

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ – ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΧΕΡΣΑΙΩΝ ΚΑΙ
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΠΟΡΩΝ»

Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης
με τίτλο:

**Επίδραση της θερμοκρασίας εκτροφής και του φύλου στην
κολυμβητική ικανότητα του zebrafish (*Danio rerio*)**



Ιωάννης Γ. Λέρης

Εξεταστική επιτροπή:

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια κ. **Μ. Κεντούρη**

Εξεταστής: Επίκουρος καθηγητής κ. **Μ Παυλίδης**

Ηράκλειο, 2008

Στην οικογένειά μου...



ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	σελ. 3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σελ. 4
1.1. Το είδος, <i>Danio rerio</i> (Hamilton 1822)	σελ. 4
<u>1.1.1. Ταξονομία και φυσική κατανομή του zebrafish</u>	σελ. 5
<u>1.1.2. Στοιχειά οικολογίας και βιολογίας του zebrafish</u>	σελ. 6
<u>1.1.3. Το zebrafish ως πειραματικό μοντέλο</u>	σελ. 8
1.2. Κολυμβητική ικανότητα	σελ. 9
<u>1.2.1. Τύποι κολύμβησης</u>	σελ. 10
<u>1.2.2. Τύποι μυών που συμμετέχουν στην κολύμβηση</u>	σελ. 11
<u>1.2.3. Κολυμβητική ικανότητα και μεταβολισμός</u>	σελ. 13
<u>1.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την κολυμβητική ικανότητα</u>	σελ. 14
<u>1.2.4.1. Αβιοτικοί παράγοντες</u>	σελ. 14
<u>1.2.4.2. Βιοτικοί παράγοντες</u>	σελ. 17
1.3. Ο ρόλος της θερμοκρασίας	σελ. 20
1.4. Η επίδραση του φύλου	σελ. 21
1.5. Σκοπός της μελέτης	σελ. 22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	σελ. 23
2.1. Ο πειραματικός σχεδιασμός	σελ. 23
2.2. Η εκτροφή του zebrafish	σελ. 25
<u>2.2.1. Η συλλογή των αβγών</u>	σελ. 25
<u>2.2.2. Η εκτροφή των νυμφών</u>	σελ. 27
2.3. Ο εγκλιματισμός	σελ. 28
2.4. Υπολογισμός της κολυμβητικής ικανότητας	σελ. 29
<u>2.4.1. Η συσκευή κολύμβησης</u>	σελ. 30
<u>2.4.2. Η άσκηση κολύμβησης</u>	σελ. 33
<u>2.4.3. Υπολογισμός της U_{crit}</u>	σελ. 34
2.5. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος στους μύες	σελ. 35
<u>2.5.1. Δειγματοληψία και συντήρηση</u>	σελ. 36
<u>2.5.2. Διαδικασία ομογενοποίησης</u>	σελ. 36
<u>2.5.3. Μέτρηση συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος</u>	σελ. 37



2.6. Στατιστική ανάλυση.....	σελ. 40
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	σελ. 41
3.1. Στοιχεία εκτροφής.....	σελ. 41
3.2. Κολυμβητική ικανότητα.....	σελ. 43
3.3. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στους μύες.....	σελ. 51
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σελ. 56
4.1. Κολυμβητική ικανότητα.....	σελ. 56
4.2. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στους μύες.....	σελ. 58
4.3. Επίδραση του φύλου στην κολυμβητική ικανότητα.....	σελ. 60
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	σελ. 65
6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	σελ. 66
7. ABSTRACT.....	σελ. 68
8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	σελ. 70



ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη και την ευθύνη της καθηγήτριας κυρίας Μ. Κεντούρη. Η ολοκλήρωση της εργασίας αυτής σημαίνει και το τέλος του μεταπτυχιακού κύκλου σπουδών μου στο Πανεπιστήμιο Κρήτης. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που συνέβαλαν άμεσα ή έμμεσα στην διεκπεραίωση της συγκεκριμένης εργασίας αλλά και όλους όσους γνώρισα και με βοήθησαν, με υποστήριξαν και πίστεψαν σε μένα όλο αυτόν τον καιρό της φοίτησής μου στο Ηράκλειο.

Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την υπεύθυνη για την εργασία μου καθηγήτρια κυρία Μ. Κεντούρη, η οποία ήταν πάντα δίπλα μου για συμβουλές και επιστημονική καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της απασχόλησής μου στο εργαστήριο, ενώ η κριτική της ήταν πάντοτε καλοπροαίρετη και ουσιαστική. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον δεύτερο εξεταστή μου στην παρούσα διατριβή, τον επίκουρο καθηγητή κύριο Μ. Παυλίδη, για την ουσιαστική συμβολή του στη στατιστική ανάλυση των δεδομένων αλλά και για τις πολύ κατατοπιστικές συμβουλές και παρατηρήσεις του κατά τη συγγραφή της εργασίας αυτής.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα πρέπει να πω στον υποψήφιο διδάκτορα κύριο Δ. Σφακιανάκη για την πολύτιμη βοήθειά του τόσο κατά τη διάρκεια των πειραμάτων όσο και κατά τη συγγραφή της παρούσας εργασίας και να του ευχηθώ επίσης καλή τύχη με την ολοκλήρωση της δικής του διατριβής. Θα ήθελα ακόμα να ευχαριστήσω θερμά τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου Υδατοκαλλιεργειών του Πανεπιστημίου Κρήτης για την όμορφη συνεργασία και το άψογο κλίμα που υπήρχε στο εργαστήριο.

Ένα ξεχωριστό ευχαριστώ πρέπει να πω στην δρ. Ε. Παπακωνσταντή από το εργαστήριο Βιοχημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης, για την παραχώρηση του εργαστηρίου της αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές και υποδείξεις της κατά την πραγματοποίηση των βιοχημικών αναλύσεων της μελέτης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου και την υπόλοιπη οικογένειά μου, για όσα μου έχουν προσφέρει μέχρι σήμερα και συνεχίζουν απλόχερα να μου προσφέρουν καθώς επίσης και τους φίλους μου και την κοπέλα μου, που με στηρίζουν όλο αυτόν τον καιρό. Όσους ξεχνάω αυτή τη στιγμή, τους ευχαριστώ για την κατανόηση και ελπίζω να μη με παρεξηγήσουν.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το είδος, *Danio rerio* (Hamilton 1822)

Το zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton 1822), είναι ένας από τα πιο σημαντικούς οργανισμούς-μοντέλα στη γενετική, αναπτυξιακή βιολογία, νευροφυσιολογία και βιοϊατρική (Amsterdam & Hopkins 2006). Περισσότερα από 400 εργαστήρια παγκοσμίως χρησιμοποιούν το zebrafish σε βασική και εφαρμοσμένη έρευνα και υπάρχει διαρκώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για τη χρήση του ως μοντέλο στην έρευνα της γενετικής βάσης της συμπεριφοράς (Gerlai, 2003), λόγω της εύκολης αναπαραγωγής, εκτροφής και συντήρησής του. Για τους λόγους αυτούς, το zebrafish (Εικόνα 1) αποτέλεσε το ιδανικό πειραματικό εργαλείο για την παρούσα μελέτη.



Αρσενικό



Θηλυκό

Εικόνα 1. Αρσενικό και θηλυκό zebrafish, από πληθυσμό του εργαστηρίου



1.1.1. Ταξονομία και φυσική κατανομή του zebrafish

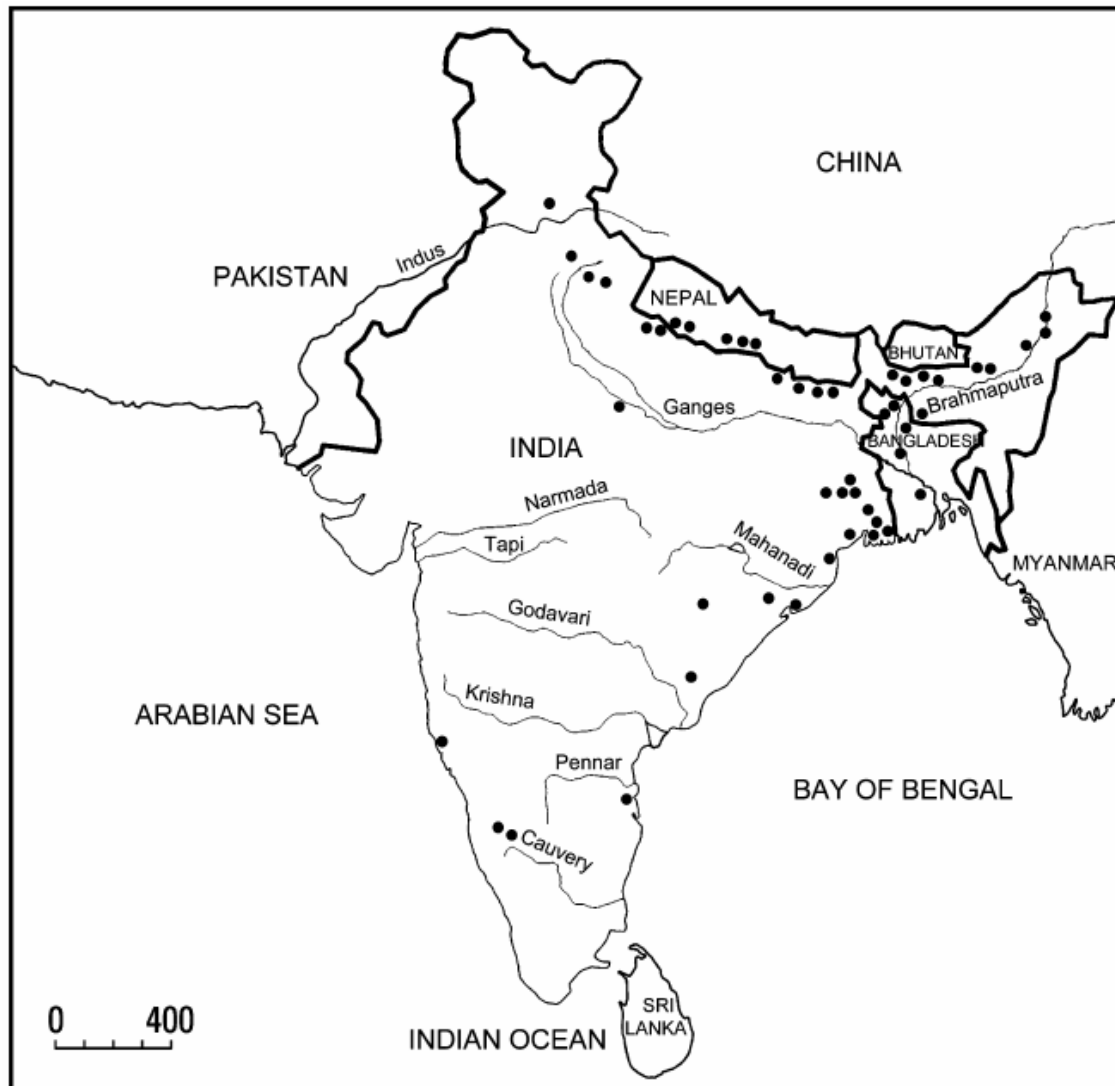
Πίνακας 1. Ταξινομική κατάταξη του zebrafish (Froese & Pauly, 2008; Integrated Taxonomic Information System, 2008).

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» (Talvar & 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)

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. 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.*, 2008). 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).

1.1.2. Στοιχεία μορφολογίας, οικολογίας και βιολογίας του zebrafish

Το zebrafish είναι γενικά μικρό σε μέγεθος: τα ενήλικα φτάνουν τα 30-40 mm σταθερό μήκος (standard length, SL), (Barman, 1991) ή 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 (Talvar & Jhingran, 1991) και τέσσερις (Maderspracher & Nüsslein-Volhard, 2003) ή πέντε (Talvar & Jhingran, 1991) ομοιόμορφα χρωματισμένες μπλε λωρίδες εκτείνονται από το κεφάλι μέχρι τις ακτίνες του ουραίου πτερυγίου σε κάθε πλευρά του σώματος (Maderspracher & Nüsslein-Volhard, 2003). Ανάλογες ρίγες εμφανίζονται και στο εδρικό πτερύγιο, ενώ η πλευρική γραμμή δεν είναι εμφανής. Το εδρικό πτερύγιο εμφανίζει 10-12 διακλαδιζόμενες μαλακές ακτίνες, τα πλευρικά 11-12 και τα κοιλιακά 6. Το στόμα είναι τοποθετημένο ραχιαία ενώ στην κοιλιακή πλευρά υπάρχει ένα ζευγάρι δερματικών αποφύσεων ή «μουστάκια» (barbells) (Talvar & 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 (Νεοφύτου, 2003) και κίτρινο χρώμα ανάμεσα στις ρίγες (Lambert, 1997; Νεοφύτου, 2003), ενώ τα θηλυκά είναι μεγαλύτερα νωτοκοιλιακά (Νεοφύτου 2003) και έχουν ασημί χρώμα ανάμεσα στις ρίγες (Lambert, 1997) (Εικόνα 1).

Είναι 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 να καταβροχθίζουν τα αβγά οι γονείς (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 ενδιαιτήματα 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 (Talvar & Jhingran, 1991; Pitchard *et al.*, 2001), ορυζώνες και γενικά σε υδάτινους όγκους με στάσιμο νερό ή νερό χαμηλής ροής (Talvar & 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 παρά σε ποτάμια (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, μπορεί να χρησιμοποιηθεί πολύ αποτελεσματικά για έλεγχο των κουνουπιών (Shrestha, 1990).

Τέλος, το zebrafish είναι ένα πολύ δημοφιλές είδος στους ενυδρείοφιλους (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 στο σπίτι.

1.1.3. 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 είναι από τα λίγα σπονδυλωτά που μπορεί να κλωνοποιηθεί σχετικά εύκολα και έχει 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:

- Γρήγορη ανάπτυξη (χρόνος από το αυγό μέχρι την εκκόλαση, 2-3 μέρες)
- 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).

1.2. 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 δυσχερών 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 του σταδίων (π.χ. Budick &



O'Malley, 2000; Levin *et al.*, 2004) ενώ υπάρχουν πολύ λίγες δημοσιευμένες εργασίες που αναφέρονται στην κολυμβητική ικανότητα στο στάδιο του ενηλίκου. Η πρώτη, από τους Plaut & Gordon (1994), εξετάζει το μεταβολισμό της κολύμβησης σε κλωνοποιημένα άτομα και ψάρια αγρίου τύπου. Μερικά χρόνια αργότερα, ο ίδιος ερευνητής (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.

1.2.1. 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

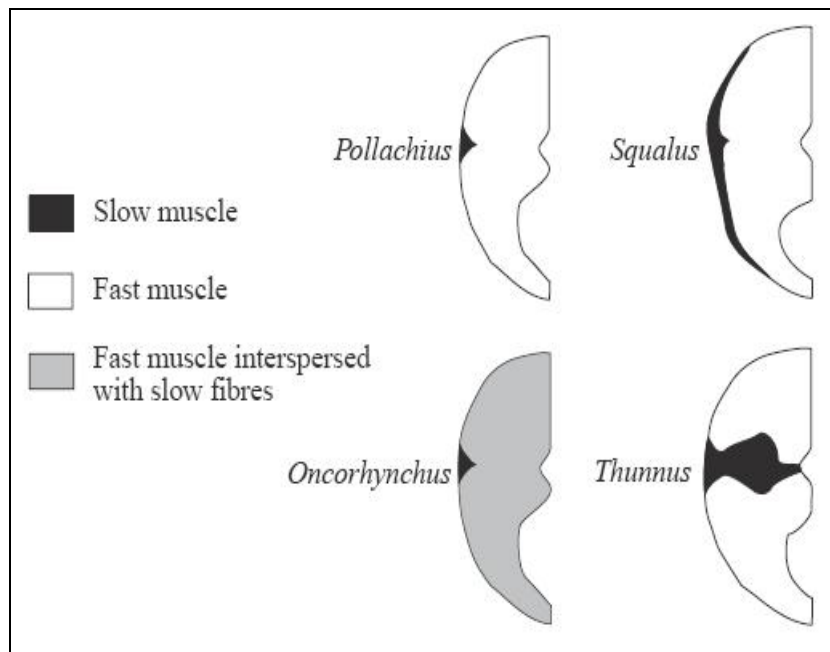


ψάρι για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα (Beamish, 1978) και η οποία αποτελεί την πιο εύκολη μέθοδο εκτίμησης της κολυμβητικής ικανότητας (Plaut, 2001). Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ως δείκτης της κολυμβητικής επίδοσης ατόμων zebrafish διαφορετικού φύλου.

1.2.2. Τύποι μυών που συμμετέχουν στην κολύμβηση

Περίπου το 40-60% της ολικής μάζας του σώματος, είναι στα περισσότερα ψάρια 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 υπεύθυνων 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 3).



Εικόνα 3. Διαγραμματικές διατομές που απεικονίζουν την κατανομή των («γρήγορων») λευκών και («αργών») κόκκινων μυών (Altringham and Ellerby, 1999).

Για σταθερής ταχύτητας κολυμβήσεις, 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 τέτοιες κολυμβήσεις υψηλών ταχυτήτων, έχουν υψηλότερο ποσοστό κόκκινων μυών στο σώμα τους. Όμως υποστηρίζεται ότι και οι ροζ μύες λαμβάνουν μέρος στις κολυμβήσεις σταθερής ταχύτητας, εξαιτίας των «ενδιάμεσων» χαρακτηριστικών τους, δηλαδή τον υψηλότερο ρυθμό χαλάρωσης και τη μέγιστη ταχύτητα συστολής (Martinez *et al.*, 2002).

Στις παρατεταμένες κολυμβήσεις, πιστεύεται ότι χρησιμοποιούνται και οι δύο τύποι μυών, παρά το γεγονός ότι οι άσπροι μύες χρησιμοποιούνται κατά κανόνα σε κολυμβήσεις εκτίναξης και ότι σε πειράματα με τον σολομό (*Oncorhynchus nerka*), σε ταχύτητα μεγαλύτερη από το 80% της U_{crit} , δε μετρήθηκε ηλεκτρική δραστηριότητα στους κόκκινους μύες (Webb, 1971). Στις μικρές ταχύτητες, χρησιμοποιούνται μόνο οι κόκκινοι μύες. Όσο η ταχύτητα κολύμβησης αυξάνεται, αυξάνεται 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 (Martinez *et al.*, 2002; Hammer, 1995) που βασίζονται σε αναερόβιες πηγές ενέργειας (Hammer, 1995)

1.2.3. Κολυμβητική ικανότητα και μεταβολισμός

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 στις παρατεταμένες κολυμβήσεις, προέρχεται και 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 διοξείδιο 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).

1.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την κολυμβητική ικανότητα

1.2.4.1. Αβιοτικοί παράγοντες

Οι σημαντικότεροι αβιοτικοί (ή 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). Η επίδραση της θερμοκρασίας στην κολυμβητική ικανότητα περιγράφεται εκτενώς στην ενότητα 1.3.

