M.M., Knuth S.T., 1997. The effect of exercise and restraint on pectoral muscle metabolism in pigeons. Journal of Comparative Physiology and Biochemistry, 167:197-203.

- Charnov E.L., Bull J.J., 1977. When is sex environmentally determined? *Nature*, 266:828–830.
- Chatain B. & Dewavrin G., 1989. Influence des anomalies de développement de la vessie natale sur la mortalité de *Dicentrarchus labrax* au cours du sevrage. *Aquaculture*, 78:55-61.
- Chatain B., 1994. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 119:371-379.
- Chen E. & Ekker S.C., 2004. Zebrafish as a genomics research model. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 5(5):409-13.
- Chiang E.F., Yan Y.L., Tong S.K., Hsiao P.H., Guiguen Y., Postlethwait J. & Chung B.C., 2001. Characterization of duplicated zebrafish *cyp19* genes. *Journal of Experimental Zoology*, 290:709-714.
- Chun S., Park C. & Lee C., 1981. Acute toxicity of certain pesticides to teleost, with special respect to TLM and vertebral abnormality. *Publ. Inst. Mar. Sci. Nat. Fish. Univ. Busan*, 13:43–48.
- Dahlenberg M.L., Shumway D.L. & Doudoroff P., 1968. Influence of dissolved oxygen and carbon dioxide on swimming performance of largemouth bass and coho salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 25:49-70.
- Daniels R.J.R., 2002. *Freshwater fishes of peninsula India*. Universities Press, Hyderabad.
- Daoulas C.H., Economou N.A. & Bantavas I., 1991. Osteological abnormalities in laboratory reared sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fingerlings. *Aquaculture*, 97:169–180.
- Davison W., 1997. The effects of exercise training on teleost fish, a review of recent literature. *Comparative Biochemistry and Physiology, A* 117:67-75.
- De Silva S.S., Anderson T.A., 1995. *Fish nutrition in aquaculture*. Chapman & Hall, London, pp. 319.
- Debat V. & David P., 2001. Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(10):555-561.
- Dedi J., Takeuchi T., Seikai T. & Watanabe T., 1995. Hypervitaminosis and safe levels of vitamin A for larval flounder (*Paralichthys olivaceus*) fed *Artemia* nauplii. *Aquaculture*, 133:135-146.
- Dedi J., Takeuchi T., Hosoya K., Watanabe T. & Seikai T., 1998. Effect of vitamin A levels in *Artemia* nauplii on the caudal skeleton formation of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fisheries Science*, 64:344–345.

- Dentry W. & Lindsey C.C., 1978. Vertebral variation in zebrafish (*Brachydanio rerio*) related to the prefertilization temperature history of their parents. Canadian Journal of Zoology, 56 (2):280-283.
- Devlin R.H., Nagahama Y., 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture, 208:191–364.
- Diana J.S., 1983. An energy budget for northern pike (*Esox lucius*). Canadian Journal of Zoology, 61:1968-1975.
- Dickey-Collas M., 1993. The occurrence of juvenile pigmentation abnormalities in plaice (*Pleuronectes platessa*) larvae fed on enriched and unenriched *Artemia salina* nauplii. Journal of Fish Biology, 42:787-795.
- Dickson K.A., Donley J.M., Sepulveda C. & Bhoopat L., 2002. Effects of temperature on sustained swimming performance and swimming kinematics of the chub mackerel *Scomber japonicus*. Journal of Experimental Biology, 205:969-980.
- Diekmann M., Hultch V. & Nagel R., 2004. On the relevance of genotoxicity for fish populations I: effects of a model genotoxicant on zebrafish (*Danio rerio*) in a complete life-cycle test. Aquatic Toxicology, 68:13-26.
- Ditty J.G., Shaw R.F. & Fuiman, 2005. Larval development of five species of blenny (Teleostei: Blenniidae) from the western central North Atlantic, with a synopsis of blennioid family characters. Journal of Fish Biology, 66:1261–1284.
- Divanach P., 1985. Contribution de la Biologie et de l' Elevage de 6 Sparides Mediterraneens: *Sparus aurata*, *Diplodus sargus*, *Diplodus vulgaris*, *Diplodus annularis*, *Lithognathus mormyrus*, *Puntazzo puntazzo* (Poissons Teleosteens). These d' Etat, Universite des Sciences et Techniques de Languedoc, pp. 479.
- Divanach P., Boglione C., Menu B., Koumoundouros G., Kentouri M. & Cataudella S., 1996. Abnormalities in finfish mariculture: an overview of the problem, causes and solutions, in: Chatain B., Saroglia M., Sweetman J., Lavens P. (Eds.), Seabass and Seabream Culture: Problems and Prospects. European Aquaculture Society, Oostende, Belgium, pp. 45– 66.
- Divanach P., Papandroulakis N., Anastasiadis P., Koumoundouros G. & Kentouri M., 1997. Effect of water currents during postlarval and nursery phase on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder. Aquaculture, 156:145-155.
- Drücker E.G., 1996. The use of gait transition speed in comparative studies of fish locomotion. Animal Zoology, 36:555-566.

- Ellis T., Howell B.R. & Hayes J., 1997. Morphological differences between wild and hatchery-reared turbot. *Journal of Fish Biology*, 50:1124-1128.
- Endall A.W., Ahlstrom E.H. & Moser H.G., 1984. Early life history stages of fishes and their characters., In: Moser H.G., Richards W.J., Cohen D.M., Fahay M.P., Kendall A.W., Richardson S.L. (Eds), *Ontogeny and Systematics of Fishes*, American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special Publication N 1. Allen press Lawrence, Kansas, pp. 11-22.
- Engeszer R.E., Patterson L.B., Rao A.A., Parichy D.M., 2007. Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4, 21–40.
- Ensenbach U. & Nagel R., 1995. Toxicity of complex chemical mixtures: acute and long-term effects on different life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30:151-157.
- Estevez A. & Kanazawa A., 1995. Effect of (n-3) PUFA and vitamin A *Artemia* enrichment on pigmentation success of turbot, *Scophthalmus maximus* (L). *Aquaculture Nutrition*, 1:159–168.
- Fanouraki E., Divanach P. & Pavlidis M., 2007. Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture*, 265:294-304.
- Faustino M. & Power D.M., 1997. Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex. *Journal of Fish Biology*, 52:11–22.
- Faustino M. & Power D.M., 1999. Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream. *Journal of Fish Biology*, 54:1–17.
- Favaloro E & Mazzola A., 2003. Meristic variation and skeletal anomalies of wild and reared sharpsnout seabream juveniles (*Diplodus puntazzo*, Cetti 1777) off coastal Sicily, Mediterranean Sea. *Aquaculture Research*, 34:575-579.
- Ferreri F., Nicolais C., Boglione C. & Bertolini B., 2000. Skeletal characterization of wild and reared zebrafish: anomalies and meristic characters. *Journal of Fish Biology*, 56:1115–1128.
- Ferron A., Leggett W.C., 1994. An appraisal of condition measures for marine fish larvae. in: Blaxter J.H.S., Southwrd A.J. (Eds.), *Advances in marine biology*, Vol. 30. Academic Press, Limited, pp. 217–303.
- Fowler J.A., 1970. Control of vertebral number in Teleosts. An embryological problem. *Quarterly Review of Biology*, 45:148-166.

- Francescon A., Freddi A., Barbaro A. & Giavenni R., 1988. Daurade *Sparus aurata* L. reproduite artificiellement et daurade sauvage. Expériences paralleles en diverses conditions d' éleveage. *Aquaculture*, 72:273-285.
- Franklin C.E., Wilson R.S. & Davison W., 2003. Locomotion at -1.0 °C: burst swimming performance of five species of Antarctic fish. *Journal of Thermal Biology*, 28:59-65.
- Fraser M.R. & de Nys R., 2005. The morphology and occurrence of jaw and operculum deformities in cultured barramundi (*Lates calcarifer*) larvae. *Aquaculture*, In press.
- Fraser M.R., Anderson T.A. & De Nys R., 2004. Ontogenic development of the spine and spinal deformities in larval barramundi (*Lates calcarifer*) culture. *Aquaculture*, 242(1-4):697-711.
- Froese R. & Pauly D. (Eds.) (2008). FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (07/2008).
- Fry F.E.J., 1971. The effect of environmental factors on the physiology of fish, in: Hoar W.S., Randall D.J. (Eds.), *Fish Physiology* Vol. VI. Academic Press, New York, pp. 1–98.
- Fuiman L.A. & Batty R.S., 1997. What a drag it is getting cold: partitioning the physical and physiological effects of temperature on fish swimming. *Journal of Experimental Biology*, 200:1745-1755.
- Fuiman L.A., Poling K.R. & Higgs D.M., 1998. Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes. *Copeia*, 1998(3):602-611.
- Fukuhara O., 1990. Effects of temperature on yolk utilization, initial growth and behaviour of unfed marine fish-larvae. *Marine Biology*, 106:169-174.
- Galeotti M., Beraldo P., de Dominis S., D'Angelo L., Ballestrazzi R., Musetti R., Pizzolito S. & Pinosa M., 2000. A preliminary histological and ultrastructural study of opercular anomalies in gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 22:151–157.
- Galloway B.J. & Kieffer J.D., 2003. The Effects of an Acute Temperature Change on the Metabolic Recovery from Exhaustive Exercise in Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 76(5):652-662.
- Georgakopoulou E., Sfakianakis D.G., Kouttouki S., Divanach P., Kentouri M. & Koumoundouros G., 2007a. The influence of temperature during early life on phenotypic expression at later ontogenetic stages in sea bass. *Journal of Fish Biology*, 70:278-291.
- Georgakopoulou E., Angelopoulou A., Kaspiris P., Divanach P. & Koumoundouros G., 2007b. Temperature effects on cranial deformities in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.). *Journal of Applied Ichthyology*, 23(1):99-103.

- Gerhard G S., 2003. Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Experimental Gerontology*, 38:1333-1341.
- Gerhard G.S. & Cheng K.C., 2002. A call to fins! Zebrafish as a gerontological model. *Aging Cell*, 1:104-111.
- Gerlai R., 2003. Zebra Fish: An uncharted behavior genetic model. *Behavior Genetics*, 33(5):461-468.
- Gibson S. & Johnston I.A., 1995. Temperature and development in larvae of the turbot *Scophthalmus maximus*. *Marine Biology*, 124:17-25.
- Gilbert S. F., 2001. Ecological Developmental Biology: Developmental Biology Meets the Real World. *Review. Developmental Biology*, 233:1-12.
- Godwin J., Lückenbach J.A., Borski R.J., 2003. Ecology meets endocrinology: environmental sex determination in fishes. *Evolution and Development*, 5:40-49.
- Goldsmith P. & Harris W.A., 2003. The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 14:11-18.
- Grutter A.S. & Pankhurst N.W., 2000. The effects of capture, handling, confinement and ectoparasite load on plasma levels of cortisol, glucose and lactate in the coral reef fish *Hemigymnus melapterus*. *Journal of Fish Biology*, 57:391-401.
- Guderley H., 2004. Locomotor performance and muscle metabolic capacities: Impact of temperature and energetic status. *Comparative Biochemistry and Physiology*, B 139:371-382.
- Guderley H. & Gawlicka A., 1992: Qualitative modification of muscle metabolic organization with thermal acclimation of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 10:123-312.
- Gustaveson A.W., Wydoski R.S. & Wedemeyer G.A., 1991. Physiological response of largemouth bass to angling stress. *Transactions of the American Fisheries Society*, 120:286-309.
- Haaparanta A., Valtonen E.T. & Hoffmann R.W., 1997. Gill anomalies of perch and roach from four lakes differing in water quality. *Journal of Fish Biology*, 50:575-591.
- Hammer C., 1995. Fatigue and exercise tests with fish. *Comparative Biochemistry and Physiology-Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 112:1-20.
- Hard J.J., Berejikian B.A., Tezak E.P., Schroder S.L., Knudsen C.M. & Parker T.L., 2000. Evidence for morphometric differentiation of wild and captive reared adult coho salmon: a geometric analysis. *Environmental Biology of Fishes*, 58:61-73.
- Harder W, 1975. *Anatomy of Fishes. Part I: E Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung (Nägele u Obermiller), Stuttgart, p 612.*

- Hardewig I., Van Dijk P.L.M. & Portner H.O., 1998. High-energy turnover at low temperatures: recovery from exhaustive exercise in Antarctic and temperate eelpouts. *American Journal of Physiology*, 274:1789–1796.
- Hauser L., Carvalho G.R. & Pitcher T. J., 1995. Morphological and genetic differentiation of the African clupeid *Limnothrissa miodon* 34 years after its introduction to Lake Kivu. *Journal of Fish Biology*, 47 (Suppl. A):127–144.
- Hauser L., Carvalho G.R. & Pitcher T.J., 1998. Genetic population structure in the Lake Tanganyika sardine *Limnothrissa miodon*. *Journal of Fish Biology*, 53 (Suppl. A):413–429.
- Hazel J.R., 1993. Thermal biology, in: Evans D.H. (Ed.), *The Physiology of Fishes*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 427-467.
- Hazel J.R., 1995. Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Annual Review of Physiology*, 57:19-42.
- Henry T.R., Spitsbergen J.M., Hornung M.W., Abnet C.C. & Peterson R.E., 1997. Early life stage toxicity of 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzop-dioxin in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 142:56–68.
- Herzig A. & Winkler H., 1986. The influence of temperature on the embryonic development of three cyprinid fishes, *Abramis brama*, *Chalcalburnus chalcoides mento* and *Vimba vimba*. *Journal of Fish Biology*, 28:171–181.
- Hinton D.E., Baumann P.C., Gardner G.R., Hawkins W.E., Hendricks J.D., Murchelano R.A. & Okihiro M.S., 1992. Histopathological biomarkers, in: Hugget R.J., Kimerle R.A., Mehrle P.M., Bergman H (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Antropogenic Stress*. Lewis, Boca Raton, pp. 155–209.
- Hochachka P.W., 1988. Metabolic responses to reduced O₂ availability, in: Sutton J. R., Houston C. S., Coates G. (Eds.), *Hypoxia: The Tolerable Limits*. Benchmark Press Indianapolis, pp. 41-48.
- Houlihan D.F., Mathers E.M., Foster A., 1993: Bio-chemical correlates of growth rate in fish, in: Rankin J. C.; Jensen F. B (Eds.), *Fish ecophysiology*. Chapman & Hall, London, pp. 45–71.
- Howard T.E., 1975. Swimming performance of juvenile coho salmon (*Uncorhynchus kisutch*) exposed to bleached kraft pulpmill effluent. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 32:789-793.
- Howes G. J., 1991. Systematics and biogeography: an overview, in: Winfield I.J., Nelson J.S. (Eds.), *Cyprinid fishes systematics, biology and exploitation..* Chapman & Hall, London, UK, pp. 1–33.

- Hyvärinen P., Heinimaa S. & Rita H., 2004. Effects of abrupt cold shock on stress responses and recovery in brown trout exhausted by swimming. *Journal of Fish Biology*, 64(4):1015-1026.
- Ibanez-Aguirre L. & Leonart J., 1996. Relative growth and comparative morphometrics of *Mugil cephalus* L., *M. curema* V. in the Gulf of Mexico. *Scientia Marina*, 60:361-368.
- Ingham P.W., 1997. Zebrafish genetics and its implications for understanding vertebrate development. *Human Molecular Genetics*, 6:1755-1760.
- James F.C., McCulloch, C.E., 1990. Multivariate analysis in ecology and systematics: panacea or Pandora's box?. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 21:129-166.
- Johnson T.P., Cullum A.J. & Bennett A.F., 1998. Partitioning the effects of temperature and kinematic viscosity on the c-start performance of adult fishes. *Journal of Experimental Biology*, 20:2045-2051.
- Johnston I.A., 1981. Structure and function of fish muscles. *Symposium of the Zoological Society of London*, 48:71-113.
- Johnston I.A., 1993. Temperature influences muscle differentiation and the relative timing of organogenesis in herring (*Clupea harengus*) larvae. *Marine Biology*, 116:363-379.
- Johnston I.A., 2006. Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, 209:2249-2264.
- Johnston I.A. & Goldspink G., 1973a. A study of glycogen and lactate in the myotomal muscles and liver of the coalfish (*Gadus virens* L.) during sustained swimming. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 53:17-26.
- Johnston I.A. & Goldspink G., 1973b. A study of the swimming performance of the crucian carp *Carassius carassius* (L.) in relation to the effects of exercise and recovery on biochemical changes in the myotomal muscles and liver. *Journal of Fish Biology*, 5:249-260.
- Johnston I.A. & Temple G. K., 2002. Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour. *Journal of Experimental Biology*, 205:2305-2322.
- Johnston I.A., Cole N.J., Vieira V.L.A. & Davidson I., 1997. Temperature and developmental plasticity of muscle phenotype in herring larvae. *Journal of Experimental Biology*, 200:849-868.
- Jones D.R., 1982. Anaerobic exercise in teleost fish. *Canadian Journal of Zoology*, 60:1131-1134.
- Jones D.R., Kiceniuk J.W. & Bamford O.S., 1974. Evaluation of the swimming performance of several fish species from the MacKenzie River. *Journal of the Fisheries Research Board of*