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 κολυμπήσουν 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 περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου και παρατεταμένων κολυμβήσεων, 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 ανεπαρκείς για διατήρηση υψηλών αερόβιων κολυμβητικών ταχυτήτων στον κιτρινόπτερο τόνο.

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 *Oncorhynchus kistuch* αλλά όχι και στο *Micropterus salmoides*. 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). Η αμμωνία αποτελεί έναν πολύ επιβλαβή ρυπαντή για τους υδρόβιους οργανισμούς και είναι ιδιαίτερα τοξική για τα ψάρια. Τα επίπεδα της αμμωνίας στο νερό μπορούν να αυξηθούν εξαιτίας γεωργικών αποβλήτων ή αποσύνθεσης άχρηστων οργανικών υλικών (Randall & Tsui, 2002; Wicks *et al.*, 2002). Η κολυμβητική ικανότητα των ψαριών, έχει παρατηρηθεί ότι σημειώνει πτώση σε αυξημένα επίπεδα αμμωνίας στο νερό. Όταν τα ψάρια ασκούνται, τα επίπεδα αμμωνίας στο αίμα αυξάνονται και ταυτόχρονα τα ψάρια γίνονται πιο ευάλωτα σε οξεία τοξικότητα (acute toxicity) από την αμμωνία του περιβάλλοντος.



Υποστηρίζεται επίσης, ότι υψηλά επίπεδα ασβεστίου στο νερό, συμβάλλουν στην οξεία τοξικότητα από αμμωνία (Wicks *et al.*, 2002). Τα ψάρια διαθέτουν μηχανισμούς προστασίας από την αμμωνία του οργανισμού τους, η οποία ανεβαίνει σε υπερβολικά επίπεδα μετά από την κατανάλωση τροφής. Έτσι, φαίνεται ότι τα άτομα που είναι προσφάτως ταϊσμένα, είναι πολύ πιο προστατευμένα από την αμμωνία του περιβάλλοντος, απ' ότι τα νηστικά (Randall & Tsui, 2002). Ρυπαντές που προκύπτουν από ορυχεία και λατομεία, επίσης επηρεάζουν την κολυμβητική δραστηριότητα των ψαριών. Ο χαλκός σε συνδυασμό με το pH, σε συγκεκριμένη σκληρότητα νερού, είχε αρνητική επίδραση στην κρίσιμη κολυμβητική ταχύτητα της ιριδίζουσας πέστροφας (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*) (Beamish, 1978). Οι Beaumont *et al.* (2000), μελέτησαν την επίδραση της υψηλής συγκέντρωσης χαλκού σε συνδυασμό με χαμηλό pH, στο μυϊκό μεταβολισμό σε καφέ πέστροφες (*Salmo trutta*) και διαπίστωσαν ότι υπήρξε μείωση της κολυμβητικής ικανότητας, η οποία δεν οφειλόταν σε μειωμένη παροχή οξυγόνου (όπως είχε διατυπωθεί παλαιότερα), αλλά σε μεταβολικές αλλαγές ή/και ηλεκτροφυσιολογικές διαταραχές, που είναι αποτέλεσμα γενικής καταπόνησης που αυξάνει με την αύξηση της συγκέντρωσης της αμμωνίας (υπεραμμωναιμία – hyperammonaemia). Άλλοι ρυπαντές που επιδρούν σημαντικά στην κολυμβητική ικανότητα είναι: οι ίνες από πολτοποιημένο ξύλο κωνοφόρων (conifer pulpwood fiber) που επιβαρύνουν τη λήψη οξυγόνου από το νερό κολλώντας στα βράγχια των ψαριών και διακόπτοντας την αναπνευστική ροή, το υδρόθειο που σε μικρές συγκεντρώσεις επηρέασε θετικά την κολυμβητική ικανότητα των bluegills, όμως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκάλεσε ερεθισμό των βραγχίων και μείωση της αντοχής στην κολύμβηση, το PCP (sodium pentachlorophenate) που αν και θεωρείται δηλητήριο για το μεταβολισμό, δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά την κολυμβητική ικανότητα στο *Cichlasoma bimaculatum*, παρά μόνο όταν ήταν σε θνησιγόνα επίπεδα, το fenitrothion (οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο) που μειώνει την κολυμβητική ικανότητα εξαιτίας της επίδρασής του στο νευρικό σύστημα του ψαριού και τέλος το BKME (bleached kraft mill effluent) (Beamish, 1978), το οποίο δυσχεραίνει την ανταλλαγή αερίων εξαιτίας της απορρόφησής του από την επιφάνεια των βραγχίων ή εξαιτίας της δημιουργίας ενός αδύναμου δεσμού με το επιθήλιο των βραγχίων (Howard, 1975).



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

Οι συνθήκες **φωτός** παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην κολύμβηση των ψαριών (Hammer, 1995; Young, 2004), καθώς ο ρεοτροπισμός 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). Η Young (2004), διαπίστωσε επίδραση της φωτοπεριόδου και της εναλλαγής ημέρας-νύχτας, στη U_{crit} του delta smelt (*Hypomesus transpacificus*) και του wakasagi (*Hypomesus nipponensis*).

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 *Salvelinus namaycush* 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 (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.

1.2.4.2. Βιοτικοί παράγοντες

Οι σημαντικότεροι βιοτικοί (ή βιολογικοί) παράγοντες που επηρεάζουν την κολυμβητική ικανότητα των ψαριών, είναι το **μέγεθος** (μήκος και βάρος), το **φύλο** και οι διάφορες **ασθένειες** (Beamish, 1978). Η επίδραση του **φύλου** στην κολυμβητική ικανότητα, περιγράφεται εκτενώς στην ενότητα 1.4.



Το **μήκος** είναι ο πιο σημαντικός βιολογικός παράγοντας που επιδρά στην κολυμβητική ικανότητα των ψαριών (Beamish, 1978). Οι Brett & Glass (1973), μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με το μήκος, στους ενεργούς μεταβολικούς ρυθμούς του *Oncorhynchus nerka* 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 αυξάνουν σαν (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 η «φυσική κατάσταση» (condition) του ψαριού που εκφράζει το βάρος του ψαριού σε σχέση με το μήκος του και περιγράφεται συνήθως από έναν παράγοντα (conditional factor), που προκύπτει ως εξής:



$$M / l^3 \text{ ή } 10 M^{1/3} / l$$

Όπου M το βάρος και l το μήκος (Beamish, 1978).

Τα τελευταία χρόνια, έχει μελετηθεί η επίδραση του μεγέθους και του σχήματος των πτερυγίων στην κολυμβητική ικανότητα των ψαριών. Ο Plaut (2000) κάνοντας πειράματα με zebrafish αγρίου τύπου, με μακριά πτερύγια και χωρίς ουραίο πτερύγιο, απέδειξε ότι τα αγρίου τύπου ψάρια 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 επανάκαμψης (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 πέστροφες με τον τρηματώδη *Bolbrophorus confuses*, εμφάνισαν μειωμένες παρατεταμένες ταχύτητες (κατά 35%) σε σύγκριση με τα μη μολυσμένα ψάρια ελέγχου (control). 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 κατά μέσο όρο κατά 20%).



1.3. Ο ρόλος της θερμοκρασίας

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους αβιοτικούς παράγοντες που επηρεάζουν δραστικά την εκκόλαψη (Herzig & Winkler, 1986), την ανάπτυξη (Fukuhara, 1990, Gibson & Johnston 1995, Herzig & Winkler, 1986, Lein *et al.*, 1997, Polo *et al.*, 1991), την αύξηση, το μεταβολισμό (Herzig & Winkler, 1986), την απορρόφηση της λεκίθου (Fukuhara, 1990), την ανάπτυξη των μυών (Wilkes *et al.*, 2001), την οντογένεση ιστών και οργάνων (Fukuhara, 1990, Gibson & Johnston, 1995), τη μορφολογία (Lindsay, 1988; Wimberger, 1992; Tudela, 1999; Pakkasmaa & Piironen, 2001; Koumoundouros *et al.*, 2001b; Cabral *et al.*, 2003; Silva, 2003; Turan, 2004), τους μεριστικούς χαρακτήρες (Turan, 2004; Λάγκη, 2005), την εμφάνιση μορφοανατομικών παραμορφώσεων (Polo *et al.*, 1991; Koumoundouros *et al.*, 2001a), την κολυμβητική ικανότητα (Koumoundouros *et al.*, 2002a), τον καθορισμό του φύλου (Pavlidis *et al.*, 2000; Koumoundouros *et al.*, 2002b) και συνολικά την επιβίωση (Fukuhara, 1990, Lein *et al.*, 1997) και τη διάρκεια ζωής των ψαριών (Malek *et al.*, 2004).

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; Ojanguren & Brana, 2000; Dickson *et al.*, 2002; Koumoundouros *et al.*, 2002a; Wilson *et al.*, 2002; Franklin *et al.*, 2003). 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, 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



(«sustainable») 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), χαρακτηριστικά αναφέρει 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 και οι Ojanguren & Brana (2000) οι οποίοι σχεδίασαν την καμπύλη του χρόνου αντοχής της νεαρής καφέ πέστροφας στην κολύμβηση, σε σχέση με τη θερμοκρασία, η οποία εμφάνισε ίδιο πρότυπο με τις καμπύλες που δείχνουν τη σχέση μεταξύ κολυμβητικής ταχύτητας και θερμοκρασίας.

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 αλλαγές που προκαλεί η αλλαγή της θερμοκρασίας στο ιξώδες του νερού, είναι πιο σημαντικές απ' ότι 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 αλλαγές στη φυσιολογία των μυών, κάτι που έχει πολύ μεγαλύτερη επίδραση στην κολυμβητική ικανότητα απ' ότι οι θερμοεπαγόμενες αλλαγές στο ιξώδες (Wieser & Kauffman, 1998).

Παρόλα αυτά, δεν υπάρχουν δημοσιευμένες εργασίες που να μελετούν την επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην κολυμβητική ικανότητα των ατόμων σε μεταγενέστερα στάδια σε ίδια ή διαφορετικά θερμοκρασιακά περιβάλλοντα.

1.4. Η επίδραση του φύλου

Πολύ λίγα είναι γνωστά για την επίδραση του φύλου (ή του σταδίου ωριμότητας) στην κολυμβητική ικανότητα. Από τις πρώτες βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την διαφορετική κολυμβητική ικανότητα αρσενικών και θηλυκών ατόμων



του ίδιου είδους, ήταν η εργασία του Brett (1965), ο οποίος συνέκρινε αρσενικούς και θηλυκούς σολομούς (sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*) και παρατήρησε υψηλότερες επιδόσεις στην περίπτωση των μικρόσωμων αρσενικών. Υπάρχουν 3 ακόμα αναφορές σε διαφορετικές κολυμβητικές επιδόσεις αρσενικών και θηλυκών χωρίς όμως αυτό να αποτελεί το κυρίως θέμα τους: Το 1987, οι Williams & Brett, συνέκριναν τις κρίσιμες ταχύτητες ενήλικων αρσενικών και θηλυκών ροζ σολομών (*Oncorhynchus robustus*) σε διαφορετικά στάδια ωριμότητας και συμπέραναν ότι τα άτομα που είχαν αβγά είχαν καλύτερες επιδόσεις από τα άτομα που αναπαράγονταν ή που μόλις είχαν τελειώσει την αναπαραγωγή. Αργότερα, οι Adams & Parsons (1998), μετά από εργαστηριακές μετρήσεις σε αρσενικά και θηλυκά *Ictiobus bubalus*, παρατήρησαν αυξημένη κολυμβητική ικανότητα κατά την ανοιξη (η οποία αποτελεί και την αναπαραγωγική περίοδο του είδους) και πιο αποτελεσματική μεταβολική απόδοση κατά την κολύμβηση στα θηλυκά άτομα. Τέλος, οι Reidy *et al.* (2000), μελετώντας την αερόβια και αναερόβια κολυμβητική ικανότητα του γάδου (*Gadus morhua*), ανέφεραν ότι οι θηλυκοί γάδοι εμφάνισαν χαμηλότερες ταχύτητες εκτίναξης (U_{burst}) απ' ότι οι αρσενικοί.

Τα τελευταία χρόνια, μόνο δύο δημοσιευμένες μελέτες υπάρχουν που αναφέρονται έμμεσα στην επίδραση του φύλου (ουσιαστικά εξετάζουν την επίδραση της ωτοκίας και της κυοφορίας). Στην πρώτη, οι James & Johnston (1998), έδειξαν ότι θηλυκά άτομα του *Myoxocephalus scorpius* είχαν μειωμένη κολυμβητική ικανότητα και μέγιστη ταχύτητα λόγω της εγκυμοσύνης. Σε παρόμοια συμπεράσματα καταλήγει και ο Plaut (2002), ο οποίος σύγκρινε την κολυμβητική ικανότητα θηλυκών κουνουπόψαρων (*Gambusia affinis*) πριν και μετά την περίοδο κυοφορίας.

1.5. Σκοπός της μελέτης

Πρωταρχικός σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εκτιμηθεί η κολυμβητική ικανότητα αρσενικών και θηλυκών ατόμων zebrafish, ώστε να προσδιοριστεί αν υπάρχει επίδραση του φύλου σε αυτή. Ταυτόχρονα, επειδή το zebrafish ζει σε περιοχές με μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος (Spence *et al.*, 2008) και είναι ένα από τα πιο ευρύθερμα είδη (Lawrence, 2007), με την εφαρμογή διαφορετικών θερμοκρασιακών καθεστώτων κατά την εκτροφή, μελετήθηκε η



μεταβολή της επίδρασης του φύλου σε σχέση με τη μεταβολή της θερμοκρασίας ανάπτυξης.

Ο προσδιορισμός της κολυμβητικής ικανότητας έγινε αρχικά με τον υπολογισμό της U_{crit} των ψαριών και επειδή η κολυμβητική επίδοση επηρεάζεται άμεσα από το φυσιολογικό κόστος της δραστηριότητας και την αντοχή σε παραπροϊόντα του μεταβολισμού (Widmer *et al.*, 2006), η εργασία πλαισιώθηκε από τη μέτρηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες.



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Ο πειραματικός σχεδιασμός

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων περιελάμβανε αρχικά την εκτροφή οκτώ πληθυσμών zebrafish (σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης και σε δύο επαναλήψεις, Α και Β). Στη συνέχεια προγραμματίστηκαν πειράματα για την μελέτη της κολυμβητικής ικανότητας αρσενικών και θηλυκών ατόμων από κάθε θερμοκρασία εκτροφής (ασκήσεις κολύμβησης κατά Brett, 1964) και πειράματα για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος στους μύες αρσενικών και θηλυκών, σε κατάσταση ηρεμίας και μετά από εξουθένωση. Η εξουθένωση επρόκειτο να επιτευχθεί με άσκηση κολύμβησης όμοια με αυτή για τον προσδιορισμό της κολυμβητικής ικανότητας.

Για τον υπολογισμό της κολυμβητικής ικανότητας χρησιμοποιήθηκαν έξι αρσενικά και έξι θηλυκά άτομα από κάθε επανάληψη, για κάθε θερμοκρασία (σύνολο 96 άτομα). Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες έγινε ενοποίηση των δύο επαναλήψεων. Έτσι για τη μέτρηση του γαλακτικού οξέος σε κατάσταση ηρεμίας, χρησιμοποιήθηκαν πέντε αρσενικά και πέντε θηλυκά άτομα από κάθε θερμοκρασία, ενώ ίδιος αριθμός ατόμων χρησιμοποιήθηκε αντίστοιχα για τη μέτρηση του γαλακτικού οξέος μετά από εξουθένωση (σύνολο 80 άτομα). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται αναλυτικά τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 2. Αριθμός ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα. T, θερμοκρασία; S, φύλο; D, επανάληψη.

T	S	D	Κολυμβητική ικανότητα	Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος	
				Σε ηρεμία	Μετά από εξουθένωση
22	♂	A	6	5	5
		B	6		
	♀	A	6	5	5
		B	6		
25	♂	A	6	5	5
		B	6		
	♀	A	6	5	5
		B	6		
28	♂	A	6	5	5
		B	6		
	♀	A	6	5	5
		B	6		
31	♂	A	6	5	5
		B	6		
	♀	A	6	5	5
		B	6		
Σύνολο			96	40	40
				80	

2.2. Η εκτροφή του zebrafish

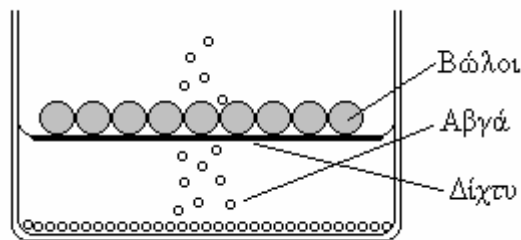
Η διαδικασία εκτροφής για τους σκοπούς της παρούσας εργασίας, πραγματοποιήθηκε εξολοκλήρου στο Εργαστήριο Υδατοκαλλιεργειών του Πανεπιστημίου Κρήτης.

2.2.1. Η συλλογή των αβγών

Χρησιμοποιήθηκαν αβγά από πληθυσμό γεννητόρων (αγρίου τύπου) του εργαστηρίου οι οποίοι διατηρούνταν σε ενυδρείο χωρητικότητας 35 λίτρων με εξωτερικό σύστημα φιλτραρίσματος του νερού (φίλτρο 2217, EHEIM, Germany). Καθ' όλη την περίοδο της αναπαραγωγής, η φωτοπερίοδος διατηρήθηκε στις 14 ώρες φως και 10 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.

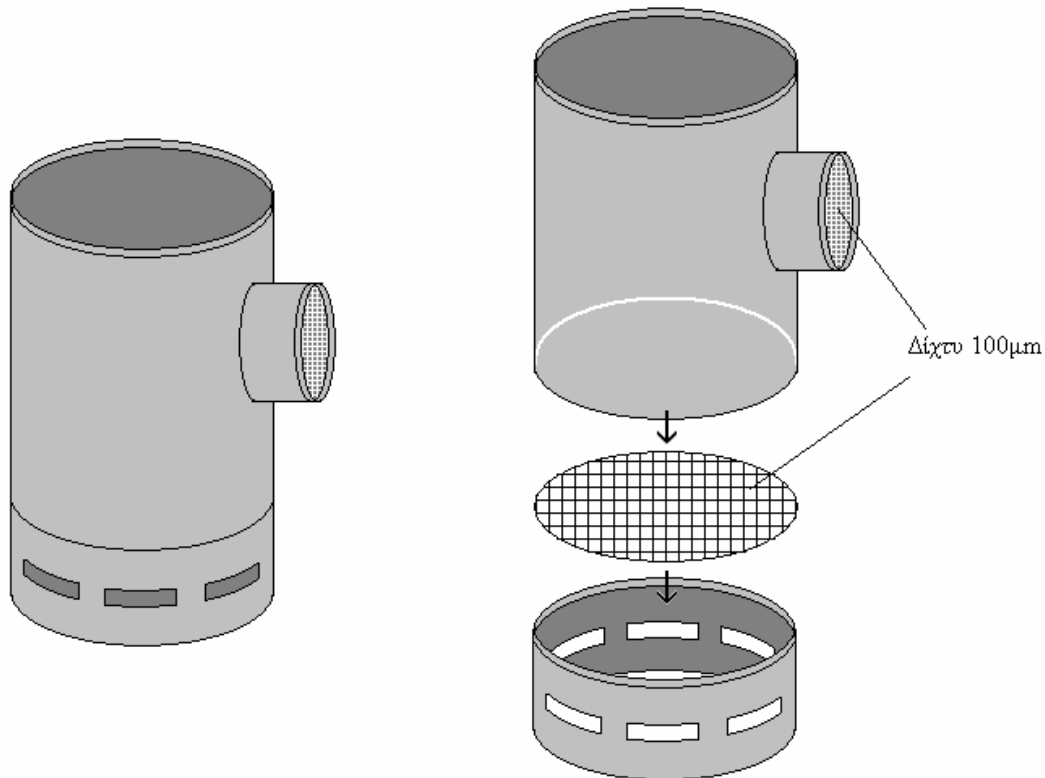
Μετά τη χορήγηση των ναυπλίων, ειδικές συσκευές συλλογής αβγών ή «γεννήστρες» (Εικόνα 4), τοποθετούνταν στον πυθμένα των ενυδρείων. Κάθε «γεννήστρα» αποτελούνταν από ένα πλαστικό δοχείο χωρισμένο στα δύο (πάνω και



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

κάτω) με τη βοήθεια δίχτυου, 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, H₂O₂), 0,001 g l⁻¹, για την καταπολέμηση των μυκήτων και τοποθετούνταν ανά 300 σε ειδικές κυλινδρικές κατασκευές εκκόλαψης (Εικόνα 5) εφοδιασμένες με δίχτυ (100 μm) 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.