- Canada, 31:1641-1647 in: Plaut I., 2001. Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology, A* 131:41-50.
- Junquera S. & Perez-Gandaras G., 1993. Population diversity in Bay of Biscay anchovy (*Engraulis encrasicolus* L. 1758) as revealed by multivariate analysis of morphometric and meristic characters. *ICES Journal of Marine Science*, 50:383-391.
- Kanazawa A., Teshima S., Koshio S., Higashi M. & Itoh S., 1992. Effect of L-ascorbyl-2-phosphate-Mg on the yellowtail *Seriola quinqueradiata* as a vitamin C source. *Nippon Suisan Gakkishi*, 58:337-341.
- Key B. & Devine C. A., 2003. Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies. *Methods in Cell Science*, 25:1-6.
- Kieffer J.D., 2000. Limits to exhaustive exercise in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 126A:161-179.
- Kieffer J.D., Ferguson R.A., Tompa J.E. & Tufts B.L., 1996. Relationship between body size and anaerobic metabolism in brook trout and largemouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 125(5):760-767.
- Kieffer J.D., Kubacki M.R., Phelan F.J., Philipp D.P. & Tufts B.L., 1995. Effects of catch-and-release angling on nesting male smallmouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society*, 124(1):70-76.
- Kieffer J.D., Rossiter A.M., Kieffer C.A., Davidson K. & Tufts B.L., 2002. Physiology and survival of Atlantic salmon following exhaustive exercise in hard and softer water: Implications for the catch-and-release sport fishery. *North American Journal of Fisheries Management*, 22(1):132-144.
- Kihara M., Ogata S., Kawano N., Kubota I. & Yamaguchi R., 2002. Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. *Aquaculture*, 212:149-158.
- Kimmel C.B., 1989. Genetics and early development of zebrafish. *Trends in Genetics*, 5:283-288.
- Kimmel C.B., Ballard W.W., Kimmel S.R., Ullman B. & Schilling T.F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203:253-310.
- Kinsey S.T., Orsoy T., Bert T.M. & Mahmoudi B., 1994. Population structure of the Spanish sardine *Sardinella aurita*: natural morphological variation in a genetically homogeneous population. *Marine Biology*, 118:309-317.
- Kitajima C., Watanabe T., Tsukashima Y. & Fujita S., 1991 Lordotic deformation and abnormal development of swimbladder in some hatchery -bred marine physoclistous fishes. *European Aquaculture Society, Special Publication No. 15*. Gent, Belgium, p. 316.

- Korsmeyer K E., Dewar H., Lai N.C. & Graham J.B., 1996. Tuna aerobic swimming performance: physiological and environmental limits based on oxygen supply and demand. *Comparative Biochemistry and Physiology*, B 113:45-56.
- Koumoundouros G., Oran C., Divanach P., Stefanakis S. & Kentouri M., 1997a. The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquaculture*, 156:165-177.
- Koumoundouros G., Gagliardi F., Divanach P., Boglione C., Cataudella S. & Kentouri M., 1997b. Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L. fry. *Aquaculture*, 149:215-226.
- Koumoundouros G., Divanach P., Anezaki L. & Kentouri M., 2001a. Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biology*, 139:817-830.
- Koumoundouros G., Divanach P. & Kentouri M., 2001b. The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.). *Aquaculture*, 200:285–304.
- Koumoundouros G., Maingot E., Divanach P. & Kentouri M., 2001c. Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture*, 209:49-58.
- Koumoundouros G., Pavlidis M., Anezaki L., Kokkari C., Sterioli A., Divanach P. & Kentouri M., 2002a. Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): Critical sensitive ontogenetic phase. *Journal of Experimental Biology*, 292:573-579.
- Koumoundouros G., Sfakianakis D.G., Divanach P. & Kentouri M., 2002b. Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles. *Journal of Fish Biology*, 60:923-932.
- Koumoundouros G., 2008. First record of saddleback syndrome in wild parrotfish *Sparisoma cretense* (L., 1758) (Perciformes, Scaridae). *Journal of Fish Biology*, 72(3):737-741.
- Koumoundouros G., Ashton C., Sfakianakis D.G., Divanach P., Kentouri M., Anthwal N. & Stickland N.C., 2009a. Thermally induced phenotypic plasticity of swimming performance in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles. *Journal of Fish Biology*, 74:1309-1322.
- Koumoundouros G., Ashton C., Xenikoudakis G., Giopanou I., Georgakopoulou E. & Stickland N., 2009b. Ontogenetic differentiation of swimming performance in gilthead seabream (*Sparus aurata*, L. 1758) during metamorphosis. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 370(1-2):75-81.

- Kutty M.N., 1968. Influence of ambient oxygen on the swimming performance of goldfish and rainbow trout. *Canadian Journal of Zoology*, 46:647-653. *In* Beamish F.W.H., 1978. Swimming capacity, in: Randall W.S., Hoar D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. VII. Academic Press, New York, pp. 101-187.
- Laale H.W., 1977. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology*, 10:121-173.
- Lambert D.J., 1997. *Aquarium fish*. The Apple Press, London, p.19.
- Larson J.D, Wadman S.A., Chen E., Kerley L., Clark K.J., Eide M., Lippert S., Nasevicius A., Ekker S.C., Hackett P.B. & Essner J.J., 2004. Expression of VE-cadherin in Zebrafish Embryos: A New Tool to Evaluate Vascular Development. *Developmental Dynamics*, 231:204-213.
- Lawrence C., 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture*, 269:1–20.
- Lawrence C., Ebersole J.P., Kesseli R.V., 2008. Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Biology of Fish*, 81:239–246.
- Leary R.F., Allendorf F.W. & Knudsen K.L., 1985. Developmental stability and high meristic counts in interspecific hybrids of salmonid fishes. *Evolution*, 39:1318-1326.
- Lein I., Holmefjord I. & Rye M., 1997. Effects of temperature on yolk sac larvae of atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 157:123-135.
- Levin E.D., Swain H.A., Donerly S. & Linney E., 2004. Developmental chorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicology and Teratology*, 26:719-723.
- Lieschke G.J., Currie P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, 8:353-367.
- Lindesjoo E., Thulin J., Bengtsson B.E. & Tjarlund U., 1994. Abnormalities of a gill cover bone, the operculum, in perch *Perca fluviatilis* from a pulp mill effluent area. *Aquatic Toxicology*, 28:189–207.
- Lindsey C.C. & Ali M.Y., 1965. The effect of alternating temperature on vertebral count in the medaka (*Oryzias latipes*). *Canadian Journal of Zoology*, 43:99-104.
- Lindsey C.C., 1988. Factors controlling meristic variation, in: Hoar W.S., Randall D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. XIA. Academic Press, London, pp. 197–274.
- Lopez Albors O., Ayala M.D., Gil F., Garcia Alcazar A., Abellan E., Latorre R., Ramirez Zarzosa G. & Vazquez, J.M., 2003. Early temperature effects on muscle growth dynamics and histochemical profile of muscle fibres of sea bass *Dicentrarchus labrax* L., during larval and juvenile stage. *Aquaculture*, 220:385-406.

- Maack G. & Segner H., 2003. Morphological development of the gonads in zebrafish. *Journal of Fish Biology*, 62(4):895-906.
- Maderspacher F. & Nüsslein-Volhard C., 2003. Formation of the adult pigment pattern in zebrafish requires leopard and obelix dependent cell interactions. *Development*, 130:3447-3457.
- Madsen L. & Dalsgaard I., 1999. Vertebral column deformities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 171:41-48.
- Malek R.L., Sajadi H., Abraham J., Grundy M.A. & Gerhard G. S., 2004. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 138:363–373.
- Mamuris Z., Apostolidis A. P., Panagiotaki P., Theodorou A.J. & Triantaphyllidis C., 1998. Morphological variation between red mullet populations in Greece. *Journal of Fish Biology*, 52:107–117.
- Marino G., Boglione C., Finoia M.G., Bronzi P., Monaco G., Bertolini B. & Cataudella S., 1991. Effects of incubation temperature on embryonic development and hatching of *Dicentrarchus labrax* (L.) eggs, in: European Aquaculture Society, Special Publication no 15. Gent, Belgium, pp. 230–232.
- Martell D.J., Kieffer J.D. & Trippel E.A., 2005. Effects of temperature during early life history on embryonic and larval development and growth in haddock. *Journal of Fish Biology*, 66:1558-1575.
- Martinez E.A., Moore B.C., Schaumloffel J. & Dasgupta N., 2003. Morphological abnormalities in *Chironomus tentans* exposed to cadmium—and copper-spiked sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 55:204–212.
- Martinez M., Guderlay H., Dutil J.D., Winder P.D., He P. & Walsh S.J., 2002. Condition, prolonged swimming performance and muscle metabolic capacities of cod *Gadus morhua*. *Journal of Experimental Biology*, 206:503-511.
- Mathers E.M., Houlihan D.F., Cunningham M.J., 1992a. Estimation of saithe *Pollachius virens* growth rates around the Beryl oil platforms in the North Sea: a comparison of methods. *Marine Ecology Progress Series*, 86:31–40.
- Mathers E.M., Houlihan D.F., Cunningham M.J., 1992b. Nucleic acid concentrations and enzyme activities as correlates of growth rate of the saithe *Pollachius virens*: growth-rate estimates of open-sea fish. *Marine Biology*, 112:363–369.
- Matschak T.W. & Stickland N.C., 1995. The growth of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) myosatellite cells in culture at two different temperatures. *Experientia*, 51:260-266.

- Matsuoka M., 1987. Development of the skeletal tissues and skeletal muscles in red sea bream. *Bulletin of Seikai Regional Fisheries Research Laboratory*, 65:1-114.
- Matthews M., Trevarrow B., Matthews J., 2002. A virtual tour of the guide for zebrafish users. *Lab Animal*, 31:34-40.
- McClelland G.B., Craig P.M., Dhekney K. & Dipardo S., 2006. Temperature- and exercise-induced gene expression and metabolic enzyme changes in skeletal muscle of adult zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Physiology*, 577(2):739-751.
- McConnell E. & Barrows F., 1993. Pathological changes associated with vitamin C deficiency in walleyes. *Journal of Aquatic Animal Health*, 5:287-293.
- McDonald D.G., Milligan C.L., McFarlane W.J., Croke S., Currie S., Hooke B., Angus R.B. & Davidson K., 1998. Condition and performance of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*): Effects of rearing practices on hatchery fish and comparison with wild fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(5):1208-1219.
- Menon A.G.K., 1999. Check list-fresh water fishes of India. *Zoological Survey of India, Calcutta, Occasional Paper No. 175*, p. 366.
- Milligan C.L., 1996. Metabolic recovery from exhaustive exercise in rainbow trout: Review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113A:51-60.
- Milligan C.L. & Girard S.S., 1993. Lactate metabolism in rainbow trout: *Journal of Experimental Biology*, 180:175-193.
- Milligan C.L., Hooke G.B. & Johnson C., 2000. Sustained swimming at low velocity following about of exhaustive exercise enhances metabolic recovery in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology*, 203(5):921-926.
- Mills D. & Vevers G., 1989. *The Tetra encyclopedia of freshwater tropical aquarium fishes*. Tetra Press, New Jersey, p. 208.
- Moyes C.D. & West T.G., 1995. Exercise metabolism of fish, in: Hochachka P.W., Mommsen T.P. (Eds.), *Biochemistry and molecular biology of fishes*, Vol 4. Elsevier Science, B.V.
- Moyes C.D., Schulte P.M. & Hochachka P.W., 1992. Recovery metabolism of trout white muscle: Role of mitochondria. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 262(2 31-2):R295-R304.
- Murray C.B. & Beacham T., 1989. Responses of meristic characters in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) to temperature changes during development. *Canadian Journal of Zoology*, 67:596-600.

- Nacario J.F., 1983. The effect of thyroxine on the larvae and fry of *Sarotherondon niloticus* (*Tilapia nilotica*). *Aquaculture*, 34:73–83.
- Nathanailides C., Lopez-Albors O. & Stickland N.C., 1995. Influence of pre-hatch temperature on the development and muscle cellularity in post-hatch Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52:675-680.
- Neilson A.H., Allard A.S., Fischer S., Malberg M. & Victor T., 1990. Incorporation of subacute test with zebrafish into a hierarchical system of evaluating the effect of toxicants in the aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30:54-62.
- Neira R., Díaz N.F., Gall G.A.E., Gallardo J.A., Lhorente J.P. & Manterola R., 2006. Genetic improvement in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). I: Selection response and inbreeding depression on harvest weight. *Aquaculture*, 257:9–17
- O'Reilly K.M & Horn M.H., 2004. Phenotypic variation among populations of *Atherinops affinis* (Atherinopsidae) with insights from a geometric morphometric analysis. *Journal of Fish Biology*, 64:1117–1135.
- Ojanguren A.F. & Brana F., 2000. Thermal dependence of swimming endurance in juvenile brown trout. *Journal of Fish Biology*, 56:1342-1347.
- Ospina-Alvarez N., Piferrer F., 2008. Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change. *PLoS ONE* 3(7):e2837.
- Pakkasmaa S. & Piironen J., 2001. Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society*, 72:231–239.
- Pante M.J., Gjerde B., McMillan I., 2001. Inbreeding levels in selected populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 192:213–224.
- Park E.H. & Kim D.S., 1984. A procedure for staining cartilage and bone of whole vertebrate larvae while rendering all other tissues transparent. *Staining Technology*, 59:269-272.
- Paton K.R., Cake M.H. & Potter I.C., 2001. Muscle glycogen, lactate and glycerol-3-phosphate concentrations of larval and young adult lampreys in response to exercise. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 129:759-766.
- Pavlidis M., Koumoundouros G., Sterioti A., Somarakis S., Divanach P. & Kentouri M., 2000. Evidence of Temperature-Dependent Sex Determination in the European Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Journal of Experimental Zoology*, 287:225–232.
- Pavlov D.A., 1997. Development of head skeleton and paired fin girdles in wolffish, *Anarhichas lupus*, at different temperature regimes. *Journal of Ichthyology*, 37:294–303.

- Pavlov D.A. & Moksness E., 1997. Development of the axial skeleton in wolffish, *Anarhichas lupus* (Pisces, Anarhichadidae), at different temperatures. *Environmental Biology of Fishes*, 49:401–416.
- Pelosi S., Villani P. & Cozzolino G.C., 1993. The effects of temperature on the eggs and larval development of *Dicentrarchus labrax* L, in: Barnabe G., Kestemont P (Eds.), *Production, Environment and Quality*, European Aquaculture Society, Special Publication 18, Gent, Belgium, pp. 205–209.
- Pelletier D., Guderley H., Dutil J.D., 1993a. Does the aerobic capacity of fish muscle change with growth rates?. *Fish Physiology and Biochemistry*, 12:83–93.
- Pelletier D., Guderley H., Dutil J.D., 1993b. Effects of growth rate, temperature, season, and body size on glycolytic enzyme activities in the white muscle of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Experimental Zoology*, 265:477–487.
- Petr T., 1999. Coldwater fish and fisheries in Bhutan. In: Petr T. (Ed.), *Fish and fisheries at higher altitudes: Asia*. FAO Fisheries, Technical Paper, No 385, Rome, pp. 6-12.
- Pieau C., 1996. Temperature variation and sex determination in reptiles. *BioEssays*, 18:19–26.
- Pigliucci M., Murren C.J. & Schlichting C.D., 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *The Journal of Experimental Biology*, 209:2362-2367.
- Piron R.D., 1978. Spontaneous deformities in the Zebra Danio (*Brachydanio rerio*) bred for fish toxicity tests. *Journal of Fish Biology*, 13:79–83.
- Plaut I., 2000. Effects of fin size in swimming performance, swimming behaviour and routine activity of zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Experimental Biology*, 203:813-820.
- Plaut I., 2001. Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 131:41-50.
- Plaut I. & Gordon M., 1994. Swimming metabolism of wild-type and cloned zebrafish *Brachydanio rerio*. *Journal of Experimental Biology*, 194:209-223.
- Policansky D., 1982. Influence of age, size, and temperature on metamorphosis in the starry flounder, *Platichthys stellatus*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39:514-517.
- Polo A., Yufero M. & Pascual E., 1991. Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 92:367-375.
- Popper A.N. & Coombs S., 1980. Auditory mechanisms in teleost fishes. *American Scientist*, 68:429-440.