2.2.2. Η εκτροφή των νυμφών

Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα ενυδρεία χωρητικότητας 130 λίτρων σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες (22, 25, 28, 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. 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 αερισμό (σωλήνας και πορόλιθος) για την οξυγόνωση του νερού, ενώ γίνονταν τακτικά αλλαγές νερού (περίπου 2 φορές την εβδομάδα) για τη διατήρηση βέλτιστων συνθηκών. Για την αποφυγή εναλλαγών στη θερμοκρασία μεταξύ μέρας 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 3 ή 4 ημέρες. Η μέτρηση της θερμοκρασίας γινόταν με θερμομόετρο 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 τους καταναλώσουν (33 ημέρες μετά την εκκόλαψη, dph κατά μέσο όρο), άρχισε 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 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 και βιομηχανικής τροφής. Οι ημέρες που πραγματοποιήθηκαν τα πρώτα ταΐσματα κάθε τύπου τροφής για κάθε πληθυσμό, δίνονται στον Πίνακα 3.

2.3. Ο εγκλιματισμός

Επειδή τα πειράματα για τον υπολογισμό της κολυμβητικής ικανότητας των ψαριών και τον προσδιορισμό του γαλακτικού οξέος στους μύες επρόκειτο να πραγματοποιηθούν σε μία συγκεκριμένη θερμοκρασία κοινή για όλα τα άτομα, όλοι οι πειραματικοί πληθυσμοί έπρεπε να εγκλιματιστούν στη νέα θερμοκρασία.

Η θερμοκρασία που επιλέχθηκε για τον εγκλιματισμό και την διεξαγωγή των πειραμάτων κολύμβησης και γαλακτικού οξέος 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 ισαπέχει 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 3), 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. Η αύξηση του σωματικού βάρους και του TL κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού που παρατηρήθηκε, υποδηλώνει ότι τα ψάρια προσαρμόστηκαν πλήρως στις νέες συνθήκες και εγκλιματίστηκαν ομαλά (αναλυτικά δεδομένα υπάρχουν στην ενότητα των Αποτελεσμάτων).

Πριν από τις ασκήσεις κολύμβησης για τον υπολογισμό της κολυμβητικής ικανότητας και για τη μέτρηση του γαλακτικού οξέος στους μύες μετά από εξουθένωση, τα θηλυκά άτομα απομονώνονταν από τον υπόλοιπο πληθυσμό για τρεις μέρες, σε ειδικές κυλινδρικές δεξαμενές, για την αποφυγή ωοτοκίας. Επίσης όλα τα άτομα (αρσενικά και θηλυκά) που συμμετείχαν σε ασκήσεις κολύμβησης, έμεναν νηστικά μία ημέρα πριν την άσκηση.

Πίνακας 3. F.F., πρώτο τάισμα *Paramecium* sp., *Artemia* sp., flakes. Έναρξη και λήξη εγκλιματισμού, σε ημέρες μετά την εκκόλαψη (dph).

	F.F. <i>Paramecium</i>	F.F. <i>Artemia</i>	F.F. Flakes	Έναρξη εγκλιματισμού	Λήξη εγκλιματισμού
22°C	2	33	74	101	144
25°C	2	34	73	99	149
28°C	2	35	74	100	148
31°C	2	30	71	97	143
Μέσος Όρος	2	33	73	~ 99	146

2.4. Υπολογισμός κολυμβητικής ικανότητας

Το πρώτο μέρος της μελέτης, αφορούσε στον υπολογισμό της κολυμβητικής ικανότητας αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Προς τούτο επιλέχθηκε η μέθοδος που εισήγαγε ο Brett (1964), με τον υπολογισμό δηλαδή 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 τοποθετούνται σε κάποιο αγωγό κολύμβησης και αναγκάζονται να κολυμπήσουν αντίθετα από το ρεύμα το οποίο αυξάνεται με σταθερό βήμα σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Μετά από αρκετά διαστήματα, το ψάρι κουράζεται και παρασύρεται τελικά από το ρεύμα. Σε αυτό το σημείο, η μέτρηση τελειώνει και μπορεί να υπολογιστεί πλέον η U_{crit} .

2.4.1. Η συσκευή κολύμβησης

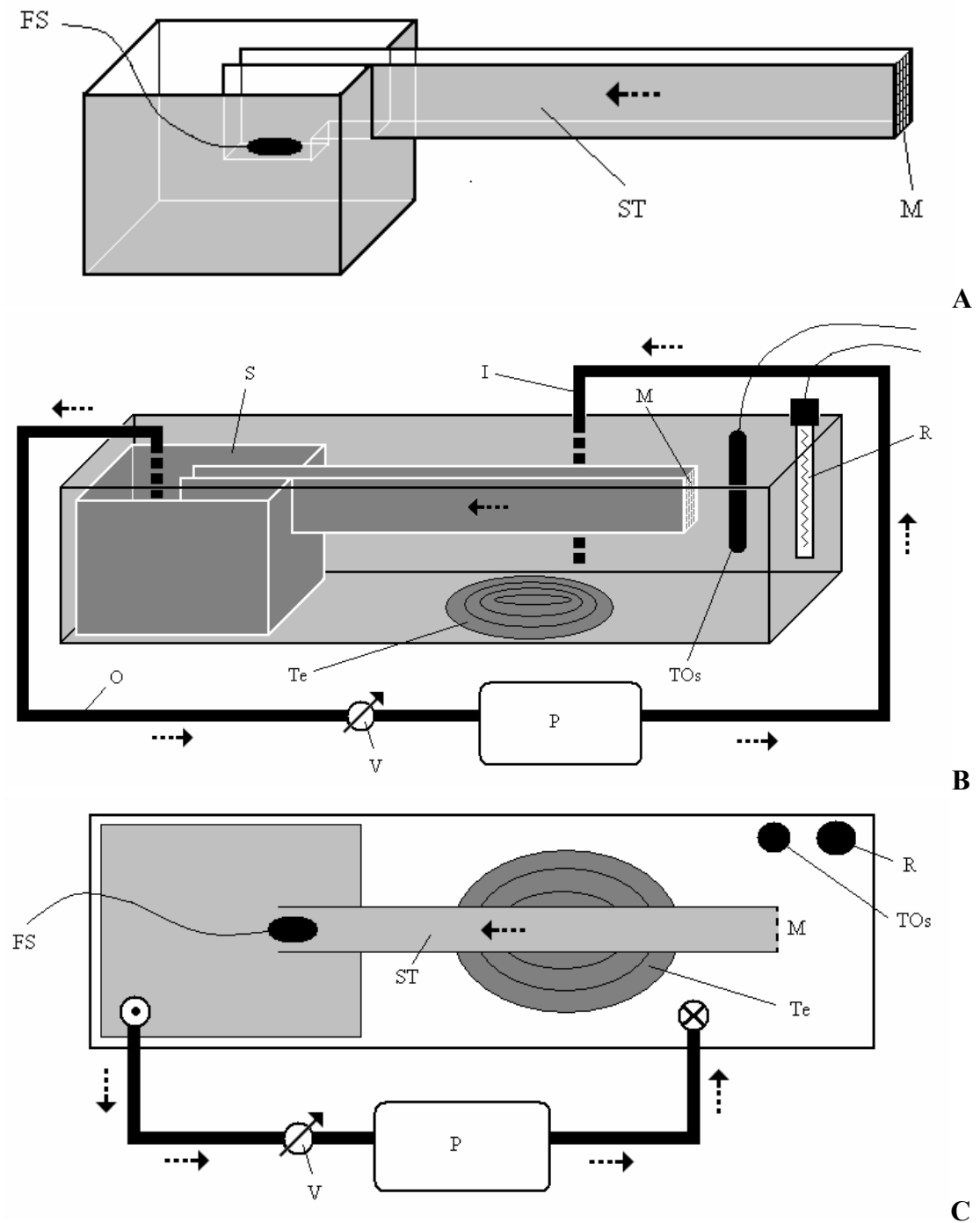
Όλα τα πειράματα μέτρησης της κολυμβητικής ικανότητας έγιναν σε μία ειδικά σχεδιασμένη συσκευή από τους Koumoundouros et al. (2002a) (Εικόνα 6), η οποία διαθέτει τρία συγκριτικά πλεονεκτήματα έναντι των αντίστοιχων συσκευών που έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν: α) είναι κατάλληλη για μετρήσεις σε μικρού 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 6A) 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 6B και 6C) 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.

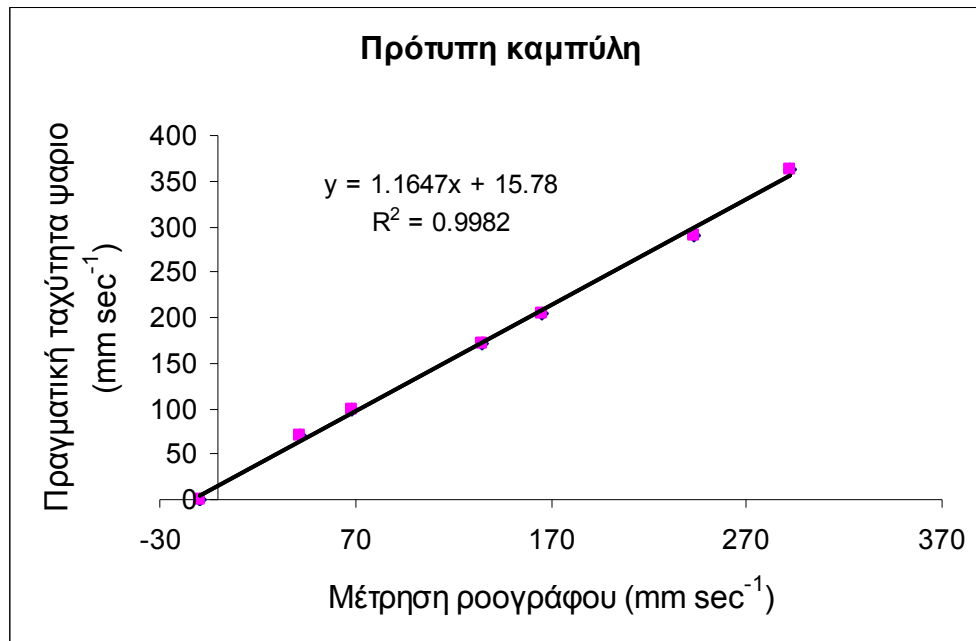
Η επιθυμητή κάθε φορά ένταση ρεύματος επιτυγχάνεται με την βοήθεια ρυθμιζόμενης βαλβίδας στην αντλία (V). Η ταχύτητα του ρεύματος στο θάλαμο κολύμβησης υπολογίζεται με τη χρήση ηλεκτρονικού ροογράφου (Valeport, Model 801, UK) κατάλληλα προσαρμοσμένου μέσα στο κανάλι κολύμβησης. Για πιο ακριβή μέτρηση της πραγματικής ταχύτητας του ψαριού μέσα στο θάλαμο κολύμβησης, κατασκευάζονταν καθημερινά μία «πρότυπη καμπύλη» με αντιστοίχιση μετρήσεων του ροογράφου 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 (Γράφημα 1) με τη βοήθεια του Microsoft Excel (2003).



Εικόνα 6. Η συσκευή κολύμβησης (κατά Koumoundouros *et al.*, 2002a). A, τρισδιάστατη άποψη της συσκευής κολύμβησης; B, τρισδιάστατη άποψη της συσκευής μέσα στο ενυδρείο κολύμβησης; C, κάτοψη της συσκευής και του ενυδρείου κολύμβησης. FS, αισθητήρας ροογράφου; 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.



Γράφημα 1. Πρότυπη καμπύλη για την αντιστοίχιση της ένδειξης του ροογράφου 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 μηχανήμα 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.

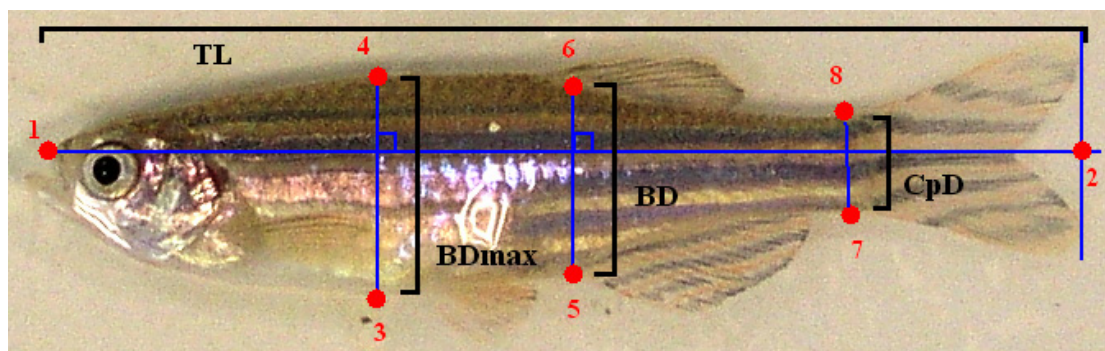
2.4.2. Η άσκηση κολύμβησης

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 φωτογραφική μηχανή (Olympus, Camedia C3030 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 7), με τη χρήση κατάλληλου προγράμματος ανάλυσης εικόνας (tpsDig, version 2.04, James Rohlf) και του Microsoft Excel (2003).



Εικόνα 7. Τα landmarks (1-8) που τοποθετήθηκαν σε κάθε φωτογραφία και οι μορφομετρικοί χαρακτήρες που μετρήθηκαν (TL, BDmax, BD, CpD).

2.4.3. Υπολογισμός της U_{crit}

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

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

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 και όπως είναι γνωστό από τη βιβλιογραφία η κολυμβητική επίδοση επηρεάζεται σημαντικά από αυτό (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 σωστότερων αποτελεσμάτων, γινόταν αρχικά εμπειρική εκτίμηση του μήκους (οπτικά) πριν από την έναρξη της άσκησης 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} γίνονταν ο υπολογισμός της «σχετικής κρίσιμης ταχύτητας» (relative critical velocity, RU_{crit}) η οποία επειδή είναι εκφρασμένη σε TL sec⁻¹ επιτρέπει τη σύγκριση ατόμων με διαφορετικά μήκη σώματος. Δηλαδή:

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

2.5. Προσδιορισμός συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος στους μύες

Το δεύτερο μέρος της μελέτης περιελάμβανε τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος στους μύες αρσενικών και θηλυκών ατόμων από τους τέσσερις πληθυσμούς εκτροφής σε δύο φάσεις; 1) σε κατάσταση ηρεμίας (control) και 2) μετά από εξουθένωση (fatigue).



2.5.1. Δειγματοληψία και συντήρηση

Στην περίπτωση των ατόμων που αποτελούσαν τα control, τα ψάρια συλλέγονταν ατομικά με τη χρήση απόχης από το ενυδρείο εκτροφής, θανατώνονταν άμεσα με αποκεφαλισμό, καταψύχονταν σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια συντηρούνταν στους -80°C , θερμοκρασία στην οποία δεν αποικοδομείται το γαλακτικό οξύ.

Στην περίπτωση των ατόμων που προορίζονταν για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος μετά από εξουθένωση (fatigue), τα ψάρια υποβάλλονταν σε άσκηση κολύμβησης όμοια με αυτή που περιγράφηκε στην ενότητα 2.4.2., μέχρι δηλαδή να εξουθενωθούν και να μην μπορούν να διατηρήσουν τη θέση τους αντίθετα στο ρεύμα. Έπειτα, ακολουθήθηκε η προηγούμενη διαδικασία δειγματοληψίας και συντήρησης.

Πρέπει να σημειωθεί ότι δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στο να αποφευχθούν επιπρόσθετοι χειρισμοί που ενδεχομένως να προκαλούσαν στρες στα ψάρια, καθώς το αυξημένο στρες οδηγεί σε αύξηση των επιπέδων γαλακτικού οξέος (Grutter & Pankhurst, 2000; Fanouraki *et al.*, 2007; Wilkinson *et al.*, 2008). Επίσης όλη η διαδικασία δειγματοληψίας, συντήρησης και μέτρησης του γαλακτικού οξέος, πραγματοποιήθηκε με συνεχή χρήση γαντιών. Τα δείγματα που εμφάνισαν εξαιρετικά μεγάλες τιμές γαλακτικού οξέος (πολλαπλάσιες των υπόλοιπων δειγμάτων) εξαιτίας κάποιας επιμόλυνσης, εξαιρέθηκαν από τη μελέτη.

2.5.2. Διαδικασία ομογενοποίησης

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέως χρησιμοποιήθηκε ολοκληρωμένο σύστημα μέτρησής του (κιτ LactPap, 61 192, bioMérieux, France). Επειδή όμως το κιτ 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 κιτ. Έτσι εφαρμόστηκε η διαδικασία ομογενοποίησης που προτείνεται από τους Barnett & Pankhurst (1998).

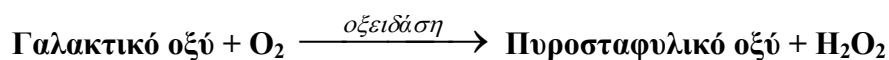
Τα δείγματα αποψύχθηκαν και αφαιρέθηκαν τα περιττά μέρη (σπλαχνική μάζα, πτερύγια κλπ). Έπειτα, επιλέχθηκαν περίπου 150 mg ιστού από το οπίσθιο



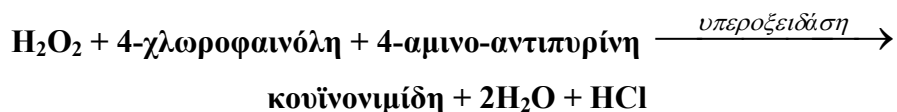
τμήμα του ψαριού που βρίσκονται στην πλειοψηφία τους οι λευκοί μύες. Οι ιστοί ομογενοποιήθηκαν με χρήση ηλεκτρικού μαχαιριού (Ultra Turrax, T25 basic, IKA Labortechnik, Germany) παρουσία 1,5 ml 0,6 M perchloric acid (PCA) για κάθε 150 mg ιστού. Στη συνέχεια, το ομογενοποιημένο διάλυμα φυγοκεντρήθηκε 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 κιτ.