- Pritchard V.L., Lawrence J., Butlin R.K. & Krause J., 2001. Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. *Animal Behaviour*, 62(6):1085-1088.
- Purdom C.E., 1993. *Genetics and Fish Breeding*. Chapman & Hall, London.
- Rach J.J., Gaikowski M.P., Howe G.E. & Schreier T.M., 1998. Evaluation of the toxicity of hydrogen peroxide treatments on warm- and cool-water fish eggs. *Aquaculture*, 165:11-25.
- Rana K.J., 1990. Influence of incubation temperature on *Oreochromis niloticus* (L.) eggs and fry II. Survival, growth and feeding of fry developing sole on their yolk reserves. *Aquaculture*, 87:183-195.
- Randall D.J. & Tsui T.K.N., 2002. Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin*, 45:17-23.
- Reeves R.B., 1977. The interaction of body temperature and acid-base balance in ectothermic vertebrates. *Annual Review of Physiology*, 39:559-586.
- Reidy S.P., Kerr S.R. & Nelson J.A., 2000. Aerobic and anaerobic swimming performance of individual Atlantic cod. *Journal of Experimental Biology*, 203:347-357.
- Reist J., 1985. An empirical evaluation of several univariate methods that adjust for size variation in morphometric data. *Canadian Journal of Zoology*, 63:1429-1439.
- Richards J.G., Heigenhauser G.J.F. & Wood C.M., 2002. Lipid oxidation fuels recovery from exhaustive exercise in white muscle of rainbow trout. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 282(1 51-1):R89-R99.
- Riehl R. & Baensch H.A., 1991. *Aquarien Atlas*. Band. 1. Melle: Mergus, Verlag für Natur-und Heimtierkunde, Germany, p.992.
- Rossiter A.M., 1996. Physiology and survival of Atlantic salmon following exhaustive exercise in soft and acidic water: implications for the catch and release fishery. M.Sc. Thesis. Queen's University, Kingston, Canada, p. 82.
- Salini J.P., Milton D.A., Rahman M.J. & Hussain M.G., 2003. Allozyme and morphological variation throughout the geographic range of the tropical shad, hilsa *Tenualosa ilisha*. *Fisheries Research*, 66:53-69.
- Sancho E., Ferrando M.D., Andreu-Moliner E.S., 1999: Fenitrochion induced changes in the European Eel metabolism. *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, 2(1):7-13.
- Sandford G., 2003. *Aquarium Owner's Manual*. Doring Kinderslay Limited, London, p. 66.
- Sato M., Kondo I., Yoshinaka R. & Ikeda S., 1983. Effects of water temperature on the skeletal deformity in ascorbic acid-deficient rainbow trout. *Bulletin of Japanese Society Sci. Fish.* Nissuishi, 49:443-446.

- Schirone R.C., Gross L., 1968. Effect of Temperature on Early Embryological Development of the Zebra Fish, *Brachydmio rerio*. Journal of Experimental Zoology, 169:43-52.
- Seikai T., Tanangonan J. B. & Tanaka M., 1986. Temperature influence on larval growth and metamorphosis of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in the laboratory. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 52:977-982.
- Sfakianakis D., Koumoundouros G., Anezaki L., Divanach P. & Kentouri M., 2003. Development of a saddleback-like syndrome in reared white seabream *Diplodus sargus* (Linnaeus, 1758). Aquaculture, 217:673-676.
- Sfakianakis D.G., Koumoundouros G., Divanach P. & Kentouri M., 2004. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities. Aquaculture, 232:407-424.
- Sfakianakis D.G., Doxa C.K., Kouttouki G., Koumoundouros G., Maingot E., Divanach P. & Kentouri M., 2005. Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). Aquaculture, in press.
- Sfakianakis D.G., Georgakopoulou E., Papadakis I.E., Divanach P., Kentouri M. & Koumoundouros G., 2006. Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). Aquaculture, 254(1-4):54-64.
- Sfakianakis D.G. & Kentouri M. Effect of temperature on muscle lactate metabolic recovery in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) juveniles exposed to exhaustive exercise. Fish Physiology and Biochemistry, in press.
- Shang E.H.H., Yu R.M.K., Wu R.S.S., 2006. Hypoxia affects sex differentiation and development leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Science and Technology, 40:3118-3122.
- Shields R.J., 2001. Larviculture of marine finfish in Europe. Aquaculture, 200:55-88.
- Shirak A., Palti Y., Cnaani A., Korol A., Hulata G., Ron M. & Avtalion R.R., 2002. Association between loci with deleterious alleles and distorted sex ratios in an inbred line of tilapia (*Oreochromis aureus*). Journal of Heredity, 93(4):270-276.
- Shrestha T.K., 1990. Resource ecology of the Himalayan waters. Curriculum Development Centre, Tribhuvan University, Kathmandu, Nepal, p. 645.
- Silva A., 2003. Morphometric variation among sardine (*Sardina pilchardus*) populations from the northeastern Atlantic and the western Mediterranean. ICES Journal of Marine Science, 60:1352-1360.

- Sokal R.R., & Rohlf F.J., 1995. *Biometry: the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, 3rd edition. Freeman W.H. and Co., New York, pp. 887.
- Somero G.N., 1995. Proteins and temperature. *Annual Review of Physiology*, 57:43-68.
- Somero G.N., Childress J.J., 1985. Scaling of oxidative and glycolytic enzyme activities in fish muscle, in: Gilles R. (Ed.), *Circulation, respiration, and metabolism*. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag, pp. 250–262.
- Spence R., Gerlach G., Lawrence C., Smith C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, 83:13–34.
- Sprague J.B. & Fogels A., 1977. Watch the Y in bioassay in: Parker W.R., Pessah E., Wells P.G., Westlake G.F. (Eds.), *Proceedings of the 3rd Aquatic Toxicity Workshop*. Halifax, NS, Canada, November 2-3, pp. 107-118.
- Steffensen J.F. & Farrell A.P., 1998. Swimming performance, venous oxygen tension and cardiac performance of coronary-ligated Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to progressive hypoxia. *Comparative Biochemistry and Physiology, A* 119:585-592.
- Strauss R. E. & Bookstein F.L., 1982. The truss: body form reconstruction in morphometrics. *Systematic Zoology*, 31:113–135.
- Strüssmann C.A. & Nakamura M., 2002. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26:13–29.
- Strüssmann C.A., Calsina Cota J.C., Phonlor G., Higuchi H., Takashima F., 1996. Temperature effects on sex differentiation of two South American atherinids, *Odontesthes argentinensis* and *Patagonina hatchery*. *Environmental Biology of Fishes*, 47(2):143-154.
- Strüssmann C.A., Saito T., Usui M., Yamada H., Takashima F., 1997. Thermal thresholds and critical period of thermolabile sex determination in two atherinid fishes, *Odontesthes bonariensis* and *Patagonina hatchery*. *Journal of Experimental Zoology*, 278(3):167-177.
- Sugiura S.H., Hardy R.W. and Roberts R.J., 2004. The pathology of phosphorus deficiency in fish – a review. *Journal of Fish Biology*, 27:255-265.
- Sullivan K.M., Somero G.N., 1983. Size- and diet-related variations in enzymic activity and tissue composition in the sablefish, *Anoplopoma fimbria*. *Biological Bulletin*, 164:315–326.
- Suski C.D., Killen S.S., Morrissey M.B., Lund S.G. & Tufts B.L., 2003. Physiological changes in largemouth bass caused by live-release angling tournaments in Southeastern Ontario. *North American Journal of Fisheries Management*, 23(3):760-769.

- Suski C.D., Killen S.S., Kieffer J.D. & Tufts B.L., 2006. The influence of environmental temperature and oxygen concentration on the recovery of largemouth bass from exercise: Implications for live-release angling tournaments. *Journal of Fish Biology*, 68(1):120-136.
- Swanson C., Baxa D.V., Young P.S., Cech J.J.Jr. & Hedrick R.P., 2002. Reduced swimming performance in delta smelt infected with *Mycobacterium* spp. *Journal of Fish Biology*, 61:1012-1020.
- Takahashi H., 1977. Juvenile hermaphroditism in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*, 28:57-65.
- Takeuchi T., Dedi J., Ebisawa C., Watanabe T., Seikai T., Hosoya K. & Nakazone J.I., 1995. The effect of beta-carotene and vitamin A enriched *Artemia* nauplii on the malformation and color abnormality of larval Japanese flounder. *Fisheries Science*, 61:141-148.
- Takeuchi T., Dedi J., Haga Y., Seikai T. & Watanabe T., 1998. Effect of a vitamin A compounds on bone deformity in larval Japanese flounder (*Paralychthys olivaceus*). *Aquaculture*, 165:155-165.
- Talwar P.K. & Jhingran A.G., 1991. Inland fishes of India and adjacent countries. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, Vol. 1, p. 541.
- Taning A.V., 1952. Experimental study of meristic characters in fishes. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 27:169-193.
- Tave D., 1999. Inbreeding and brood stock management. *FAO Fisheries Technical Paper*, Vol. 392. FAO, Rome, pp. 122.
- Taylor W.R. & Van Dyke G.C., 1985. Revised procedures for staining and clearing small fishes and other vertebrates for bone and cartilage study. *Cybiurn*, 9:107-119.
- Teh S.J., Deng X., Teh F.C. & Hung S.O., 2002. Selenium-induced teratogenicity in Sacramento splittail (*Pogonichthys macrolepidotus*). *Marine Environmental Research*, 54:605-608.
- Thomas P.M., Pankhurst N.W., Bremner H.A., 1999. The effect of stress and exercise on post-mortem biochemistry of Atlantic salmon and rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, 54:1177-1196.
- Tiernay K.B. & Farrell A.P., 2004. The relationships between fish health, metabolic rate, swimming performance and recovery in return-run sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 27:663-671.
- Trede N.S., Langenau D.M., Traver D., Look T. & Zon L.I., 2004. The use of zebrafish to understand immunity. *Immunity*, 20:367-379.

- Trotter A.J., Pankhurst P.M., Morehead D.T. & Battaglene S.C., 2003. Effects of temperature on initial swim bladder inflation and related development in cultured striped trumpeter (*Latris lineate*) larvae. *Aquaculture*, 221:141-156.
- Tudela S., 1999. Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Fisheries Research*, 42:229-243.
- Turan C., 2004. Stock identification of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) using morphometric and meristic characters. *ICES Journal of Marine Science*, 61:774-781.
- Turan C., 2006. The use of otolith shape and chemistry to determine stock structure of Mediterranean horse mackerel *Trachurus mediterraneus* (Steindachner). *Journal of Fish Biology*, C 69:165-180.
- Turan C., Oral M., Ozturk B. & Duzgunes E., 2006. Morphometric and meristic variation between stocks of Bluefish (*Pomatomus saltatrix*) in the Black, Marmara, Aegean and north-eastern Mediterranean Seas. *Fisheries Research*, 79:139-147.
- Uchida D., Yamashita M., Kitano T. & Iguchi T., 2002. Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *Journal of Experimental Biology*, 205:711-718.
- Uchida, D., Yamashita, M., Kitano, T., Iguchi, T., 2004. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 137:11-20.
- Valdesalici S. & Cellerino A., 2003. Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, (Suppl.).
- Valenzuela N., Adams D.C., Janzen F.J., 2003. Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined? *American Naturalist*, 161:676-683.
- Venizelos A. & Benetti D.D., 1999. Pigment abnormalities in flatfish. *Aquaculture*, 176:181-188.
- Von Herbing H., 2002. Effects of temperature on larval fish swimming performance: the importance of physics to physiology. *Journal of Fish Biology*, 61:865-876.
- Wagner G.N., Balfry S.K., Higgs D.A., Lall S.P. & Farrell A.P., 2004. Dietary fatty acid composition affects the repeat swimming performance of Atlantic salmon in seawater. *Comparative Biochemistry and Physiology*, A 137:567-576.
- Wakefield A.M., Cunjak R.A. & Kieffer J.D., 2004. Metabolic recovery in Atlantic salmon fry and parr following forced activity. *Journal of Fish Biology*, 65:920-932.

- Wang L.H. & Tsai C.L., 2000. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Experimental Zoology*, 286:534-537.
- Wang X.G. Bartfai R., Sleptsova-Freidrich I. & Orban L., 2007. The timing and extent of 'juvenile ovary' phase are highly variable during zebrafish testis differentiation. *Journal of Fish Biology*, A 70:33-44.
- Wannemacher R., Rebstock A., Kulzer E., Schrenk D. & Bock K.W., 1992. Effects of 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on reproduction and oogenesis in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Chemosphere*, 24:1361–1368.
- Webb P. W., 1971. The swimming energetics of trout II. Oxygen consumption and swimming energetics. *Journal of Experimental Biology*, 55:521-540.
- Welcomme R.L., 1988. International introductions of inland aquatic species. FAO Fisheries Technical Paper no. 294, p.318.
- Wells R.M.G., Mcardle B.H., 2002: Seasonal effect on lactate dehydrogenase and citrate synthase in snapper (*Pagrus auratus*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 36:233–239.
- Westerfield M., 1995. The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio rerio*), 3rd edition. University of Oregon Press, Eugene, OR., pp. 385.
- Wicks B.J., Joensen R., Tang Q. & Randall D.J., 2002. Swimming and ammonia toxicity in salmonids: the effect of sub lethal ammonia exposure on the swimming performance of coho salmon and the acute toxicity of ammonia in swimming and resting rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 59:55-69.
- Widmer S., Moore F.B.G. & Bagatto B., 2006. The effects of chronic developmental hypoxia on swimming performance in zebrafish. *Journal of Fish Biology*, 69(6):1885-1891.
- Wiegand C., Krause E., Steinberg C. & Pflugmacher S., 2001. Toxicokinetics of Atrazine in embryos of zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49:199-205.
- Wiegand M.D., Hataley J.M., Kitchen C.L. & Buchanan L.G., 1989. Induction of developmental abnormalities in larval goldfish, *Carassius auratus* L., under cool incubation conditions. *Journal of Fish Biology*, 35:85-95.
- Wieser W. & Kauffman R., 1998. A note on interactions between temperature, viscosity, body size and swimming energetics in fish larvae. *Journal of Experimental Biology*, 201:1369-1372.
- Wilkes D., Xie S.Q., Stickland N.C., Alami-Durante H., Kentouri M., Steriotti A., Koumoundouros G., Fauconneau B. & Goldspink G., 2001. Temperature and myogenic factor

- transcript levels during early development determines muscle growth potential in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Experimental Biology*, 204:2763-2771.
- Wilkie M.P., Davidson K., Brobbel M.A., Kieffer J.D., Booth R.K., Bielak A.T. & Tufts B.L., 1996. Physiology and survival of wild Atlantic salmon following angling in warm summer waters. *Transactions of the American Fisheries Society*, 125(4):572-580.
- Wilkinson R.J., Paton N. & Porter M.J.R., 2008. The effects of pre-harvest stress and harvest method on the stress response, rigor onset, muscle pH and drip loss in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture*, 282:26-32.
- Wilson R.S., Kuchel L.J., Franklin C.E. & Davison W., 2002. Turning up the heat on subzero fish: thermal dependence of sustained swimming in an Antarctic notothenioid. *Journal of Thermal Biology*, 27:381-386.
- Wimberger P.H., 1992. Plasticity of fish body shape: the effects of diet, development, family and age in two species of *Geophagus* (Pisces: Cichlidae). *Biological Journal of Linnean Society*, 45:197-218.
- Wokoma A. & Johnston I.A., 1981. Lactate production at high sustainable cruising speeds in rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Journal of Experimental Biology*, 90:361-364.
- Wood C.M., 1991. Acid-base and ion balance, metabolism, and their interactions, after exhaustive exercise in fish. *Journal of Experimental Biology*, 160:285-308.
- Xie S.Q., Mason P.S., Wilkes D., Goldspink G., Fauconneau B. & Stickland N.C., 2001. Lower environmental temperature delays and prolongs myogenic regulatory factor expression and muscle differentiation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. *Differentiation*, 68:106-114.
- Yamamoto T., 1969. Sex differentiation, in: Hoar W.S., Randall D.J. (Eds.), *Fish Physiology*, Vol. 3, Reproduction and Growth, Bioluminescence, Pigments and Poisons. Academic Press, New York, pp. 117-175.
- Yang T.H., Somero G.N., 1993: Effects of feeding and food deprivation on oxygen consumption, muscle protein concentration and activities of energy metabolism enzymes in muscle and brain of shallow-living (*Scorpaena guttata*) and deep-living (*Sebastolobus alascanus*) scorpaenid fishes. *Journal of Experimental Biology*, 181:213-232.
- Yoder J.A., Nielsen M.E., Amemiya C.T. & Litman G.W., 2002. Zebrafish as an immunological model system. *Microbes and Infection*, 4:1469-1478.