2.5.3. Μέτρηση συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος

Η αρχή της μεθόδου του κιτ 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 κιτ (βλ. και Πίνακα 4):

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 4. 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 μmol g⁻¹) γίνεται με τον τύπο:

$$[\frac{((\frac{Ab_{\Delta}}{Ab_S}) \times C) / 1000}{10} \times 1650 / 10] \times 1000 / W \times 1000$$

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,

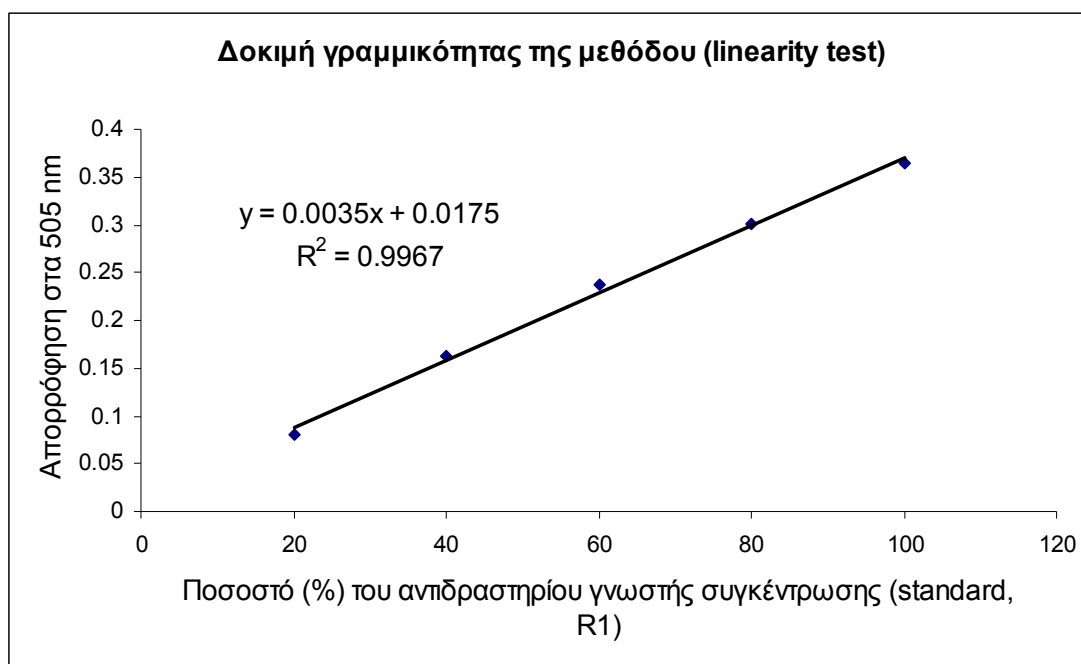
1650 (μl): ο όγκος του ομογενοποιημένου με PCA διαλύματος (κατά προσέγγιση)

(Καρκάνα, 2003).

Για να ελεγχθεί η πιστότητα των μετρήσεων του φωτόμετρου, πραγματοποιήθηκε «δοκιμή γραμμικότητας» (linearity test, Πίνακας 5 και Γράφημα 2) μετρώντας πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις (100%, 80%, 60%, 40% και 20%) του αντιδραστηρίου γνωστής συγκέντρωσης που παρεχόταν από το κιτ (R1).

Πίνακας 5. 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



Γράφημα 2. 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 στο Εργαστήριο Βιοχημείας της δρ. Ε. Παπακωνσταντή, στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Κρήτης.



2.6. Στατιστική ανάλυση

Η ανεξαρτησία της σχετικής (ως προς το μήκος) κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης (RU_{crit}) από το ολικό μήκος (TL) ελέγχθηκε κατασκευάζοντας την ευθεία του λογαρίθμου της U_{crit} σε συνάρτηση με το λογάριθμο του TL και εξετάζοντας την κλίση της ευθείας σε σχέση με τη μονάδα:

$$\log U_{crit} = a + b \cdot \log TL$$

Για την ανάλυση των δεδομένων, στην περίπτωση της κολυμβητικής ικανότητας, πραγματοποιήθηκε two-way ANOVA (παράγοντες: θερμοκρασία εκτροφής και φύλο) και στη συνέχεια το Student Newman-Keuls Post Hoc test, για την εύρεση των διαφορών μεταξύ των ομάδων. Η σύγκριση των μέσων τιμών μεταξύ των επαναλήψεων, έγινε με τη χρήση του t-test και όπου δεν πληρούνταν οι απαραίτητες προϋποθέσεις (δηλαδή κανονική κατανομή και ομοιογένεια διασπορών), πραγματοποιούνταν το μη-παραμετρικό Mann-Whitney U test. Στην περίπτωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος, πραγματοποιήθηκε three-way ANOVA λόγω της συμμετοχής ενός επιπλέον παράγοντα (κατάσταση άσκησης) και στη συνέχεια και πάλι το Student Newman-Keuls Post Hoc test, 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).



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Στοιχεία εκτροφής

Τα στοιχεία των συνθηκών εκτροφής (μετρήσεις θερμοκρασίας, pH και ποσοστό διαλυμένου οξυγόνου στο νερό), δίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6. Μέσοι όροι (\pm S.D., τυπική απόκλιση) των μετρήσεων θερμοκρασίας, pH και O_2 για τις τέσσερις συνθήκες του πειράματος.

<i>Συνθήκη</i>	<i>Θερμοκρασία (°C)</i>	<i>pH</i>	<i>% O_2</i>
22°C	21,999 \pm 0,244	6,86 \pm 0,389	79,46 \pm 5,978
25°C	25,003 \pm 0,230	7,17 \pm 0,225	82,73 \pm 6,04
28°C	28,125 \pm 0,118	6,75 \pm 0,357	79 \pm 6,987
31°C	31,040 \pm 0,305	7,16 \pm 0,277	77,81 \pm 5,335

Τα στοιχεία δειγματοληψίας (TL και βάρος) από τους 4 πληθυσμούς πριν και μετά τον εγκλιματισμό, παρουσιάζονται στους Πίνακες 7 και 8. Τα ψάρια εμφάνισαν σημαντική αύξηση στο μήκος και στο βάρος κατά την περίοδο του εγκλιματισμού (Πίνακας 9), γεγονός που υποστηρίζει ότι τα ψάρια εγκλιματίστηκαν ομαλά στη νέα θερμοκρασία.

Πίνακας 7. Στοιχεία δειγματοληψίας πριν τον εγκλιματισμό στην κοινή θερμοκρασία. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι τυχαίου δείγματος 12 ατόμων από κάθε επανάληψη. TL, ολικό μήκος; W, βάρος σώματος.

<i>Θερμοκρασία</i>	<i>Επανάληψη</i>	<i>TL (mm)</i>	<i>Μέσος όρος επαναλήψεων</i>	<i>W (g)</i>	<i>Μέσος όρος επαναλήψεων</i>
22°C	A	30,09	30,04	0,293	0,289
	B	29,989		0,286	
25°C	A	27,416	27,072	0,241	0,247
	B	26,728		0,253	
28°C	A	26,396	26,983	0,204	0,215
	B	27,571		0,227	
31°C	A	26,913	27,616	0,204	0,223
	B	28,319		0,242	
Μέσος Όρος			27,928		0,244



Πίνακας 8. Στοιχεία δειγματοληψίας μετά τον εγκλιματισμό στην κοινή θερμοκρασία. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι μέσοι όροι των 12 ατόμων από κάθε επανάληψη που συμμετείχαν στην άσκηση κολύμβησης. TL, ολικό μήκος; W, βάρος σώματος.

<i>Θερμοκρασία</i>	<i>Επανάληψη</i>	<i>TL (mm)</i>	<i>Μέσος όρος επαναλήψεων</i>	<i>W (g)</i>	<i>Μέσος όρος επαναλήψεων</i>
22°C	A	34,690	34,818	0,525	0,545
	B	34,945		0,565	
25°C	A	33,733	33,898	0,453	0,462
	B	34,062		0,471	
28°C	A	34,263	34,308	0,456	0,46
	B	34,353		0,464	
31°C	A	34,849	34,485	0,488	0,467
	B	34,120		0,446	
Μέσος Όρος		34,377		0,484	

Πίνακας 9. Αύξηση στο ολικό μήκος και στο βάρος των ατόμων κατά την περίοδο εγκλιματισμού στην κοινή θερμοκρασία. T, θερμοκρασία ανάπτυξης; D, επανάληψη; TL, ολικό μήκος.

<i>T</i>	<i>D</i>	<i>Αύξηση στο TL (mm)</i>	<i>Μέσος όρος επαναλήψεων</i>	<i>Αύξηση στο Βάρος (g)</i>	<i>Μέσος όρος επαναλήψεων</i>
22°C	A	4,600	4,778	0,232	0,256
	B	4,956		0,279	
25°C	A	6,317	6,826	0,212	0,215
	B	7,334		0,218	
28°C	A	7,867	7,325	0,252	0,245
	B	6,782		0,237	
31°C	A	7,936	6,869	0,284	0,244
	B	5,801		0,204	
Μέσος Όρος		6,449		0,240	



3.2. Κολυμβητική ικανότητα

Η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των δεδομένων έδειξε ότι οι κύριοι παράγοντες (θερμοκρασία εκτροφής και φύλο) είχαν στατιστικά σημαντική επίδραση στην κολυμβητική ικανότητα των ατόμων ($p < 0.01$), ενώ δεν υπήρξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων ($p > 0.05$) (Πίνακας 10). Επίσης σε όλες τις περιπτώσεις δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των επαναλήψεων του πειράματος (Α και Β), όπως ήταν αναμενόμενο.

Πίνακας 10. Τα αποτελέσματα της two-way ANOVA για την κολυμβητική ικανότητα. Οι πηγές διαφοροποίησης περιλαμβάνουν: Temp., παράγοντας θερμοκρασία εκτροφής; Sex, παράγοντας φύλο; Temp. x Sex, αλληλεπίδραση των παραγόντων θερμοκρασία εκτροφής και φύλο.

<i>Effect</i>	<i>SS</i>	<i>Degrees of Freedom</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Intercept	6619,566	1	6619,566	8795,407	0,000000
Temp.	13,324	3	4,441	5,901	0,001022
Sex	6,424	1	6,424	8,536	0,004424
Temp. x Sex	5,241	3	1,747	2,321	0,080685
Error	66,230	88	0,753		

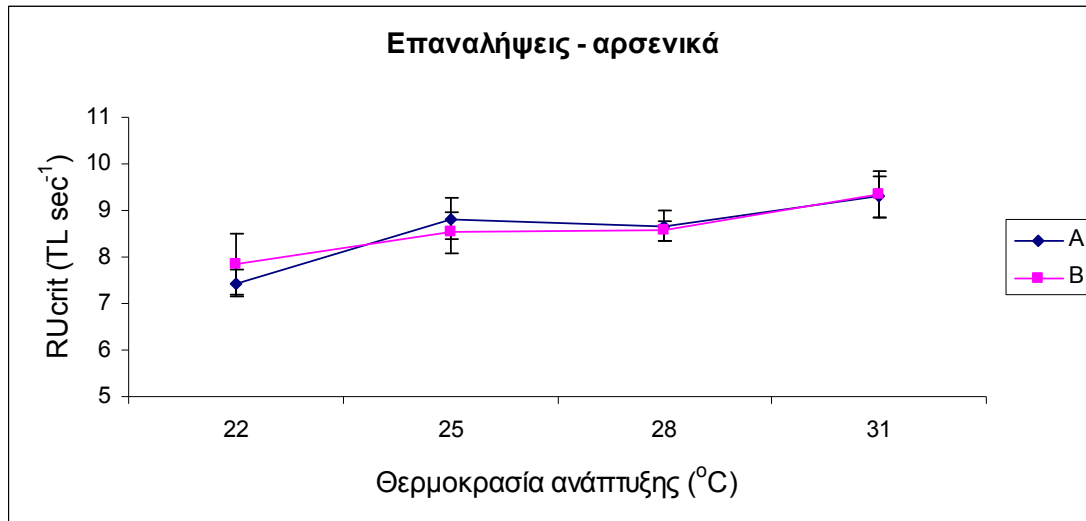
Τα αποτελέσματα της άσκησης για τον υπολογισμό της κολυμβητικής ικανότητας των αρσενικών ατόμων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11. Σχετική κρίσιμη ταχύτητα, RU_{crit} (\pm S.D., τυπική απόκλιση; S.E., τυπικό σφάλμα) των αρσενικών ατόμων του πειράματος.

<i>Θερμοκρασία</i>	<i>Επανάληψη</i>	<i>RU_{crit} ($TL \text{ sec}^{-1}$)</i>	<i>\pm S.D.</i>	<i>\pm S.E.</i>	<i>Μέσος όρος επαναλήψεων</i>
22°C	A	7,438	0,677	0,276	7,639
	B	7,841	1,610	0,657	
25°C	A	8,820	1,090	0,445	8,674
	B	8,528	1,089	0,445	
28°C	A	8,672	0,827	0,338	8,616
	B	8,561	0,492	0,201	
31°C	A	9,294	1,111	0,454	9,321
	B	9,347	1,258	0,514	

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα, τα αρσενικά των 22°C, εμφάνισαν τη χαμηλότερη σχετική κρίσιμη ταχύτητα. Τα άτομα των 25 και 28°C φάνηκε να έχουν σχεδόν όμοια κολυμβητική ικανότητα, ενώ τα αρσενικά άτομα των 31°C εμφάνισαν

τις υψηλότερες τιμές σχετικής κρίσιμης ταχύτητας. Από τα στοιχεία του Πίνακα 11 κατασκευάστηκε το Γράφημα 3, που παρουσιάζει τα αποτελέσματα που ελήφθησαν για τα αρσενικά άτομα στις δύο επαναλήψεις.



Γράφημα 3. RU_{crit} (\pm S.E., τυπικό σφάλμα) αρσενικών ατόμων από τις 2 επαναλήψεις του πειράματος.

Από τα αποτελέσματα του Post Hoc test προκύπτει ότι αρσενικά των 22°C διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τα αρσενικά των 31°C, ενώ οι υπόλοιποι πληθυσμοί δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους όσον αφορά στη σχετική κρίσιμη ταχύτητα (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Στατιστικές διαφορές ανάμεσα στα αρσενικά των 4 θερμοκρασιών. ***, $p < 0.001$; NS, μη στατιστικά σημαντικές διαφορές.

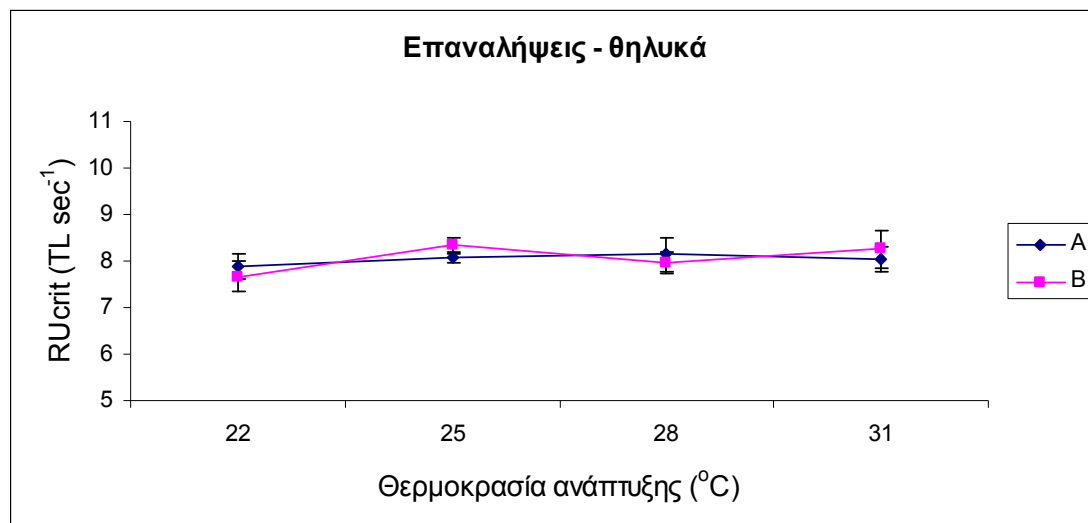
	25°C	28°C	31°C
22°C	NS	NS	***
25°C		NS	NS
28°C			NS

Αντίστοιχα τα αποτελέσματα της άσκησης για τον υπολογισμό της κολυμβητικής ικανότητας των θηλυκών ατόμων, παρουσιάζονται στον Πίνακα 13 και το Γράφημα 4.

Πίνακας 13. Σχετική κρίσιμη ταχύτητα RU_{crit} (\pm S.D., τυπική απόκλιση; S.E., τυπικό σφάλμα) των θηλυκών ατόμων του πειράματος.

Θερμοκρασία	Επανάληψη	RU_{crit} ($TL\ sec^{-1}$)	\pm S.D.	\pm S.E.	Μέσος όρος επαναλήψεων
22°C	A	7,887	0,665	0,272	7,780
	B	7,672	0,774	0,316	
25°C	A	8,060	0,206	0,084	8,203
	B	8,345	0,400	0,163	
28°C	A	8,136	0,914	0,373	8,056
	B	7,975	0,561	0,229	
31°C	A	8,022	0,662	0,270	8,142
	B	8,262	0,980	0,400	

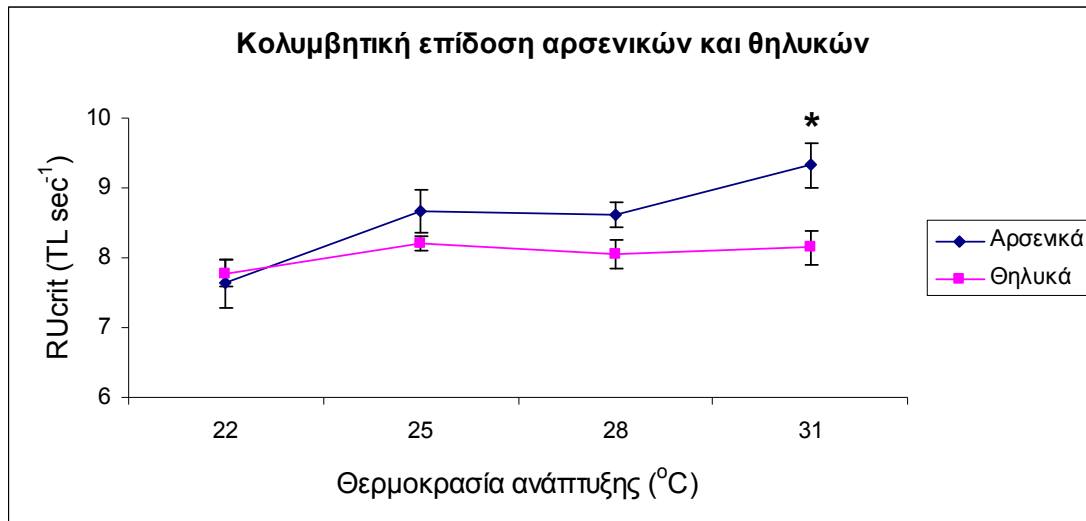
Στην περίπτωση των θηλυκών, τα άτομα των 22°C, φαίνεται να εμφανίζουν τη χαμηλότερη σχετική κρίσιμη ταχύτητα, ενώ τα άτομα των τριών υπόλοιπων θερμοκρασιών εμφανίζουν περίπου την ίδια κολυμβητική επίδοση. Από τη στατιστική ανάλυση, δεν προέκυψε καμία σημαντική διαφορά ανάμεσα στις σχετικές κρίσιμες ταχύτητες των θηλυκών από τις τέσσερις θερμοκρασίες.