- Young P.S., 2004. Photophase and illumination effects on the swimming performance and behavior. *Copeia*, 3:479-487.
- Young P.S. & Cech J.J., 1993. Effects of exercise conditioning on stress response and recovery in cultured and wild young-of-the-year striped bass, *Morone saxatilis*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50:2094-2099.
- Young P.S. & Cech Jr.J.J., 1994. Optimum exercise conditioning velocity for growth, muscular development, and swimming performance in young-of-the-year striped bass (*Morone saxatilis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51(7):1519-1527.
- Κουμουندούρος Γ., 1998. Οντογένεση της λειτουργικής μορφολογίας και κριτήρια ποιότητας των νυμφών και ιχθυδίων της συναγρίδας *Dentex dentex* (L., 1758), σε συνθήκες εκτροφής. Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το zebrafish είναι ένα μικρό, πολύχρωμο, τροπικό ψάρι που αποικίζει μικρές λίμνες και ρυάκια της Νοτιοανατολικής Ασίας. Τις τελευταίες δεκαετίες αποτελεί έναν πολύ σημαντικό οργανισμό-μοντέλο σε διάφορα πεδία έρευνας όπως η Νευροβιολογία, η Αναπτυξιακή Βιολογία και η Γενετική. Παρόλα αυτά, τα υπάρχοντα δεδομένα βιολογίας και οικολογίας του είδους είναι εξαιρετικά ελλιπή, με συνέπεια να υπάρχει ένα αρκετά μεγάλο κενό γνώσης όσον αφορά στις προτιμήσεις του απέναντι στις περιβαλλοντικές συνθήκες και ιδίως ως προς τη θερμοκρασία που αποτελεί την πιο καθοριστική. Το αντικείμενο λοιπόν της παρούσας εργασίας είναι να μελετηθεί η επίδραση διαφορετικών θερμοκρασιών ανάπτυξης στη μορφολογία και τη λειτουργία του μικρού αυτού οργανισμού.

Για να γίνει αυτό, χρησιμοποιήθηκαν αυγά από γεννήτορες άγριου τύπου του εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών (Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης), τα οποία τοποθετήθηκαν μετά την ωοτοκία σε τέσσερα διαφορετικά ενυδρεία με θερμοκρασίες 22, 25, 28 και 31 °C. Όλες οι συνθήκες –πέραν της θερμοκρασίας- παρέμειναν οι ίδιες και σταθερές μεταξύ των τεσσάρων ενυδρείων. Τα αυγά εκκολάφθηκαν και οι νύμφες μεγάλωσαν στα ενυδρεία αυτά μέχρι περίπου και τη μεταμόρφωση οπότε και έγιναν οι δειγματοληψίες για τη διενέργεια των μελετών. Οι εκτροφές έγιναν σε 2 επαναλήψεις ενώ όλη η διαδικασία πραγματοποιήθηκε 3 φορές για την κάλυψη των αναγκών σε δείγματα. Οι χαρακτήρες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν οι παραμορφώσεις, το σχήμα του σώματος, τα μεριστικά στοιχεία, το φύλο, η ικανότητα κολύμβησης και ο μεταβολισμός του γαλακτικού οξέος στους μύες του ψαριού.

Για τη μελέτη των παραμορφώσεων εξετάστηκαν η σπονδυλική στήλη και το ραχιαίο, εδρικό και ουραίο πτερύγιο σε άτομα μήκους $13,78 \pm 2,9$ mm TL. Τα άτομα που επιλέχθηκαν (50 ανά επανάληψη ανά θερμοκρασιακή συνθήκη) υποβλήθηκαν σε διπλή χρώση αλιζαρίνης-κυανού της αλσατίας και εξετάστηκαν σε στερεοσκόπιο. Η μελέτη τους έδειξε ότι δεν υπήρξε σαφής επίδραση της θερμοκρασίας καθώς σε όλες τις θερμοκρασιακές συνθήκες που εξετάστηκαν, παρουσιάστηκαν υψηλά ποσοστά παραμορφώσεων στο σύνολο σχεδόν των εξετασθέντων ατόμων (100% εμφάνιση παραμορφωμένων ατόμων σε όλες τις θερμοκρασίες πλην των 25 °C όπου τα παραμορφωμένα αποτέλεσαν το 99% του πληθυσμού). Από την άλλη πλευρά, η

πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι το είδος των παραμορφώσεων που εμφανίζεται σε κάθε άτομο επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία ανάπτυξης και ότι τα διαφορετικά αυτά είδη κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο μεγάλες ομάδες: τις παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης και τις παραμορφώσεις των πτερυγίων.

Για τη μελέτη του σχήματος του σώματος τοποθετήθηκαν 17 γεωμετρικά ορόσημα (landmarks) σε ψηφιακές φωτογραφίες 50 ατόμων ανά θερμοκρασιακή συνθήκη μήκους $13,5 \pm 1,9$ mm TL. . Από τα σημεία αυτά οριοθετήθηκαν 28 αποστάσεις (μορφομετρικοί χαρακτήρες) στο σώμα των ατόμων οι οποίες απετέλεσαν τη βάση της πολυπαραγοντικής ανάλυσης του σχήματος του σώματος. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης επιδρά σημαντικά στο σχήμα του σώματος των zebrafish και ότι οι χαρακτήρες που συνεισφέρουν περισσότερο στη διαφοροποίηση των ομάδων εντοπίζονται στο οπίσθιο μέρος του σώματος.

Τα μεριστικά στοιχεία μελετήθηκαν στα ίδια άτομα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν και για την ανάλυση του σχήματος του σώματος. Τα άτομα αυτά υποβλήθηκαν σε διπλή χρώση αλιζαρίνης-κυανού της αλσατίας και εξετάστηκαν (σε στερεοσκόπιο) η σπονδυλική στήλη, το ραχιαίο, το εδρικό, το ουραίο, τα θωρακικά και τα κοιλιακά πτερύγια. Όπως αποδείχθηκε, η θερμοκρασία που επικρατεί κατά την οντογένεση του zebrafish έχει έντονη επίδραση στον τελικό αριθμό των μεριστικών του στοιχείων καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις παρατηρήθηκε διαφοροποίηση του αριθμού τους στις ακραίες θερμοκρασίες (22 και/ή 31 °C) σε σχέση με τις υπόλοιπες. Ειδικότερα, ο αριθμός των σπονδύλων και των ακτίνων του ραχιαίου πτερυγίου ήταν μεγαλύτερος στους πληθυσμούς των 22 °C, ενώ ο αριθμός των ακτίνων των θωρακικών και κοιλιακών πτερυγίων ήταν μικρότερος στους πληθυσμούς των 31 °C. Στις ακτίνες του εδρικού πτερυγίου η διαφοροποίηση εντοπίστηκε μεταξύ των χαμηλών (22 και 25 °C) και των υψηλών (28 και 31 °C) θερμοκρασιών ενώ στις ακτίνες του ουραίου πτερυγίου (λεπιδοτρίχια και δερματοτρίχια) δεν παρατηρήθηκε κάποια συγκεκριμένη τάση.

Η εκτροφή των δειγμάτων για την ανάλυση του φύλου ολοκληρώθηκε 94-107 ημέρες μετά την εκκόλαψη με την τυχαία δειγματοληψία και τη συντήρηση 25 ατόμων από κάθε επανάληψη και θερμοκρασία. Η ιστολογία των γονάδων που πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου

Θαλασσιών Ερευνών (Δρ. Μυλωνάς) αποκάλυψε ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης επιδρά σημαντικά στην αναλογία του φύλου στους πληθυσμούς zebrafish. Συγκεκριμένα, η χαμηλή θερμοκρασία εκτροφής οδήγησε σε κυριαρχία των αρσενικών μέσα στον πληθυσμό (22 °C, 87.1 % αρσενικά), οι δύο ενδιάμεσες (25 και 28 °C) σε αναλογία φύλου 1:1 και η υψηλότερη θερμοκρασία της δοκιμής σε κυριαρχία των θηλυκών (31 °C, 82.4 % θηλυκά).