Γράφημα 4. RU_{crit} (\pm S.E., τυπικό σφάλμα) θηλυκών ατόμων από τις 2 επαναλήψεις του πειράματος.

Στο Γράφημα 5, παρουσιάζεται συγκριτικό διάγραμμα των κολυμβητικών επιδόσεων αρσενικών και θηλυκών ατόμων από τις τέσσερις θερμοκρασίες ανάπτυξης. Για την κατασκευή του διαγράμματος έγινε ενοποίηση των επαναλήψεων. Από τη στατιστική ανάλυση προέκυψε ότι μόνο στους 31°C υπάρχουν στατιστικά

σημαντικές διαφορές στη σχετική κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης αρσενικών και θηλυκών, με τα αρσενικά να είναι αισθητά γρηγορότερα.



Γράφημα 5. Συγκριτικό διάγραμμα των κολυμβητικών επιδόσεων ($RU_{crit} \pm S.E.$, τυπικό σφάλμα) αρσενικών και θηλυκών ατόμων από τις τέσσερις θερμοκρασίες ανάπτυξης. *, $p < 0.05$. Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στη διαφορά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών στην εκάστοτε θερμοκρασία.

Τα δεδομένα που προέκυψαν από τις μετρήσεις μετά την άσκηση κολύμβησης καθώς και αυτά που μετρήθηκαν στις ψηφιακές φωτογραφίες μετά την τοποθέτηση των landmarks, παρουσιάζονται στους Πίνακες 14 και 15.

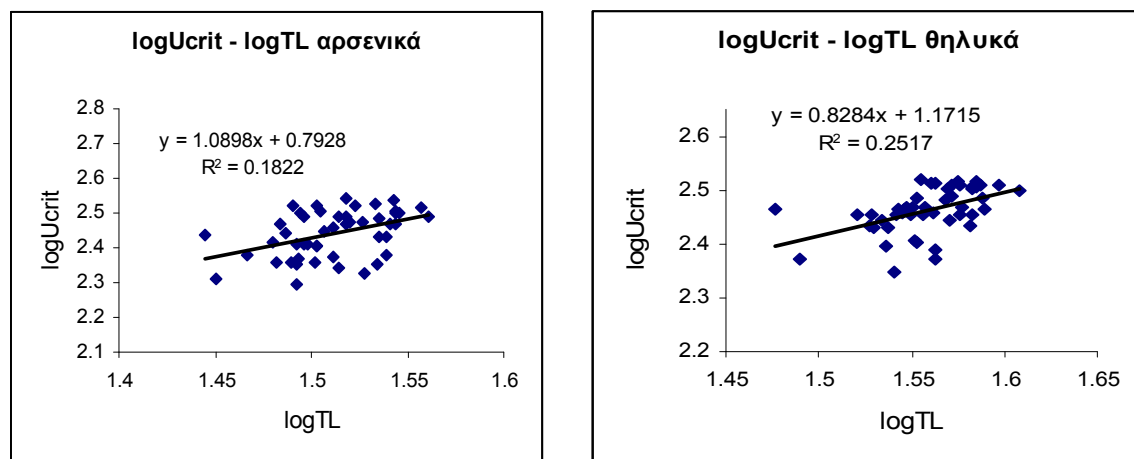
Πίνακας 14. Μορφομετρικοί χαρακτήρες των αρσενικών ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν στην άσκηση κολύμβησης (\pm S.D., τυπική απόκλιση). TL, ολικό μήκος; W, βάρος; BW, πάχος σώματος; BDmax, μέγιστο ύψος σώματος; BD, ύψος σώματος; CpD, ύψος ουραίου μίσχου.

♂	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.
22A	32.510	1.560	0.345	0.051	4.528	0.264	6.788	0.387	5.592	0.486	2.967	0.224
22B	32.721	1.454	0.368	0.056	4.930	0.200	6.634	0.501	5.585	0.321	2.988	0.182
25A	31.611	3.196	0.329	0.083	4.687	0.557	6.533	0.650	5.485	0.692	2.913	0.342
25B	33.186	2.111	0.349	0.066	4.922	0.354	6.728	0.593	5.664	0.646	3.044	0.284
28A	32.815	2.176	0.356	0.068	4.848	0.270	6.851	0.427	5.792	0.502	2.938	0.206
28B	32.323	1.984	0.328	0.062	4.882	0.196	6.688	0.623	5.596	0.559	2.925	0.243
31A	32.842	1.489	0.352	0.061	4.733	0.457	6.640	0.509	5.672	0.347	2.849	0.249
31B	32.144	1.885	0.327	0.061	4.570	0.555	6.424	0.420	5.463	0.438	2.823	0.257

Πίνακας 15. Μορφομετρικοί χαρακτήρες των θηλυκών 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.

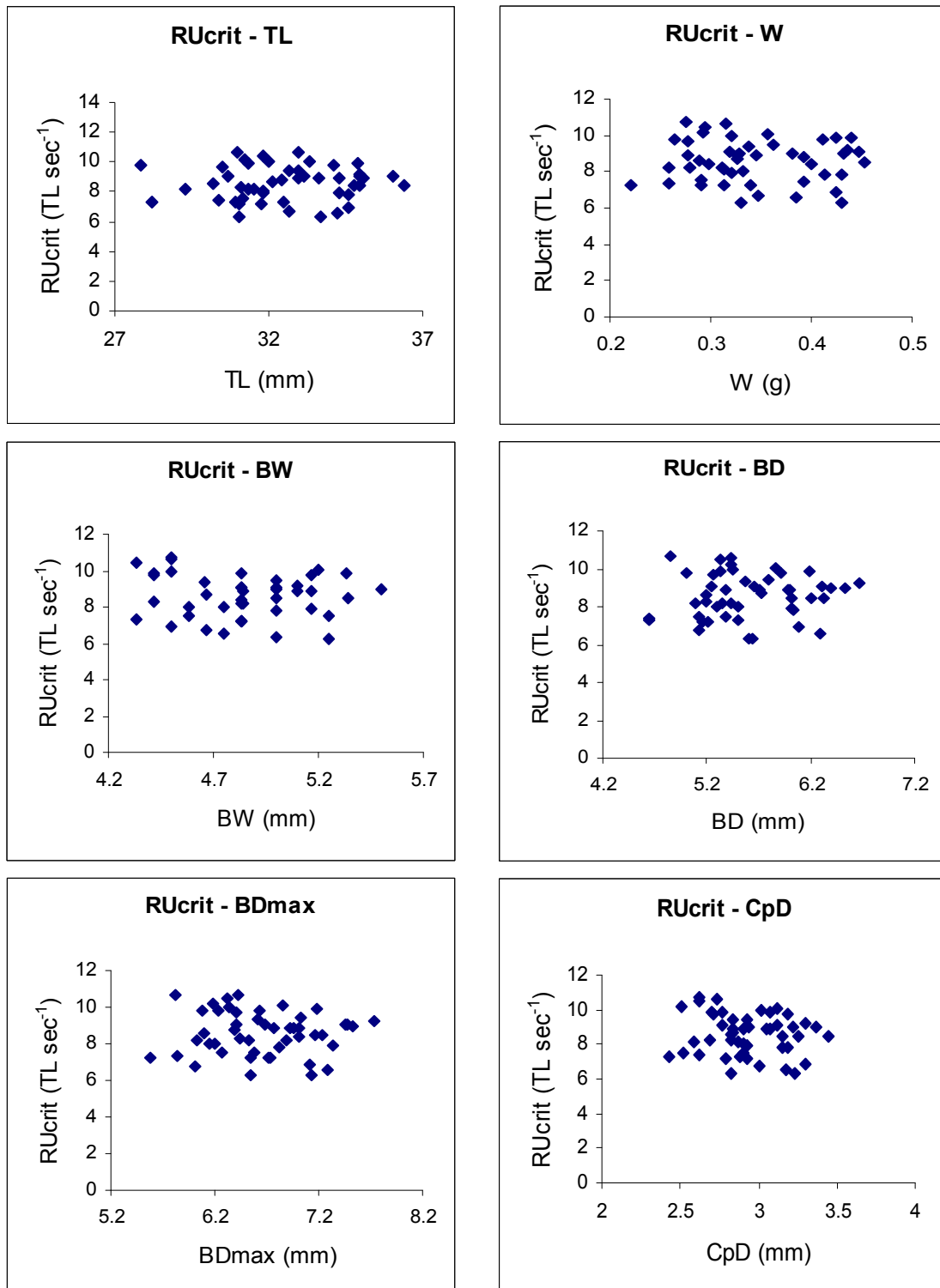
♀	TL(mm)	\pm S.D.	W (g)	\pm S.D.	BW (mm)	\pm S.D.	BDmax (mm)	\pm S.D.	BD (mm)	\pm S.D.	CpD (mm)	\pm S.D.
22A	36.870	2.068	0.706	0.101	7.222	0.447	9.632	0.656	7.012	0.399	3.421	0.271
22B	37.169	2.523	0.762	0.097	7.377	0.334	9.811	0.318	7.225	0.565	3.491	0.245
25A	35.855	1.836	0.577	0.103	6.625	0.595	8.858	0.892	6.508	0.379	3.322	0.174
25B	34.937	2.626	0.593	0.118	6.642	0.413	9.071	0.788	6.641	0.628	3.335	0.415
28A	35.711	3.178	0.555	0.132	5.972	0.562	8.465	0.788	6.693	0.676	3.379	0.200
28B	36.383	1.083	0.600	0.062	6.278	0.346	8.960	0.256	6.698	0.318	3.272	0.124
31A	36.855	1.978	0.624	0.117	6.613	0.526	9.157	0.599	6.592	0.591	3.243	0.187
31B	36.097	0.761	0.565	0.069	6.430	0.455	8.512	0.581	6.459	0.336	3.088	0.090

Σε όλες τις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, η κλίση της σχέσης του λογαρίθμου της U_{crit} με το λογάριθμο του TL ήταν πολύ κοντά στη μονάδα (περίπου 1.1 για τα αρσενικά και 0,8 για τα θηλυκά, Γράφημα 6), υποδηλώνοντας ότι η σχετική (του μήκους) κρίσιμη ταχύτητα (RU_{crit}) είναι ανεξάρτητη του μήκους και στην περίπτωση των αρσενικών και στην περίπτωση των θηλυκών ατόμων, όπως φαίνεται και στα Γραφήματα 7 και 8.

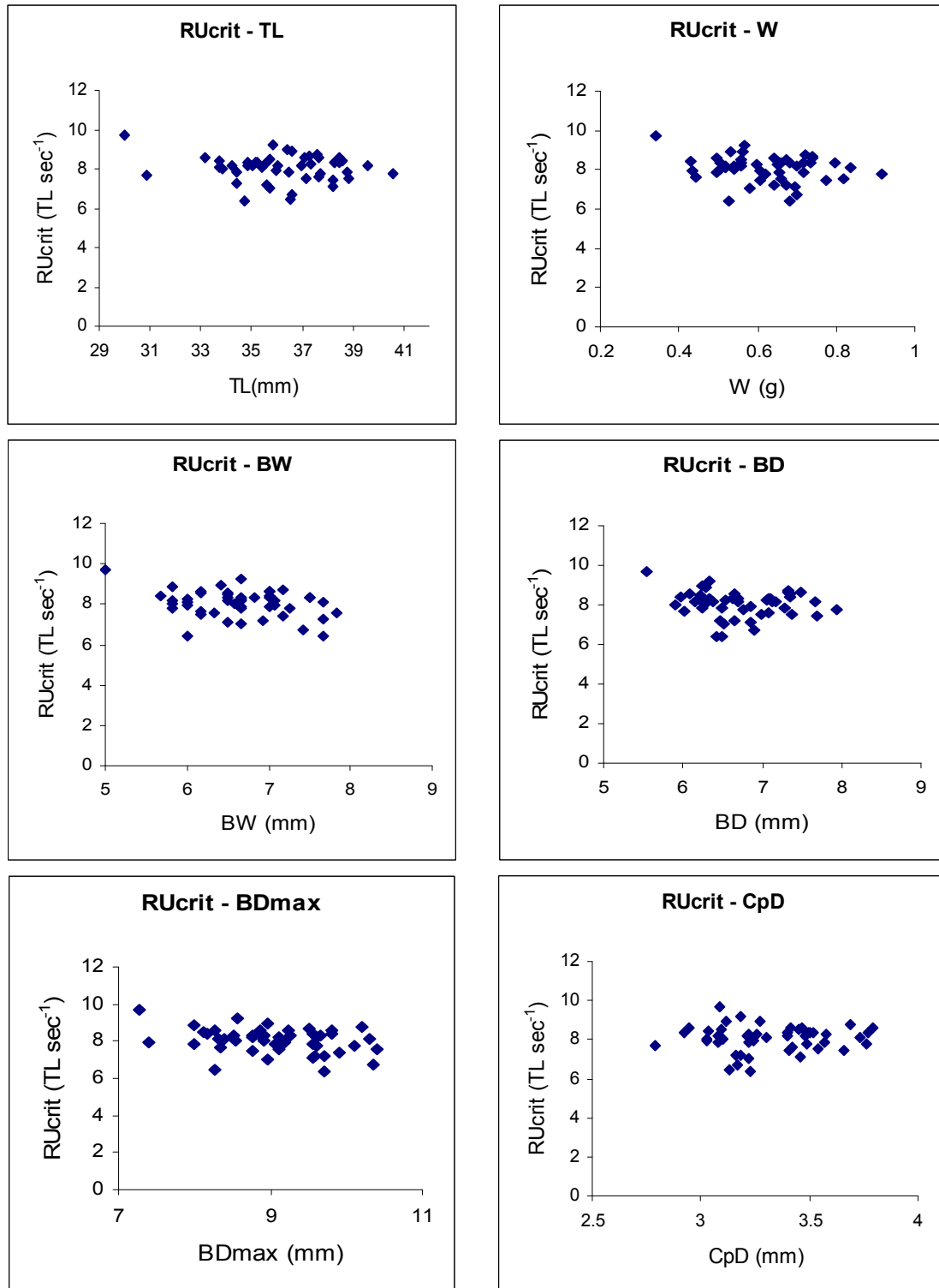


Γράφημα 6. Σχέση του $\log U_{crit}$ με τον $\log TL$.

Ακόμα, ελέγχθηκε η σχέση της RU_{crit} με τους υπόλοιπους χαρακτήρες που μετρήθηκαν κατά τη δειγματοληψία μετά την άσκηση κολύμβησης και αργότερα στις ψηφιακές φωτογραφίες για τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα ξεχωριστά. Όπως φαίνεται και από τα Γραφήματα 7 και 8, η RU_{crit} ήταν ανεξάρτητη από τους μορφομετρικούς αυτούς χαρακτήρες.



Γράφημα 7. Σχέση της RU_{crit} με τους μορφολογικούς χαρακτήρες που μετρήθηκαν στα αρσενικά άτομα. TL, ολικό μήκος; W, βάρος; BW, πάχος σώματος; BD, ύψος σώματος; BDmax, μέγιστο ύψος σώματος; CpD, ύψος ουραίου μίσχου.



Γράφημα 8. Σχέση της $RUCrit$ με τους μορφολογικούς χαρακτήρες που μετρήθηκαν στα θηλυκά άτομα. TL, ολικό μήκος; W, βάρος; BW, πάχος σώματος; BD, ύψος σώματος; BDmax, μέγιστο ύψος σώματος; CpD, ύψος ουραίου μίσχου.

3.3. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στους μύες

Στην περίπτωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες, η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι μόνο οι κύριοι παράγοντες φύλο και κατάσταση άσκησης (ηρεμία ή εξουθένωση) είχαν σημαντική επίδραση ($p < 0.001$) ενώ ο παράγοντας θερμοκρασία εκτροφής δεν επέδρασε ($p > 0.05$). Επίσης, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαφόρων παραγόντων καθώς και η τριπλή αλληλεπίδρασή τους, ήταν στατιστικά σημαντικές (Πίνακας 16).

Πίνακας 16. Τα αποτελέσματα της three-way ANOVA για τη συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στους μύες. Οι πηγές διαφοροποίησης περιλαμβάνουν: T, θερμοκρασία εκτροφής; Sex, φύλο; State, κατάσταση άσκησης (ηρεμία ή εξουθένωση); T x Sex, αλληλεπίδραση των παραγόντων θερμοκρασία εκτροφής και φύλο; T x State, αλληλεπίδραση των παραγόντων θερμοκρασία εκτροφής και κατάσταση άσκησης; Sex x State, αλληλεπίδραση των παραγόντων φύλο και κατάσταση άσκησης; T x Sex x State, τριπλή αλληλεπίδραση των παραγόντων θερμοκρασία εκτροφής, φύλο και κατάσταση άσκησης.