Για τη μελέτη της κολύμβησης χρησιμοποιήθηκαν αρσενικά άτομα zebrafish μήκους $34,4 \pm 2,17$ mm TL από τις τέσσερις θερμοκρασίες ανάπτυξης τα οποία είχαν προηγουμένως εγκλιματιστεί στη θερμοκρασία των πειραμάτων (26,5 °C) για ενάμιση περίπου μήνα. Οι μετρήσεις κολύμβησης έγιναν σε ειδική συσκευή του εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών και έδειξαν ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης επιδρά σημαντικά στην κολυμβητική ικανότητα των ατόμων με τους πληθυσμούς από τους 31 °C να αποδεικνύονται οι ταχύτεροι κολυμβητές ενώ εκείνοι από τους 22 °C οι χειρότεροι. Παράλληλα, εξετάστηκε μια σειρά από μορφομετρικούς χαρακτήρες στα πειραματικά άτομα όπως το βάρος, το πάχος του σώματος, το ύψος του σώματος, το μέγιστο ύψος του σώματος και το ύψος του ουραίου μίσχου και δε βρέθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών πειραματικών ομάδων.

Για τη μελέτη του μεταβολισμού του γαλακτικού οξέος στο μυς των ψαριών, χρησιμοποιήθηκαν άτομα από την ίδια εκτροφή με τη μελέτη της κολύμβησης τα οποία υποβλήθηκαν στην ίδια διαδικασία εγκλιματισμού. Μετρήθηκε το γαλακτικό οξύ στους μυς 35 ατόμων ανά θερμοκρασία, τα οποία ήταν κατανεμημένα ανά 5 στις εξής δειγματοληπτικές περιόδους: σε κατάσταση ηρεμίας, μετά από πλήρη εξουθένωση λόγω κολύμβησης και μετά από ξεκούραση (recovery) μισής ώρας, μίας ώρας, τριών ωρών, έξι ωρών και εννιά ωρών. Η ανάλυση του γαλακτικού οξέος που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής (Δρ. Παπακωνσταντή) αποκάλυψε ότι σε όλες τις περιπτώσεις το πρότυπο του μεταβολισμού του γαλακτικού οξέος ακολουθεί τη γνωστή οδό που έχει περιγραφεί σε άλλα είδη, αφού αυξάνει κατά τη διάρκεια της άσκησης και κατόπιν μειώνεται κατά την ξεκούραση. Σημειώθηκε επίσης ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης δεν επηρεάζει την αρχική και τελική συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος (σε κατάσταση ηρεμίας και σε πλήρη εξουθένωση αντίστοιχα) αλλά

επιρεάζει την ταχύτητα αποδόμησής του καθώς οι πληθυσμοί των 22 °C χρειάστηκαν αρκετά μεγαλύτερο χρόνο από τους υπόλοιπους για να επανέλθουν σε κατάσταση ηρεμίας.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας γίνεται σαφές ότι το zebrafish αποτελεί έναν ιδιαιτέρως ευαίσθητο οργανισμό ως προς την επίδραση της θερμοκρασίας που επικρατεί κατά την ανάπτυξή του. Η παρατηρούμενη αυτή πλαστικότητα του στις θερμοκρασιακές αλλαγές είναι επιβεβλημένη διότι διαβιεί σε οικοσυστήματα (λίμνες και ρυάκια) με έντονες εποχιακές ή και ημερήσιες διακυμάνσεις της θερμοκρασίας τους. Η επιτυχής προσαρμογή του είδους στις αλλαγές αυτές του περιβάλλοντός εξασφαλίζουν τελικά την ασφαλή διαίωνιση του.

ABSTRACT

Zebrafish is a small colorful tropical fish that inhabits small ponds and slow moving streams in Southeast Asia. For the past few decades, it has been a very important model-organism in research fields such as Neurobiology, Developmental Biology and Genetics. Despite that, existing data on its biology and ecology remain scarce and as a result there is an important lack of knowledge concerning its preferences towards the environmental conditions, especially temperature which is considered as the most crucial. The object of the current study therefore is to examine the effect of different developmental temperatures on the morphology and function of this small organism.

In order to do so, eggs from a wild type broodstock kept in the Aquaculture lab (Biology Department, University of Crete) were used. After spawning, the eggs were introduced in four tanks of different water temperatures (22, 25, 28 and 31 °C). All other environmental conditions were kept stable and the same between the four tanks. The eggs hatched and the larvae developed in the tanks until about metamorphosis where the samplings took place. Duplicate experiments were conducted, whereas the whole procedure was repeated 2 more times in order to cover the demand for samples. The characters that were chosen to be studied were the deformities, the body shape, the meristics, the sex, the swimming ability and the muscle lactate metabolism.

For the deformities study, the vertebral column and the dorsal, anal and caudal fin were studied on specimens of $13,78 \pm 2,9$ mm TL (Total Length). Specimens (50 per duplicate per temperature condition) were subjected to double staining of Alizarin and Alcian Blue and were studied under a stereoscope. Their study revealed that there is not a clear effect of temperature since in almost all groups studied, the percentage of deformed specimens was the same and total (100%, with the exception of 25 °C where the percentage of the deformed was 99%). On the other hand, multivariate analysis showed that the type of the deformity present in each specimen was affected by the developmental temperature and that all different types were categorized into 2 different groups: the vertebral deformities and the fin deformities (Cluster Analysis).

For the body shape analysis, 17 landmarks were placed on the digital photographs of 50 specimens from each temperature condition sized $13,5 \pm 1,9$ mm TL. Those landmarks produced 28 distances (morphometric characters) on which the multivariate analy-

sis of the body shape was conducted. The analysis showed that developmental temperature significantly affects body shape and that the characters that mostly contribute to the groups' differentiation are located at the posterior part of the fish body.

Meristic elements were studied on the same specimens as the body shape analysis. Those specimens were subjected to double staining of Alizarin and Alcian Blue and then the vertebral column, the dorsal, anal, caudal, pectoral and pelvic fins were studied under a stereoscope. As it was shown, ontogenetic temperature has an important effect on the meristic numbers since in most cases, fish developed at the extreme temperatures (22 and/or 31 °C) were clearly differentiated from the others. Specifically, meristic counts of the vertebral column and of the dorsal fin rays were significantly higher at the 22 °C populations, whereas meristic counts of the pectoral and the pelvic fins were significantly lower at the 31 °C populations. Anal fin rays presented differentiation between the low temperature (22 and 25 °C) and the high temperature groups (28 και 31 °C), while the caudal fin rays (lepidotrichia and dermatotrichia) did not present any particular trend.

Fish rearing for the sex study was terminated at 94-107 days post hatching with the random sampling and preservation of 25 specimens per duplicate per temperature. Histological observation of the gonads performed at the Institute of Aquaculture at the Hellenic Centre of Marine Research (Dr Mylonas) revealed that lower developmental temperatures induced masculinization (22 °C, 87.1 % males) whereas higher temperatures resulted in female-biased populations (31 °C, 82.4 % females). The intermediate temperatures (25 and 28 °C) led to 1:1 sex ratio.

For the swimming trials, only male zebrafish from the four different developmental temperatures were used. They were sized $34,4 \pm 2,17$ mm TL and prior to the trials, were acclimatized to the swimming temperature (26,5 °C) for about one and a half month. The swimming trials were performed on a special apparatus of the Aquaculture lab and showed that developmental temperature has an important effect on the swimming ability of zebrafish, since the populations from 31 °C proved to be the fastest swimmers while the ones from 22 °C the slowest. A number of morphometric characters such as the weight, body width, body depth, maximum body depth and body depth at the caudal pe-

duncle were examined and no differentiation was found between the different experimental groups.

For the muscle lactate metabolism study, specimens as the ones of the swimming trials were used and were also subjected to the same acclimatization procedure. Muscle lactate concentration was estimated on 35 specimens per temperature which were distributed at the following sampling periods: at rest, after full exhaustion due to swimming and after recovery for half hour, one hour, three hours, six hours and nine hours. Lactate analysis was performed on the Biochemistry Lab of the Medical Department (Dr Pappaconstanti) and revealed that in all cases, lactate metabolism follows the previously established on other species pattern, since it rises during exercise and decreases during recovery. It was also shown that developmental temperature does not affect the original and final lactate concentration (at rest and at full exhaustion respectively) but does affect its decomposition rate since the 22 °C populations require considerably more time than the others in order to fully recover.

Based on the present results, it is clear that zebrafish is a highly sensitive fish species as far as the effect of its developmental temperature is concerned. This observed plasticity on the temperature changes is a requisite since it lives in ecosystems (ponds and streams) characterized by intense seasonal and/or daily temperature fluctuations. The successful adjustment of this species to such type of environmental changes is what finally ensures its survival.