<i>Effect</i>	<i>SS</i>	<i>Degrees of Freedom</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
Intercept	24141,56	1	24141,56	5884,153	0,000000
T	21,15	3	7,05	1,718	0,172094
Sex	113,51	1	113,51	27,666	0,000002
State	2226,11	1	2226,11	542,583	0,000000
T x Sex	60,31	3	20,10	4,900	0,003967
T x State	108,37	3	36,12	8,805	0,000057
Sex x State	20,41	1	20,41	4,974	0,029252
T x Sex x State	51,98	3	17,33	4,223	0,008688
Error	262,58	64	4,10		

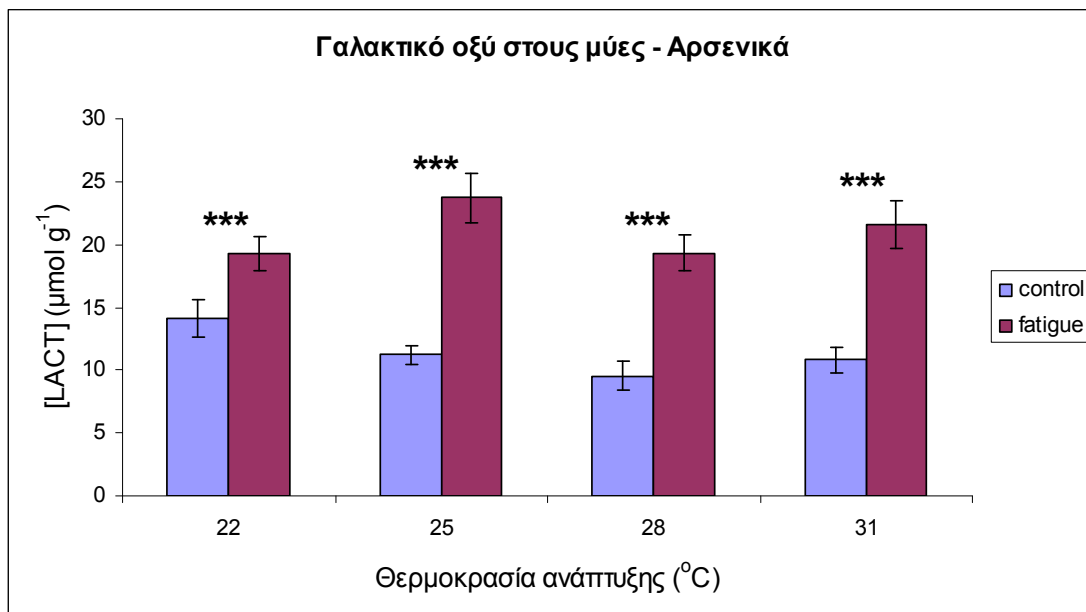
Τα αποτελέσματα της μέτρησης της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες των αρσενικών ατόμων σε κατάσταση ηρεμίας και μετά από εξουθένωση καθώς και οι στατιστικές διαφορές για την κάθε περίπτωση, παρουσιάζονται στους Πίνακες 17 και 18 καθώς και στο Γράφημα 9.

Πίνακας 17. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος ([LACT]) στους μύες αρσενικών ατόμων σε κατάσταση ηρεμίας (control). *, $p < 0.05$; NS, μη στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$).

<i>T</i>	<i>[LACT] control (μmol g⁻¹)</i>	<i>S.D.</i>	<i>S.E.</i>	<i>25°C</i>	<i>28°C</i>	<i>31°C</i>
22°C	14,074	2,588	1,494	NS	*	NS
25°C	11,208	1,580	0,707		NS	NS
28°C	9,546	2,337	1,169			NS
31°C	10,814	2,304	1,030			

Πίνακας 18. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος ([LACT]) στους μύες αρσενικών ατόμων μετά από εξουθένωση (fatigue). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; NS, μη στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$).

<i>T</i>	<i>[LACT] fatigue</i> ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	<i>S.D.</i>	<i>S.E.</i>	<i>25°C</i>	<i>28°C</i>	<i>31°C</i>
22°C	19,219	2,723	1,362	*	NS	NS
25°C	23,720	2,758	1,950		**	NS
28°C	19,310	2,427	1,401			NS
31°C	21,552	3,741	1,871			



Γράφημα 9. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στους μύες (\pm S.E., τυπικό σφάλμα) αρσενικών ατόμων σε κατάσταση ηρεμίας (control) και μετά από εξουθένωση (fatigue). ***, $p < 0.001$. Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στις διαφορές μεταξύ των συνθηκών control, ηρεμία και fatigue, εξουθένωση σε κάθε θερμοκρασία.

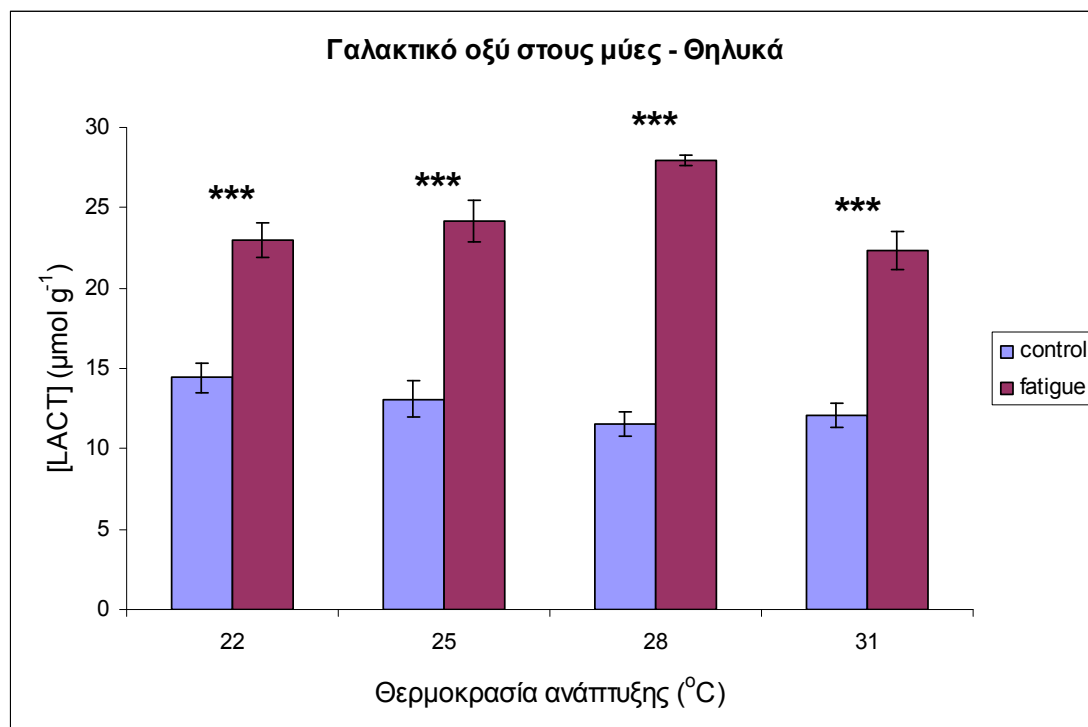
Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα της μέτρησης της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες για τα θηλυκά άτομα σε κατάσταση ηρεμίας και μετά από εξουθένωση και τα αποτελέσματα της αντίστοιχης στατιστικής ανάλυσης, παρουσιάζονται στους Πίνακες 19 και 20 καθώς και στο Γράφημα 10,

Πίνακας 19. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος ([LACT]) στους μύες θηλυκών ατόμων σε κατάσταση ηρεμίας (control). NS, μη στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$).

<i>T</i>	[LACT] control ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	<i>S.D.</i>	<i>S.E.</i>	25°C	28°C	31°C
22°C	14,408	2,060	0,921	NS	NS	NS
25°C	13,075	2,549	1,140		NS	NS
28°C	11,543	1,650	0,738			NS
31°C	12,104	1,723	0,770			

Πίνακας 20. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος ([LACT]) στους μύες θηλυκών ατόμων μετά από εξουθένωση (fatigue). **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; NS, μη στατιστικά σημαντικές διαφορές ($p > 0.05$).

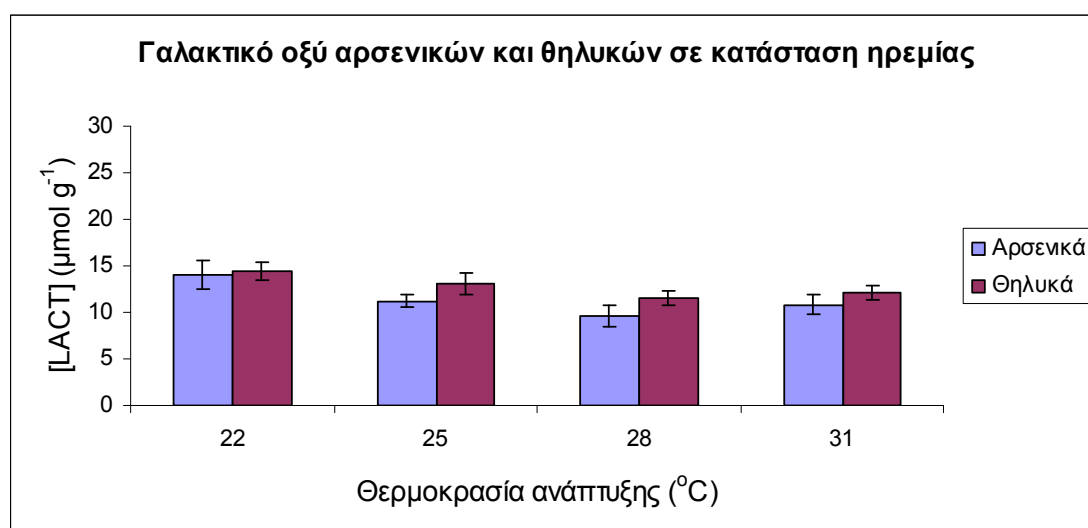
<i>T</i>	[LACT] fatigue ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	<i>S.D.</i>	<i>S.E.</i>	25°C	28°C	31°C
22°C	22,953	2,375	1,062	NS	**	NS
25°C	24,141	2,868	1,283		**	NS
28°C	27,942	0,703	0,314			***
31°C	22,336	2,575	1,151			



Γράφημα 10. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στους μύες (\pm S.E., τυπικό σφάλμα) θηλυκών ατόμων σε κατάσταση ηρεμίας (control) και μετά από εξουθένωση (fatigue). **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στις διαφορές μεταξύ των συνθηκών control, ηρεμία και fatigue, εξουθένωση σε κάθε θερμοκρασία.

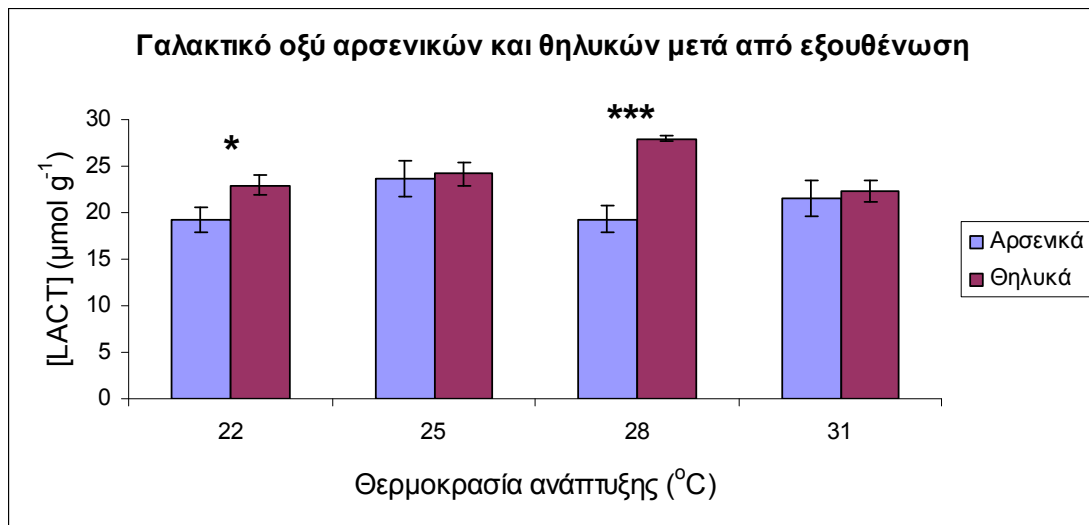
Οι τιμές του γαλακτικού οξέος αρσενικών και θηλυκών ατόμων σε κατάσταση ηρεμίας και μετά από έντονη άσκηση και εξουθένωση παρουσιάζονται συγκριτικά στα Γραφήματα 11 και 12 αντίστοιχα.

Όπως προέκυψε από την ανάλυση των δεδομένων, στην περίπτωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος σε κατάσταση ηρεμίας, δεν ανιχνεύθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά σε καμία από τις τέσσερις θερμοκρασίες, ανάμεσα στα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα που εξετάστηκαν.



Γράφημα 11. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στους μύες (\pm S.E., τυπικό σφάλμα) αρσενικών και θηλυκών ατόμων σε κατάσταση ηρεμίας (control).

Στην περίπτωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος μετά από εξουθένωση, υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα των 22 και των 31°C (Γράφημα 12).



Γράφημα 12. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στους μύες (\pm S.E., τυπικό σφάλμα) αρσενικών και θηλυκών ατόμων μετά από εξουθένωση (fatigue). *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$. Η στατιστική ανάλυση αναφέρεται στις διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών στην εκάστοτε θερμοκρασία.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1. Κολυμβητική ικανότητα

Η κολυμβητική ικανότητα ενός ψαριού αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό που επιδρά σημαντικά σε πολλές πτυχές της ζωής των ψαριών. Πιο συγκεκριμένα, έχει αναφερθεί ότι επηρεάζει την απόκτηση τροφής, την εύρεση ταιριού, την αποφυγή θηρευτών (Drücker, 1996) και γενικά την επιβίωση των ψαριών (Jones *et al.*, 1974). Επίσης έχει υποστηριχθεί, ότι η ικανότητα κίνησης των οργανισμών (δηλαδή η κολυμβητική ικανότητα για τα ψάρια) αποτελεί χαρακτηριστικό που επηρεάζει άμεσα τη «Δαρβινική προσαρμογή» (Darwinian fitness).

Στην παρούσα μελέτη, τα άτομα εμφάνισαν σχετικές κρίσιμες ταχύτητες κολύμβησης που είχαν εύρος από 7,6 μήκη σώματος ανά δευτερόλεπτο ($TL \text{ sec}^{-1}$) έως 9,3 $TL \text{ sec}^{-1}$, 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 αγρίου 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 προηγούμενη εργασία οι Plaut & Gordon (1994) είχαν καταλήξει σε παρόμοιες παρατηρήσεις σχετικά με την κολυμβητική ικανότητα του zebrafish όταν υπέβαλλαν άγριου τύπου άτομα σε κολύμβηση ταχύτητας έως και 13 $SL \text{ sec}^{-1}$, χωρίς



να διαπιστώσουν κόπωση. Και σε αυτή την περίπτωση, αν και η ταχύτητα είναι εκφρασμένη 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) και Plaut & Gordon (1994) ήταν 28°C , ενώ στην παρούσα εργασία ήταν $26,5^{\circ}\text{C}$ και όπως είναι γνωστό σε υψηλότερες θερμοκρασίες κολύμβησης (έως κάποιο μέγιστο), επιτυγχάνονται υψηλότερες επιδόσεις (Beamish, 1978; Koumoundouros *et al.*, 2002a). 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} .

Τέλος αξίζει να σημειωθεί ότι τα αρσενικά άτομα που αναπτύχθηκαν στους 22°C διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τα αντίστοιχα των 31°C , έχοντας τη χαμηλότερη RU_{crit} . Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί με δύο τρόπους: α) η θερμοκρασία ανάπτυξης επιδρά και επηρεάζει την οντογένεση των μυών (Johnston



1981; Johnston, 1993; Johnston, 2006) επιφέροντας διαφορές στη μυϊκή μάζα (μέγεθος και αριθμός μυϊκών ινών) που οδηγούν σε διαφοροποίηση της κολυμβητικής επίδοσης, και β) η θερμοκρασία επιδρά στο σχήμα του σώματος (Λέρης, 2006; Προσωπικά αδημοσίευτα αποτελέσματα) και στους μεριστικούς χαρακτήρες (Blaxter, 1992; Λάγκη, 2005; Προσωπικά αδημοσίευτα αποτελέσματα) που με τη σειρά τους επηρεάζουν την κολυμβητική ικανότητα. Στην περίπτωση των θηλυκών η κολυμβητική ικανότητα δεν φάνηκε να επηρεάζεται από τους παραπάνω παράγοντες δεδομένου ότι δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στους 4 πληθυσμούς. Επίσης, σε καμία από τις συνθήκες δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά οι επαναλήψεις του πειράματος (A και B) όπως ήταν αναμενόμενο.

4.2. Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος στους μύες

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. 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).

Επίσης, τα αρσενικά άτομα που αναπτύχθηκαν στους 22°C και βρίσκονταν σε κατάσταση ηρεμίας διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τα αντίστοιχα των 28°C, εμφανίζοντας την υψηλότερη τιμή. Μεταξύ των εξουθενωμένων από την άσκηση ατόμων, τα αρσενικά των 25°C διέφεραν στατιστικά σημαντικά από τα άτομα των 22 και 28°C, εμφανίζοντας την υψηλότερη τιμή. Στην περίπτωση των θηλυκών που βρίσκονταν σε κατάσταση ηρεμίας, δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διαφορετικές θερμοκρασίες, ενώ από τα εξουθενωμένα θηλυκά, ο πληθυσμός των 28°C διέφερε στατιστικά σημαντικά από τους υπόλοιπους,



παρουσιάζοντας την υψηλότερη τιμή. Κατά τη σύγκριση αρσενικών και θηλυκών, στην περίπτωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες σε κατάσταση ηρεμίας, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, ενώ στην περίπτωση των εξουθενωμένων ατόμων, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους πληθυσμούς των 22 και 28°C ανάμεσα στα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα. Οι τιμές του γαλακτικού οξέος που μετρήθηκαν κατά μέσο όρο ήταν, για τα αρσενικά 11,4 $\mu\text{mol g}^{-1}$ σε κατάσταση ηρεμίας και 20,9 $\mu\text{mol g}^{-1}$ μετά από εξουθένωση, ενώ για τα θηλυκά, 12,8 $\mu\text{mol g}^{-1}$ σε κατάσταση ηρεμίας και 24,3 $\mu\text{mol g}^{-1}$ μετά από εξουθένωση. Οι μέσοι όροι για το σύνολο των δειγμάτων ήταν 12,1 $\mu\text{mol g}^{-1}$ για τα άτομα που βρίσκονταν σε κατάσταση ηρεμίας και 22,6 $\mu\text{mol g}^{-1}$, για τα εξουθενωμένα άτομα.

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 mg g^{-1} περίπου ($\sim 4 \mu\text{mol g}^{-1}$) πριν την άσκηση έως 0,45 mg g^{-1} περίπου ($\sim 5 \mu\text{mol g}^{-1}$) μετά την άσκηση.

Η παρατηρούμενη διαφορά των εργασιών αυτών σε σύγκριση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, μπορεί να εξηγηθεί σε ένα βαθμό, από το γεγονός ότι οι Plaut & Gordon (1994) και Widmer *et al.* (2006) χρησιμοποίησαν διαφορετική μέθοδο (και διαφορετικό σύστημα μέτρησης - kit). Ακόμη και στις δύο παραπάνω μελέτες, οι 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 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 21).

Πίνακας 21. 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).

	<i>Control</i>		<i>Exercise</i>	
	[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 χρησιμοποιήσαν οι Widmer *et al.* (2006), ήταν αρκετά μικρότερο (16,4 mm SL) από αυτό των ατόμων της παρούσας μελέτης (34,4 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, οι Sfakianakis *et al.*, (2008 submitted) μελέτησαν την απομάκρυνση του γαλακτικού οξέος από τους μύες λαυρακιών παρόμοιου μεγέθους (38,6 mm SL) μετά από εξουθενωτική άσκηση. Οι συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος στους μύες που μέτρησαν (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).

4.3. Επίδραση του φύλου στην κολυμβητική ικανότητα

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι το φύλο παίζει σημαντικό ρόλο σε διάφορες πτυχές της ζωής των ψαριών μεταξύ των οποίων και η κολυμβητική ικανότητα. Παρόλα αυτά, υπάρχουν πολύ λίγες δημοσιευμένες εργασίες σχετικά με το θέμα αυτό και μόνο δύο από αυτές εξειδικεύονται στην επίδραση του φύλου ή της ωοτοκίας στην κολυμβητική ικανότητα (James & Johnston, 1998; Plaut, 2002). Και από τις δύο αυτές μελέτες προκύπτουν σημαντικές διαφορές στην κολυμβητική ικανότητα των θηλυκών ατόμων κατά την περίοδο ωοτοκίας και μετά από αυτήν.

Στην παρούσα εργασία, παρατηρήθηκαν μικρές διαφορές στην κολυμβητική ικανότητα αρσενικών και θηλυκών ατόμων που μεγάλωσαν στους 25 και 28°C και στατιστικά σημαντικές διαφορές στα άτομα που μεγάλωσαν στους 31°C. Σε όλες τις περιπτώσεις τα αρσενικά διαπιστώθηκε ότι είναι ταχύτεροι κολυμβητές. Θα περίμενε κανείς, οι διαφορές στο μέγεθος και το σχήμα του σώματος μεταξύ των δύο φύλων να έπαιζαν σημαντικό ρόλο στην κολυμβητική τους ικανότητα. Όμως, στην περίπτωση του zebrafish, όπως φαίνεται και στα Αποτελέσματα, η RU_{crit} ήταν ανεξάρτητη από το μήκος και από όλους τους μορφομετρικούς χαρακτήρες που μετρήθηκαν στα δείγματα. Αυτό ίσως οφείλεται στο σχετικά στενό εύρος των TL που μελετήθηκε.

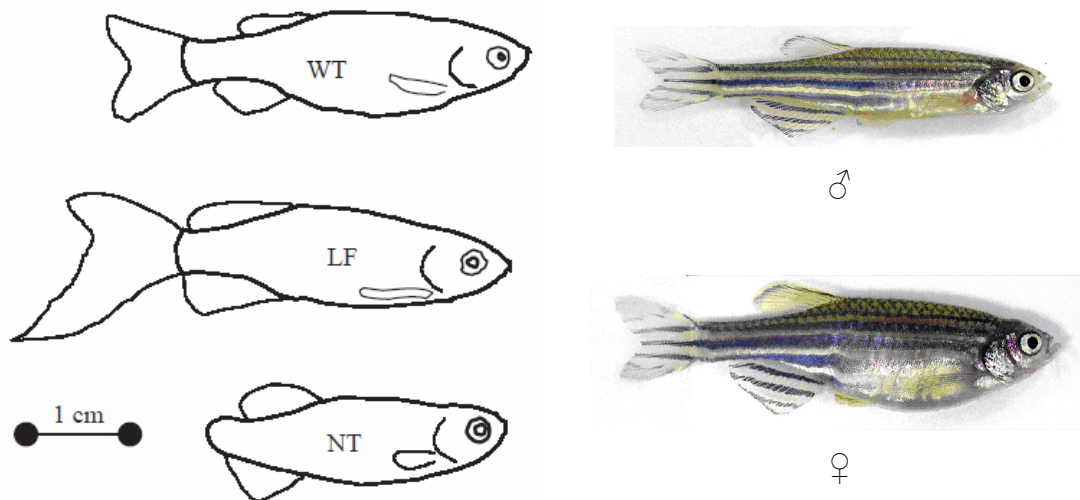


Ένα άλλο σημείο το οποίο παρουσιάζει ενδιαφέρον είναι ότι ενώ τα θηλυκά φαίνεται να μπορούν να διατηρήσουν μεγαλύτερα αποθέματα γαλακτικού οξέος στους μύες τους, εντούτοις εξαιτίας της αυξημένης προσπάθειας που καταβάλουν (σε σχέση με τα αρσενικά) εξουθενώνονται σε χαμηλότερες ταχύτητες κολύμβησης. Η διαφορά αυτή, μπορεί να οφείλεται στην παρεμπόδιση της κίνησης που προκαλεί ο όγκος των αβγών που έχουν τα θηλυκά (λόγω μεγαλύτερης διατομής ή/και μικρότερης αναλογίας μυϊκής μάζας/μάζα σώματος), ή ακόμα στην επίδραση του όγκου αυτού στις ιδιότητες συστολής (contractile properties) του μυϊκού ιστού. Συγκεκριμένα, η αύξηση της περιφέρειας λόγω των αβγών, οδηγεί σε «τέντωμα» (stretching) των κοιλιακών μυών με αποτέλεσμα να μειώνεται η ικανότητα συστολής και άρα η παραγωγή ενέργειας για κίνηση (James & Johnston, 1998). Ενώ λοιπόν τα θηλυκά, από άποψη μεταβολισμού φαίνεται να είναι ικανά να επιτύχουν υψηλότερες κολυμβητικές επιδόσεις από τα αντίστοιχου μήκους αρσενικά, η ωοτοκία (ωοφορία) περιορίζει τις δυνατότητες τους και δεν τους επιτρέπει να αναπτύξουν ανάλογες επιδόσεις.

Από οικολογικής άποψης, το «κόστος της αναπαραγωγής» (cost of reproduction), ορίζεται σαν μια αντιστάθμιση μεταξύ της σημερινής και της μελλοντικής αναπαραγωγής (Magnhagen, 1991). Κατά την περίοδο ωοτοκίας, συμβαίνουν πολλές αλλαγές στο σώμα των θηλυκών ατόμων, που αφορούν στο σχήμα και το βάρος του σώματος, το χρωματισμό, την ορμονική κατάσταση και τις φυσικές συνθήκες (James & Johnston, 1998). Έχει προταθεί, ότι αυτές οι αλλαγές αυξάνουν τον κίνδυνο θήρευσης, με αποτέλεσμα το κόστος της αναπαραγωγής να είναι υψηλότερο (Magnhagen, 1991). Θα περίμενε λοιπόν κανείς, η μείωση της κολυμβητικής ικανότητας που εμφανίζουν τα θηλυκά, να αυξάνει ακόμα περισσότερο τον κίνδυνο θήρευσης. Παρόλα αυτά, η μειωμένη κολυμβητική ικανότητα που εμφανίζουν τα θηλυκά αν και επηρεάζει την ικανότητα απόκτησης τροφής, δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο θήρευσης καθώς η αποφυγή των θηρευτών, γίνεται με κολυμβήσεις γρήγορης εκκίνησης και εκτίναξης. Αυτού του είδους οι κινήσεις χρησιμοποιούν ενέργεια από τον αναερόβιο μεταβολισμό, που σύμφωνα με τον Plaut (2002), δεν επηρεάζεται από την ωοτοκία.

Η παρατηρούμενη στην εν λόγω εργασία διαφορά στην κολυμβητική ικανότητα μεταξύ αρσενικών και θηλυκών, θέτει ερωτήματα για την ακρίβεια των

αποτελεσμάτων προηγούμενων εργασιών που ασχολήθηκαν με την κολυμβητική ικανότητα στο zebrafish και παρέλειψαν να συμπεριλάβουν το φύλο των ατόμων μέσα στους παράγοντες που θα έπρεπε να ελεγχθούν κατά τον πειραματικό σχεδιασμό. Σε καμία από τις τρεις δημοσιευμένες μελέτες που αναφέρονται στην κολυμβητική ικανότητα ενήλικων zebrafish (Plaut & Gordon, 1994; Plaut, 2000; Widmer *et al.*, 2006), δεν γίνεται λόγος για το φύλο ή την αναλογία των φύλων και το στάδιο ωριμότητας στα άτομα που χρησιμοποιήσαν. Μάλιστα, σε σχέδιο από την εργασία του Plaut (2000) όπου απεικονίζονται οι τύποι ουράς των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν, το σχήμα του σώματος των ψαριών παραπέμπει σε θηλυκά άτομα (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Αριστερά: σχήμα σώματος των ατόμων που χρησιμοποίησε ο Plaut (2000). Δεξιά: Πραγματική φωτογραφία αρσενικού και θηλυκού zebrafish.

Η παρατηρούμενη διαφορά στην κολυμβητική ικανότητα αρσενικών και θηλυκών, είναι πιθανό να αυξάνεται όχι μόνο με αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης αλλά και με αύξηση της θερμοκρασίας κολύμβησης. Έτσι, λαμβάνοντας υπ' όψη ότι οι Plaut & Gordon (1994) και Plaut (2000) διεξήγαγαν τα πειράματά τους σε υψηλότερη θερμοκρασία κολύμβησης (28°C αντί για 26,5°C που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία) είναι πολύ πιθανό στη θερμοκρασία αυτή να αμβλύνεται ακόμα περισσότερο η διαφορά μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Έτσι, μία μικρή διαφορά στην αναλογία αρσενικών/θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τα πειράματα, μπορεί να είναι υπεύθυνη ή τουλάχιστον να έχει σημαντική επίδραση: α)



στην παρατηρούμενη διαφορά στην κολυμβητική ικανότητα μεταξύ αγρίου τύπου και κλωνοποιημένων zebrafish στην περίπτωση των Plaut & Gordon (1994), β) στη διαφορά ή στο μέγεθος της διαφοράς της κολυμβητικής ικανότητας ανάμεσα στα zebrafish με διαφορετικό τύπο ουράς στην περίπτωση του Plaut (2000) και γ) στις διαφορές ανάμεσα στα άτομα που μεγάλωσαν σε διαφορετικές συνθήκες συγκέντρωσης οξυγόνου στην περίπτωση των Widmer *et al.* (2006).

Θα ήταν λοιπόν πολύ ενδιαφέρον, να εξεταστεί στο μέλλον η διαφοροποίηση στην κολυμβητική ικανότητα αρσενικών και θηλυκών zebrafish σε διαφορετικές θερμοκρασίες κολύμβησης. Άλλες ενδιαφέρουσες προεκτάσεις στο εν λόγω θέμα, θα ήταν η σύγκριση των κολυμβητικών επιδόσεων μεταξύ θηλυκών ατόμων με αβγά και χωρίς αβγά (μετά από ωοτοκία ή striping), ο προσδιορισμός της επίδρασης της ωοτοκίας στην ποσότητα και το μέγεθος των μυϊκών ινών και στη σχετική κατανομή της μυϊκής μάζας στο σώμα και τέλος η μελέτη της πιθανής διαφορετικής επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην οντογένεση των μυών σε αρσενικά και θηλυκά zebrafish.



5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Η θερμοκρασία εκτροφής (22, 25, 28 και 31°C) είχε ξεκάθαρη επίδραση στην κολυμβητική ικανότητα των αρσενικών ατόμων, με τα άτομα των 22°C και τα άτομα των 31°C να επιτυγχάνουν τη χαμηλότερη και την υψηλότερη επίδοση αντίστοιχα.
2. Τα θηλυκά άτομα έμειναν ανεπηρέαστα από τη θερμοκρασία εκτροφής όσον αφορά στην κολυμβητική τους επίδοση.
3. Παρατηρήθηκε μια έντονη διαφοροποίηση μεταξύ των κολυμβητικών ικανοτήτων αρσενικών και θηλυκών, σε άτομα που αναπτύχθηκαν στους 31°C και μια μικρότερη διαφοροποίηση στα άτομα που αναπτύχθηκαν στους 25 και 28°C, με τα αρσενικά σε όλες τις περιπτώσεις να έχουν καλύτερη επίδοση. Τα αρσενικά και θηλυκά άτομα που αναπτύχθηκαν στους 22°C δεν εμφάνισαν ανάλογες διαφορές.
4. Η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος στους μύες μετά από εξουθενωτική άσκηση είναι κατά πολύ υψηλότερη από την αντίστοιχη σε κατάσταση ηρεμίας και στα δυο φύλα των τεσσάρων διαφορετικών πληθυσμών.
5. Τα θηλυκά εμφάνισαν μεγαλύτερες τιμές γαλακτικού οξέος μετά από εξουθένωση απ' ότι τα αρσενικά, στις περιπτώσεις των ατόμων που εκτράφηκαν στους 22 και 28°C.
6. Αντίθετα, η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος σε κατάσταση ηρεμίας, δεν διέφερε ανάμεσα σε αρσενικά και θηλυκά σε καμία από τις τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης που χρησιμοποιήθηκαν.



6. 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 Νευροβιολογία, Αναπτυξιακή Βιολογία και Γενετική. Παρόλα αυτά, μόνο πρόσφατα έχουν αρχίσει να μελετώνται διάφορα βασικά στοιχεία της βιολογίας και της οικολογίας του. Η κολυμβητική ικανότητα, αποτελεί ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό για την επιβίωση των ψαριών καθώς η μέγιστη τιμή της επηρεάζει σημαντικές πτυχές της ζωής τους όπως την απόκτηση τροφής, την εύρεση ταιριού και την αποφυγή των θηρευτών. Η θερμοκρασία ανάπτυξης και το φύλο, είναι δύο παράγοντες που έχουν αποδειχθεί πολύ σημαντικοί ως προς την επίδρασή τους στην κολυμβητική επίδοση. Έτσι στην παρούσα μελέτη, εξετάστηκε η επίδραση του φύλου στην κολυμβητική ικανότητα, σε zebrafish από διαφορετικές θερμοκρασίες εκτροφής.

Για το σκοπό αυτό, εκτράφηκαν συνολικά 4 πληθυσμοί σε διαφορετικές θερμοκρασίες νερού (22, 25, 28 και 31°C) και στη συνέχεια αφού εγκλιματίστηκαν όλοι σε μία κοινή θερμοκρασία (26,5°C), υποβλήθηκαν σε ασκήσεις κολύμβησης με σκοπό την εύρεση της μέγιστης κρίσιμης σχετικής ταχύτητας (RU_{crit}) για κάθε περίπτωση. Επίσης, επειδή η συσσώρευση του γαλακτικού οξέος στους μύες καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα κολύμβησης, η εργασία πλαισιώθηκε από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες πριν και μετά από εξουθενωτική άσκηση.

Η θερμοκρασία ανάπτυξης φαίνεται να επιδρά στην κολυμβητική ικανότητα μόνο στην περίπτωση των αρσενικών ατόμων, με τα άτομα των 22 °C να εμφανίζουν στατιστικά χαμηλότερη επίδοση από τα άτομα των 31°C. Τα αποτελέσματα εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε αρσενικά και θηλυκά που αναπτύχθηκαν στους 31°C, με τα αρσενικά να επιτυγχάνουν καλύτερη επίδοση. Η διαφορά αυτή δεν μπορεί να εξηγηθεί από μεταβολικής σκοπιάς, καθώς με βάση τα αποτελέσματα της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος στους μύες, τα θηλυκά φαίνονται ικανά για μεγαλύτερες επιδόσεις. Έτσι, η διαφοροποίηση της κολυμβητικής ικανότητας μπορεί τελικά να αποδοθεί είτε στην άμεση επίδραση του επιπλέον όγκου των αβγών που έχουν τα θηλυκά και το σχετικό εμπόδιο στην κίνηση



που αυτός ο όγκος προκαλεί (λόγω μεγαλύτερης διατομής ή/και μικρότερης αναλογίας μυϊκής μάζας/μάζα σώματος), ή στην έμμεση επίδραση αυτού στις ιδιότητες συστολής (contractile properties) του μυϊκού ιστού.

Ενδιαφέρουσες προεκτάσεις στο θέμα αυτό, θα ήταν η σύγκριση κολυμβητικών επιδόσεων μεταξύ θηλυκών ατόμων πριν και μετά την ωοτοκία, η μελέτη της επίδρασης της ωοτοκίας στην ποσότητα και το μέγεθος των μυϊκών ινών και στη σχετική κατανομή της μυϊκής μάζας στο σώμα των θηλυκών και τέλος να εξετασθεί αν υπάρχει διαφορετική επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην οντογένεση των μυών ανάμεσα στα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα.



7. ABSTRACT

Zebrafish is a small, colourful, tropical fish inhabiting 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. Even though, only recently did the researchers start to examine the basic aspects of its biology and ecology. It is widely known that swimming performance is a very important characteristic for fish survival, as it can affect food capture, mating success and the escape from predators. Developmental temperature and sex are two well known factors that strongly affect swimming capacity of fish. Therefore, in the present study, the effect of sex in the swimming performance of zebrafish reared in different temperatures was examined.

For this purpose, 4 populations were reared in different water temperatures (22, 25, 28 and 31°C) and after being acclimatized in a common temperature (26.5°C) for over a month, they were subjected to swimming exercises in order to evaluate the maximum relative critical velocity (RU_{crit}) in each case. Moreover, as the accumulation of the lactate in fish muscles defines at a great extent their exercise ability, the muscle lactate concentrations before and after exhaustive exercise were also measured.

Rearing temperature seems to affect swimming capacity only in the case of male zebrafish, as the fish that were reared in 22°C showed statistically significant lower performance than the ones reared in 31°C. Furthermore, the results showed statistically significant differences between males and females that were reared in 31°C, where the males turned out to be faster swimmers. This differentiation cannot be explained from a metabolic aspect, because as the measurements of the muscle lactate concentrations revealed, the females seem capable of higher performances. Therefore, the observed difference in swimming capacity is probably due to the added mass of eggs and its associated drag (due to larger girth and/or lower muscle power to body mass ratio), or the changes in the contractile properties of the muscles.

In order to shed more light in this subject, future work could include comparing swimming performances of female zebrafish before and right after spawning, studying the effect of pregnancy on quantity and size of muscle fibres and



the relative distribution of muscle tissue in fish body and examining if the temperature affects differently the ontogeny of muscle in males and females.



8. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams S. R. and Parsons G. R. (1998).** Laboratory-based measurements of swimming performance and related metabolic rates of field-sampled smallmouth buffalo (*Ictiobus bubalus*): a study of seasonal changes. *Physiol. Zool.* 71(4), 350-358.
- Altringham J. D. and Ellerby D. J. (1999).** Fish swimming: patterns in muscle function. *J. Exp. Biol.* 202, 3397-3403.
- Amsterdam A. and Hopkins N. (2006).** Mutagenesis strategies in zebrafish for identifying genes involved in development and disease, *Trends Genet.* 22, 473-478.
- Arunachalam M., Johnson J. A., Sathyanarayanappa S. N., Sankaranarayanan A. and Soranam R. (2000).** Cultivable and ornamental fishes from Hemavathi and Ekachi rivers, South Karnataka. p. 226-227. *In* Endemic fish diversity of Western Ghats (ed. A. G. Ponniah and A. Gopalakrishnan), NBFGR-NATP Publication, National Bureau of Fish Genetic Resources, Lucknow, U.P., India, p. 1347.
- Axelrod H., Emmens C., Burgess W. and Pronek N. (1986).** Exotic tropical fishes. Fourth expanded edition. T. F. H. Publications Inc., United States, p.428.
- Barman R. P. (1991).** A taxonomic revision of the Indo-Burmese species of *Danio rerio*. *Rec. Zool. Surv. India, Misc. Publ., Occas. Pap.* 137, 1-91.
- Barnett C. W. and 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.
- 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. (1978).** Swimming capacity. *In* Fish Physiology, vol. VII (ed. Randall W. S. and Hoar D. J.), Academic Press, New York, p. 101-187.
- Beamish F. W. H., Howlett J. C. and Medland T. E. (1989).** Impact of diet on metabolism and swimming performance in juvenile lake trout, *Salvelinus*



- namaycush*. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 46, 384-388. In Hammer C. (1995). Fatigue and exercise tests with fish. Comp. Biochem. Physiol. A 112, 1-20.
- Beaumont M. W., Butler P. J. and Taylor E. W. (2000).** Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water: effects upon muscle metabolism and membrane potential. Aq. Toxicol. 51, 259-272.
- Berman J., Hsu K. and Look A. T. (2003).** Zebrafish as a model organism for blood diseases. Br. J. Haematol. 123, 568-576.
- Blaxter J. H. S. (1992).** The effect of temperature on larval fishes. Neth. J. Zool. 42, 336-357.
- Bone Q. (1978).** Locomotor muscle. In Fish Physiology, vol. VII (ed. W. S. Randall and D. J. Hoar), Academic Press, New York, p. 101-187.
- Bone Q., Kiceniuk J. and Jones D. R. (1978).** On the role of different fiber types in fish myotomes at intermediate swimming speeds. Fish. Bull. 76, 691-699.
- Brett J. R. (1964).** The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. J. Fish. Res. Bd. Can. 21, 1183-1226. In Hammer C. (1995). Fatigue and exercise tests with fish. Comp. Biochem. Physiol. A 112, 1-20.
- Brett J. R. (1965).** The relation of size to rate of oxygen consumption and sustained swimming speed of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). J. Fish. Res. Bd. Can. 22, 1491-1501. In Beamish F. W. H. (1978). Swimming capacity. In Fish Physiology, vol. VII (ed. W. S. Randall and D. J. Hoar), Academic Press, New York, p. 101-187.
- Brett J. R. and Glass N. R. (1973).** Metabolic rates and critical swimming speeds of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) in relation to size and temperature. J. Fish. Res. Bd. Can. 30, 379-387. In Hammer C. (1995). Fatigue and exercise tests with fish. Comp. Biochem. Physiol. A 112, 1-20.
- Budick S. A. and O'Malley D. M. (2000).** Locomotor repertoire of larval zebrafish: swimming, turning and prey capture. J. Exp. Biol. 203, 2565-2579.
- Cabral H. N., Marques J. F., Rego A. L., Catarino A. I., Figueiredo J., and Garcia J. (2003).** Genetic and morphological variation of *Synaptura lusitanica* Capello, 1868, along the Portuguese coast. J. Sea Res. 50, 167-175.
- Chen E. and Ekker S. C., 2004.** Zebrafish as a genomics research model. Current Pharmaceutical Biotechnology 5(5), 409-13.



- Dahlenberg M. L., Shumway D. L. and Doudoroff P. (1968).** Influence of dissolved oxygen and carbon dioxide on swimming performance of largemouth bass and coho salmon. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 25, 49-70. *In* Hammer C. (1995). Fatigue and exercise tests with fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 112, 1–20.
- Daniels R. J. R. (2002).** Freshwater fishes of peninsula India. Universities Press, Hyderabad.
- Dickson K. A., Donley J. M., Sepuldeva C. and Bhoopat L. (2002).** Effects of temperature on sustained swimming performance and swimming kinematics of the chub mackerel *Scomber japonicus*. *J. Exp. Biol.* 205, 969-980.
- Diekmann M., Hultch V. and 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. *Aq. Toxicol.* 68, 13-26.
- Drücker E. G. (1996).** The use of gait transition speed in comparative studies of fish locomotion. *Am. Zool.* 36, 555-566.
- Engeszer R. E., Patterson L. B., Rao A. A. and Parichy D. M. (2008).** Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4(1), 21-40.
- Ensenbach U. and Nagel R. (1995).** Toxicity of complex chemical mixtures: acute and long-term effects on different life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30, 151-157.
- Fanouraki E., Divanach P. and Pavlidis M. (2007).** Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture* 265, 294-304.
- Franklin C. E., Wilson R. S. and Davison W. (2003).** Locomotion at -1.0 °C: burst swimming performance of five species of Antarctic fish. *J. Therm. Biol.* 28, 59-65.
- Froese, R. and D. Pauly (eds.) (2008).** FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (07/2008).
- Fuiman L. A. and Batty R. S. (1997).** What a drag it is getting cold: partitioning the physical and physiological effects of temperature on fish swimming. *J. Exp. Biol.* 200, 1745-1755.



- Fukuhara O. (1990).** Effects of temperature on yolk utilization, initial growth and behaviour of unfed marine fish-larvae. *Mar. Biol.* 106, 169-174.
- Gerhard G. S. (2003).** Comparative aspects of zebrafish (*Danio rerio*) as a model for aging research. *Exp. Gerontol.* 38, 1333-1341.
- Gerhard G. S. and 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. *Behav. Genet.* 33(5), 461-468.
- Gibson S. and Johnston I. A. (1995).** Temperature and development in larvae of the turbot *Scophthalmus maximus*, *Mar. Biol.* 124, 17-25.
- Goldsmith P. and Harris W. A. (2003).** The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders. *Semin. Cell & Dev. Biol.* 14, 11-18.
- Gutter A. S. and 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*. *J. Fish Biol.* 57, 391-401.
- Guderley H. (2004).** Locomotor performance and muscle metabolic capacities: Impact of temperature and energetic status. *Comp. Biochem. Physiol. B* 139, 371-382.
- Hammer C. (1995).** Fatigue and exercise tests with fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 112, 1-20.
- Herzig A. and Winkler H. (1986).** The influence of temperature on the embryonic development of three cyprinid fishes, *Abramis brama*, *Chalcalburnus chalcoides mento* and *Vimba vimba*. *J. Fish Biol.* 28, 171-181.
- Howard T. E. (1975).** Swimming performance of juvenile coho salmon (*Uncorhynchus kisutch*) exposed to bleached kraft pulpmill effluent. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 32, 789-793.
- Howes G. J. (1991).** Systematics and biogeography: an overview In *Cyprinid fishes systematics, biology and exploitation.* (eds. I. J. Winfield and J. S. Nelson), Chapman and Hall, London, UK, p. 1–33.
- Ingham P. W. (1997).** Zebrafish genetics and its implications for understanding vertebrate development. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1755-1760.



- Integrated Taxonomic Information System (2008).** ITIS. World Wide Web electronic publication. www.itis.gov.
- James R. S. and Johnston I. A. (1998).** The influence of spawning on swimming performance and muscle contractile properties in the short-horn sculpin. *J. Fish Biol.* 53, 485-501.
- Johnston I. A. (1981).** Structure and function of fish muscles. *Symp. Zool. Soc. Lond.* 48, 71–113.
- Johnston I. A. (1993).** Temperature influences muscle differentiation and the relative timing of organogenesis in herring (*Clupea harengus*) larvae. *Mar. Biol.* 116, 363-379.
- Johnston I. A. (2006).** Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *J. Exp. Biol.* 209, 2249-2264.
- Jones D. R. (1982).** Anaerobic exercise in teleost fish. *Can. J. Zool.* 60, 1131-1134. *In* Hammer C. (1995). Fatigue and exercise tests with fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 112, 1-20.
- Jones D. R., Kiceniuk J. W. and Bamford O. S. (1974).** Evaluation of the swimming performance of several fish species from the MacKenzie River. *J. Fisher. Res. Bd. Can.* 31, 1641-1647. *In* Plaut I. (2001). Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comp. Biochem. Physiol. A* 131, 41-50.
- Key B. and Devine C. A. (2003).** Zebrafish as an experimental model: strategies for developmental and molecular neurobiology studies. *Methods Cell Sci.* 25, 1-6.
- Kieffer J. D. (2000).** Limits to exhaustive exercise in fish. *Comp. Biochem. Physiol. A* 126, 161-179.
- Kimmel C. B. (1989).** Genetics and early development of zebrafish. *Trends Genet.* 5, 283-288.
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullman B. and Schilling T. F. (1995).** Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203, 253-310.
- Korsmeyer K. E., Dewar H., Lai N. C. and Graham J. B. (1996).** Tuna aerobic swimming performance: physiological and environmental limits based on oxygen supply and demand. *Comp. Biochem. Physiol. B* 113, 45-56.



- Koumoundouros G., Divanach P. and Kentouri M. (1999).** Ontogeny and allometric plasticity of *Dentex dentex* (Osteichthyes, Sparidae) in rearing conditions. *Mar. Biol.* 135, 561-572.
- Koumoundouros G., Divanach P., Anezaki L. and Kentouri M., (2001a).** Temperature induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Mar. Biol.* 139, 817-830.
- Koumoundouros G., Divanach P. and 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., Sfakianakis D. G., Divanach P. and Kentouri M. (2002a).** Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles. *J. Fish Biol.* 60, 923-932.
- Koumoundouros G., Pavlidis M., Anezaki L., Kokkari C., Steriotti A., Divanach P. and Kentouri M. (2002b).** Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase. *J. Exp. Zool.* 292, 573-579.
- Kutty M. N. (1968).** Influence of ambient oxygen on the swimming performance of goldfish and rainbow trout. *Can. J. Zool.* 46, 647-653. *In* Beamish F. W. H. (1978). *Swimming capacity. In Fish Physiology*, vol. VII (ed. Randall W. S. and Hoar D. J.), Academic Press, New York, p. 101-187.
- Laale H. W. (1977).** The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *J. Fish Biol.* 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. and Essner J. J. (2004).** Expression of VE-cadherin in zebrafish embryos: a new tool to evaluate vascular development. *Dev. Dyn.* 231, 204-213.
- Lawrence C. (2007).** The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269, 1-20.
- Lein I., Holmefjord I. and 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. and Linney E. (2004).** Developmental chorpyrifos effects on hatchling zebrafish swimming behavior. *Neurotoxicol. Teratol.* 26, 719-723.
- Lindsey C. C. (1988).** Factors controlling meristic variation. *In Fish Physiology*, Vol. XIA (ed. Randall W. S. and Hoar D. J.), Academic Press, New York, p.197–274.
- Maderspracer F. and Nüsslein-Volhard C. (2003).** Formation of the adult pigment pattern in zebrafish requires leopard and obelix dependent cell interactions. *Development* 130, 3447-3457.
- Magnhagen C. (1991).** Predation risk as a cost of reproduction. *Trends Ecol. Evol.* 6, 183-185.
- Malek R. L., Sajadi H., Abraham J., Grundy M.A. and Gerhard G. S. (2004).** The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C* 138, 363-373.
- Martinez M., Guderlay H., Dutil J. D., Winder P. D., He P. and Walsh S. J. (2002).** Condition, prolonged swimming performance and muscle metabolic capacities of cod *Gadus morhua*. *J. Exp. Biol.* 206, 503-511.
- Menon A. G. K. (1999).** Check list - fresh water fishes of India. p. 234-259. *Rec. Zool. Surv. India, Misc. Publ., Occas. Pap.* 175, 366.
- Mills D. and Vevers G. (1989).** The Tetra encyclopedia of freshwater tropical aquarium fishes. Tetra Press, New Jersey, p. 208.
- Neilson A. H., Allard A. S., Fischer S., Malberg M. and Victor T. (1990).** Incorporation of subacute test with zebrafish into a hierarchical system of evaluating the effect of toxicants in the aquatic environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30, 54-62.
- Ojanguren A. F. and Brana F. (2000).** Thermal dependence of swimming endurance in juvenile brown trout. *J. Fish Biol.* 56, 1342-1347.
- Pakkasmaa S. and Piironen J. (2001).** Morphological differentiation among local trout (*Salmo trutta*) populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 72, 231-239.
- Pavlidis M., Koumoundouros G., Sterioti A., Somarakis S., Divanach P. and Kentouri M. (2000).** Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J. Exp. Biol.* 287, 225-232.



- Petr T. (1999).** Coldwater fish and fisheries in Bhutan, p. 6-12. *In* (ed.) Fish and fisheries at higher altitudes: Asia. FAO Fish (ed. Petr T.), Tech. Pap. No. 385. FAO, Rome. p. 304.
- Plaut I. (2000).** Effects of fin size in swimming performance, swimming behaviour and routine activity of zebrafish *Danio rerio*. *J. Exp. Biol.* 203, 813-820.
- Plaut I. (2001).** Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comp. Biochem. Physiol. A* 131, 41-50.
- Plaut I. (2002).** Does pregnancy affect swimming performance of female Mosquitofish, *Gambusia affinis*? *Funct. Ecol.* 16, 290-295.
- Plaut I. and Gordon M. (1994).** Swimming metabolism of wild-type and cloned zebrafish *Brachydanio rerio*. *J. Exp. Biol.* 194, 209-223.
- Polo A., Yufera M. and Pascual E. (1991).** Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 92, 367-375.
- Popper A. N. and Coombs S. (1980).** Auditory mechanisms in teleost fishes. *American Scientist* 68, 429-440.
- Pritchard V. L., Lawrence J., Butlin R. K. and Krause J. (2001).** Shoal choice in zebrafish, *Danio rerio*: the influence of shoal size and activity. *Anim. Behav.* 65, 1085-1088.
- Randall D. J. and Tsui T. K. N. (2002).** Ammonia toxicity in fish. *Mar. Poll. Bull.* 45, 17-23.
- Reidy S. P., Kerr S. R. and Nelson J. A. (2000).** Aerobic and anaerobic swimming performance of individual Atlantic cod. *J. Exp. Biol.* 203, 347-357.
- Riehl R. and Baensch H. A. (1991).** *Aquarien Atlas. Band. 1.* Melle: Mergus, Verlag für Natur- und Heimtierkunde, Germany, p.992.
- Sandford G. (2003).** *Aquarium Owner's Manual.* Doring Kinderslay Limited, London, p.66.
- Sfakianakis D. G., Koumoundouros G. and Kentouri M. (2008).** Effect of temperature on muscle lactate metabolic recovery in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) juveniles exposed to exhaustive exercise [submitted].
- 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 J. Mar. Sci. 60, 1352-1360.
- Spence R., Gerlach G., Lawrence C. and Smith C. (2008).** The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. Biol. Rev. 83(1), 13-34.
- Sprague J. B. and Fogels A. (1977).** Watch the Y in bioassay. *In*: Proceedings of 3rd Aquatic Toxicity Workshop, Halifax, N.S., November 2-3, 1976. Environmental Protection Service Technical Report No. EPS-5-AR-77-1, Halifax, Canada.
- Steffensen J. F. and Farrell A. P. (1998).** Swimming performance, venous oxygen tension and cardiac performance of coronary-ligated Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to progressive hypoxia. Comp. Biochem. Physiol. A 119, 585-592.
- Swanson C., Baxa D. V., Young P. S., Cech J. J. Jr. and Hedrick R. P. (2002).** Reduced swimming performance in delta smelt infected with *Mycobacterium* spp. J. Fish Biol. 61, 1012-1020.
- Talwar P. K. and Jhingran A. G. (1991).** Inland fishes of India and adjacent countries. Volume 1. (ed. A.A. Balkema), 541, Rotterdam, Netherlands.
- Tiernay K. B. and Farrell A. P. (2004).** The relationships between fish health, metabolic rate, swimming performance and recovery in return-run sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka* (Walbaum). J. Fish Diseases 27, 663-671.
- Trede N. S., Langenau D. M., Traver D., Look T. and Zon L. I. (2004).** The use of zebrafish to understand immunity. Immunity 20, 367-379.
- Tudela S. (1999).** Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. Fisheries Res. 42, 229-243.
- Turan C. (2004).** Stock identification of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) using morphometric and meristic characters. ICES J. Mar. Sci. 61, 774-781.
- Valdesalici S. and Cellerino A. (2003).** Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. Proc. R. Soc. Lond. B (Supp. 1).
- Von Herbing H. (2002).** Effects of temperature on larval fish swimming performance: the importance of physics to physiology. J. Fish Biol. 61, 865-876.



- Wagner G. N., Balfry S. K., Higgs D. A., Lall S. P. and Farrell A. P. (2004).** Dietary fatty acid composition affects the repeat swimming performance of Atlantic salmon in seawater. *Comp. Biochem. Physiol. A* 137, 567-576.
- Wakefield A. M., Cunjak R. A. and Kieffer J. D. (2004).** Metabolic recovery in Atlantic salmon fry and parr following forced activity. *J. Fish Biol.* 65, 920-932.
- Webb P. W. (1971).** The swimming energetics of trout II. Oxygen consumption and swimming energetics. *J. Exp. Biol.* 55, 521-540.
- Welcomme R. L. (1988).** International introductions of inland aquatic species. FAO Fisheries Technical Paper 294, 318.
- Westerfield M. (1995).** The Zebrafish Book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*), 3rd ed. University of Oregon Press, Eugene, OR.
- Wicks B. J., Joensen R., Tang Q. and 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. *Aq. Toxicol.* 59, 55-69.
- Widmer S., Moore F. B. -G. and Bagatto, B. (2006).** The effects of chronic developmental hypoxia on swimming performance in zebrafish. *J. Fish Biol.* 69(6), 1885-1891.
- Wieser W. and Kauffman R. (1998).** A note on interactions between temperature, viscosity, body size and swimming energetics in fish larvae. *J. Exp. Biol.* 201, 1369-1372.
- Wilkes D., Xie S. Q., Stickland N. C., Alami-Durante H., Kentouri M., Steriotti A., Koumoundouros G., Fauconneau B. and 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*). *J. Exp. Biol.* 204, 2763-2771.
- Wilkinson R. J., Paton N. and 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.
- Williams I. V. and Brett J. R. (1987).** Critical swimming speed of Fraser and Thompson River pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Can. J. Fish. Aquat.*



- Sci. 44, 348-356. In Hammer C. (1995). Fatigue and exercise tests with fish. Comp. Biochem. Physiol. A 112, 1-20.
- Wilson R.S., Kuchel L. J., Franklin C. E. and Davison W. (2002).** Turning up the heat on subzero fish: thermal dependence of sustained swimming in an Antarctic notothenioid. J. Therm. Biol. 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). J. Exp. Biol. 90, 361-364.
- Wood C. M. (1991).** Acid-base and ion balance, metabolism, and their interactions, after exhaustive exercise in fish. J. Exp. Biol. 160, 285-308.
- Yoder J. A., Nielsen M. E., Amemiya C. T. and 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.
- Καρκάνα Μ. (2003).** Ο ρόλος των περιβαλλοντικών και διαχειριστικών παραγόντων στη ρύθμιση του χρώματος του δέρματος του φαγκριού (*Pagrus pagrus*). Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.
- Λάγκη Α. (2005).** Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στις σκελετικές παραμορφώσεις και στους μεριστικούς χαρακτήρες στο zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822). Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.
- Λέρης Ι. (2006).** Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη διαφοροποίηση του σχήματος του σώματος στο zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822). Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.
- Νεοφύτου Μ. (2003).** Φαινοτυπική διαφοροποίηση του zebrafish (*Danio rerio*, Hamilton 1822) ως προς το φύλο και τις μορφοανατομικές ανωμαλίες. Διπλωματική εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας.