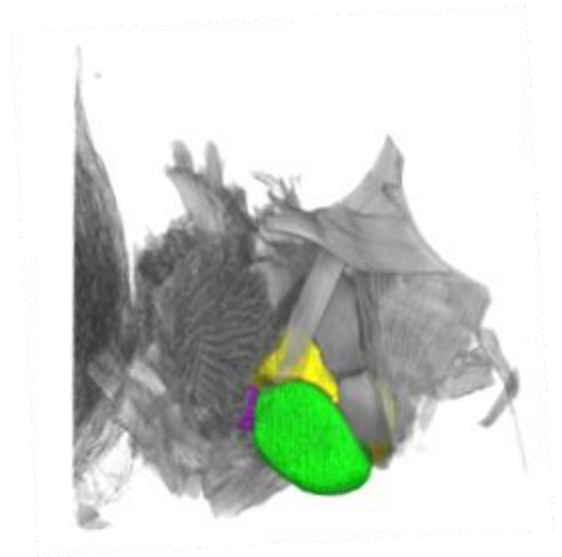


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην καρδιά, στην κολυμβητική ικανότητα και στη γονιμότητα του zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822)



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΝΑΤΑΣΑ ΔΗΜΗΤΡΙΑΔΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

Επιβλέπων Καθηγητής

Κουμουνδούρος Γεώργιος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κουμουνδούρος Γεώργιος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Μπέης Δημήτρης (Ερευνητής Γ', ΙΙΒΕΑΑ)

Σωμαράκης Στυλιανός (Διευθυντής Ερευνών, ΕΛΚΕΘΕ)

Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κουμουνδούρος Γεώργιος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Μπέης Δημήτρης (Ερευνητής Γ', ΙΙΒΕΑΑ)

Σωμαράκης Στυλιανός (Διευθυντής Ερευνών, ΕΛΚΕΘΕ)

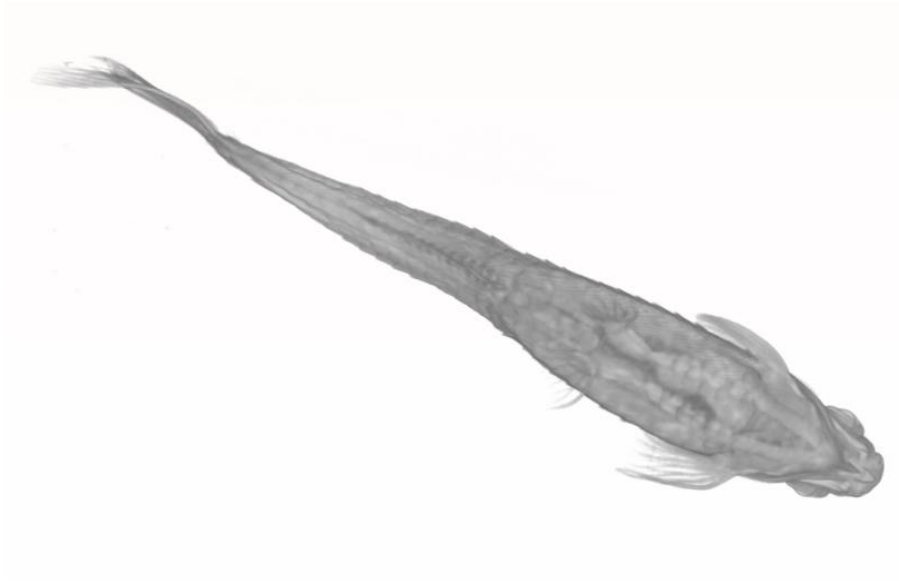
Στεργίου Κωνσταντίνος (Διευθυντής ΙΘΑΒΙΠΕΥ, ΕΛΚΕΘΕ)

Παυλίδης Μιχαήλ (Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Καρακάσης Ιωάννης (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Κεντούρη Μαρουδιώ (Καθηγήτρια, Πανεπιστήμιο Κρήτης)





Στους γονείς μου

τους φίλους μου

σε όσους με στήριξαν με το δικό τους τρόπο

Πρόλογος

«Μέχρις ότου η κοινωνία μπορέσει να ανακτηθεί από μια αδιάσπαστη ανθρωπότητα που θα χρησιμοποιήσει τη συλλογική της σοφία, τα πολιτιστικά της επιτεύγματα, τις τεχνολογικές καινοτομίες, την επιστημονική γνώση και την έμφυτη δημιουργικότητα προς όφελός της και προς όφελος της φύσης, όλα τα οικολογικά προβλήματα θα έχουν τις ρίζες τους στα κοινωνικά προβλήματα»

Murray Bookchin

Η παρούσα διδακτορική διατριβή επιχειρεί να διερευνήσει την πλαστικότητα ενός θαλάσσιου οργανισμού – μοντέλου, του zebrafish, σε μια προσπάθεια ευρύτερης κατανόησης της απόκρισης των οργανισμών έναντι της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Η εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Θαλάσσιας Βιολογίας - Βιολογίας Ιχθύων του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Όλα τα πειραματικά πρωτόκολλα πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με την Ελληνική (Οδηγία 63/2010) και Ευρωπαϊκή (Οδηγία 63/2010) νομοθεσία σχετικά με την καλή διαβίωση των ζώων. Όλα τα πρωτόκολλα εγκρίθηκαν από την Επιτροπή Περιφερειακής Φροντίδας Ζώων (Αριθμός Άδειας: 3628/17).

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γεώργιο Κουμουνδούρο για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθώς και για την αστείρευτη βοήθεια που μου προσέφερε καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής. Η άριστη συνεργασία μας μου έδωσε όλα τα απαραίτητα εφόδια για την περαιτέρω ενσωμάτωσή μου στη μετέπειτα ερευνητική σφαίρα.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον Dr. Dominique Adriaens για όλη την απαραίτητη εκπαίδευση που μου προσέφερε για τη δισδιάστατη και τρισδιάστατη ανάλυση των δειγμάτων, η οποία έλαβε μέρος στο πανεπιστήμιο της Γάνδης (Βέλγιο) στο εργαστήριο Εξελικτικής Μορφολογίας Σπονδυλωτών. Χωρίς τις γνώσεις και την καθοδήγησή του η εργασία αυτή δεν θα μπορούσε να φτάσει τόσο γρήγορα στο τέλος της. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον κ. Δημήτρη Μπέη, μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση που μου προσέφερε για την επιτυχή διεξαγωγή των πειραμάτων μελέτης της γονιδιακής έκφρασης τα οποία πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Αναπτυξιακής Βιολογίας της Ακαδημίας Αθηνών. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Στέλιο Σωμαράκη, μέλος της συμβουλευτικής μου επιτροπής, για την καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε και αυτός με τη σειρά του όλο αυτό τον καιρό εκπόνησης της παρούσας διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Μαντώ Αγάλου μεταδιδακτορική ερευνήτρια του εργαστηρίου Αναπτυξιακής Βιολογίας της Ακαδημίας Αθηνών για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε ώστε να βγουν εις πέρας οι γονιδιακές αναλύσεις, καθώς και την Εριφύλη Γιαγαρά, προπτυχιακή φοιτήτρια του εργαστηρίου Θαλάσσιας Βιολογίας για την πολύτιμη βοήθεια της στα πειράματα κολύμβησης. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τα παιδιά του εργαστηρίου, έναν προς έναν, για τη συνεργασία και συμβίωση που είχαμε τόσο καιρό στο ίδιο εργασιακό χώρο. Κλείνοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και στους δικούς μου ανθρώπους για την καθημερινή τους στήριξη ώστε να βγει όλο αυτό εις πέρας.

Περιεχόμενα

I. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	9
II. ABSTRACT	12
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Φαινοτυπική πλαστικότητα	15
1.1.1 Πρότυπα αντίδρασης (reaction norms)	16
1.1.2 Είδη πλαστικών αποκρίσεων	17
1.1.3 Ο ρόλος της φαινοτυπικής πλαστικότητας στην εξέλιξη των ειδών	20
1.1.3.1 «Προγνωστικότητα» φαινοτυπικής πλαστικότητας	20
1.1.3.2 Επιγενετική και γενετική αφομοίωση	21
1.2 Πλαστικότητα στα ψάρια και θερμοκρασία ανάπτυξης	22
1.3 Το zebrafish ως οργανισμός «μοντέλο» μελέτης της φαινοτυπικής πλαστικότητας	24
1.3.1 Η οντογένεση του zebrafish	25
1.3.2 Ο καθορισμός του φύλου και ο φυλετικός διμορφισμός στο zebrafish	29
1.3.3 Θερμοκρασιακή πλαστικότητα του zebrafish	31
1.4 Η καρδιά των τελεόστεων	33
1.4.1 Η δομή της κοιλίας και του αορτικού βολβού στο zebrafish	34
1.4.2 Οντογένεση της καρδιάς στο zebrafish	35
1.4.3 Πλαστικές αποκρίσεις της καρδιάς στους τελεόστεους	39
1.5 Κολύμβηση ιχθύων και θερμοκρασία	40
1.6 Αναπαραγωγή ιχθύων και περιβαλλοντικοί παράγοντες	42
1.7 Στόχοι εργασίας	43
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
2.1 Πρώτο πείραμα: Επίδραση θερμοκρασίας ανάπτυξης στο ρυθμό αύξησης, την πλαστικότητα καρδιάς, τη γονιδιακή έκφραση και τη γονιμότητα του zebrafish	45
2.1.1 Βασικός πειραματικός σχεδιασμός	45
2.1.2 Σύσταση και διατήρηση των πειραματικών πληθυσμών	46
2.1.3 Επίδραση θερμοκρασίας ανάπτυξης στο ρυθμό αύξησης του zebrafish	48
2.1.3.1 Δειγματοληψίες και μέτρηση του μήκους των ψαριών	48
2.1.3.2 Εκτίμηση του ρυθμού αύξησης	49
2.1.4 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην πλαστικότητα της καρδιάς του zebrafish	50

2.1.4.1 Λήψη και προετοιμασία δειγμάτων	50
2.1.4.2 Μικροτομογραφία	52
2.1.4.2.1 Micro-CT απεικόνιση (micro-CT imaging)	52
2.1.4.2.2 Μετρήσεις σχήματος και όγκου	54
2.1.4.2.3 Υπολογισμός σχετικού όγκου μυοκαρδίου κοιλίας	55
2.1.4.2.4 Υπολογισμός της γωνίας του αρτηριακού βολβού και της κοιλίας	56
2.1.4.2.5 Fourier ανάλυση του σχήματος της κοιλίας	57
2.1.5 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων ιχθύδιων zebrafish	58
2.1.5.1 Λήψη και προετοιμασία των δειγμάτων	58
2.1.5.2 Εξαγωγή RNA, σύνθεση cDNA και Real-Time PCR	59
2.1.6 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη γονιμότητα του zebrafish	61
2.1.7 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων	63
2.2 Δεύτερο πείραμα: Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην κολυμβητική ικανότητα του zebrafish	64
2.2.1 Βασικός πειραματικός σχεδιασμός και σύσταση πειραματικών πληθυσμών	64
2.2.2 Μέτρηση κολυμβητικής ικανότητας	66
2.2.3 Ανάλυση του σχήματος σώματος ιχθύδιων και ενήλικων zebrafish	68
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1. Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην αύξηση του zebrafish	70
3.2 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην πλαστικότητα της καρδιάς του zebrafish	73
3.2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχήμα της καρδιάς του zebrafish	73
3.2.2 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στον όγκο της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού του zebrafish	76
3.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχετικό όγκο του μυοκαρδίου κοιλίας	78
3.2.4 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη μεταβολή της γωνίας του αρτηριακού βολβού και στη γωνία της κοιλίας	80
3.2.5 Πρότυπα ανάπτυξης των μορφομετρικών δεικτών της καρδιάς και σχέσεις αλλομετρίας μεταξύ τους	83
3.2.5.1 Διαφοροποίηση του προτύπου ανάπτυξης των μορφομετρικών δεικτών ανάλογα με τη θερμοκρασία και το φύλο	83

3.2.5.2 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην αλλομετρική αύξηση της καρδιάς του zebrafish	87
3.2.6 Fourier ανάλυση του σχήματος της κοιλίας	92
3.3. Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη γονιδιακή έκφραση των ιχθύδιων zebrafish	96
3.4. Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην κολυμβητική ικανότητα του zebrafish	98
3.4.1 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην ταχύτητα κολύμβησης	98
3.4.2 Επίδραση θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχήμα σώματος του zebrafish	100
3.5. Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη γονιμότητα του zebrafish	104

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Αναπτυξιακή πλαστικότητα της καρδιάς του zebrafish	107
4.2 Φυλετικός διμορφισμός της καρδιάς στο zebrafish	111
4.3 Φαινοτυπική πλαστικότητα και φυλετικός διμορφισμός της κολυμβητικής ικανότητας	113
4.4 Μηχανισμοί εγκαθίδρυσης πλαστικότητας της καρδιάς στο zebrafish	117
4.5 Θερμοκρασιακή πλαστικότητα των αναπαραγωγικών χαρακτήρων στο zebrafish	121
4.6 Σημασία των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας για τους φυσικούς πληθυσμούς	123

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	126
-----------------------	-----

III. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	128
-------------------------	-----

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι. Πρωτόκολλα ποσοτικοποίησης γονιδιακής έκφρασης με Real Time PCR	147
--	-----

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ. Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην οντογένεση και στη λειτουργία της καρδιάς νυμφών zebrafish	151
---	-----

Dimitriadi A., Beis D., Arvanitidis C., Adriaens D. and Koumoundouros G. (2018) "Developmental temperature has persistent, sexually dimorphic effects on zebrafish cardiac anatomy" *Scientific Reports* 8 (1): 8125.

I. Περίληψη

Η θερμοκρασία αποτελεί ένα πολύ σημαντικό περιβαλλοντικό παράγοντα που συμβάλλει στην αφθονία των ειδών και στη γεωγραφική τους κατανομή. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η προσαρμογή των εξώθερων οργανισμών στο φαινόμενο της υπερθέρμανσης του πλανήτη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας προκειμένου να γίνουν κατανοητοί οι μηχανισμοί με τους οποίους οι οργανισμοί ανταποκρίνονται στις αυξημένες θερμοκρασίες. Καθώς τα ψάρια αποτελούν μια μεγάλη ομάδα εξώθερων, η ευαισθησία των πρώιμων οντογενετικών τους σταδίων μπορεί να μεταβάλει σε μόνιμη ή προσωρινή βάση την ανάπτυξη και την επιβίωση τους μέσω της φαινοτυπικής πλαστικότητας. Με τον όρο φαινοτυπική πλαστικότητα χαρακτηρίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένας γονότυπος μπορεί να εμφανίσει περισσότερους του ενός φαινότυπους, όταν εκτίθεται σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες κατά την ανάπτυξη.

Εντός του θερμοκρασιακού εύρους του κάθε είδους, η θερμοκρασία επηρεάζει την απόδοση των ψαριών σε πολλά επίπεδα της βιολογικής οργάνωσης. Σε κάποια είδη ψαριών, η θερμοκρασία ανάπτυξης έχει αναγνωριστεί ως βασικός παράγοντας καθορισμού του φύλου, της ανατομίας των μυών, του σχήματος σώματος, των μεριστικών χαρακτήρων, του χρονισμού των οντογενετικών γεγονότων, της δυνατότητας για εγκλιματισμό και της κολυμβητικής ικανότητας. Παρά τη μέχρι τώρα καλά μελετημένη επίδραση της θερμοκρασίας στην καρδιά των αναπτυσσόμενων ψαριών, από όσο γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη εργασία που παρουσιάζει το προγραμματισμό του σχήματος της καρδιάς από την θερμοκρασία του πρώιμου περιβάλλοντος.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην ανατομία της καρδιάς, και στην κολυμβητική ικανότητα του zebrafish, μετά από κάποιους μήνες μετά το τέλος της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών. Σε δευτερεύον επίπεδο, στόχος ήταν η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης πέντε γονιδίων-δεικτών αναδιαμόρφωσης της καρδιάς καθώς και η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχήμα σώματος και στη γονιμότητα του zebrafish. Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήσαμε το zebrafish ως κατάλληλο οργανισμό μοντέλο καθώς είναι ένα είδος με έντονη φαινοτυπική πλαστικότητα έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης ενώ ταυτόχρονα εμφανίζει ίδιο πρότυπο οντογένεσης με την πλειοψηφία των τελεόστων.

Αβγά zebrafish από κοινό απόθεμα γεννητόρων διαμοιράστηκαν σε τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης (24, 28 και 32 °C) μέχρι τη μεταμόρφωση, και μετά παρέμειναν σε κοινές συνθήκες (28 °C) μέχρι την ενηλικίωση. Η μελέτη της ανατομίας της καρδιάς πραγματοποιήθηκε μέσω micro-ct απεικόνισης στο τέλος της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών και στο ενήλικο στάδιο. Η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (U_{crit}) χρησιμοποιήθηκε ως αξιόπιστος δείκτης μέτρησης της αερόβιας κολυμβητικής ικανότητας για το στάδιο του ιχθυδίου και το ενήλικο στάδιο μετά από 20 και 100 μέρες εγκλιματισμού στις κοινές συνθήκες (28 °C) αντίστοιχα. Οι μετρήσεις του σχήματος σώματος έλαβαν μέρος μετά από τον υπολογισμό της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης για το κάθε ψάρι. Η γονιδιακή έκφραση μελετήθηκε στο τέλος της εφαρμογής των κοινών συνθηκών και μετά από 20 μέρες εγκλιματισμού στις κοινές συνθήκες. Τα πειράματα μελέτης της επίδρασης της θερμοκρασίας

ανάπτυξης στη γονιμότητα του zebrafish πραγματοποιήθηκαν στο ενήλικο στάδιο, 180 και 300 μέρες μετά το τέλος της εφαρμογής των διαφορετικών συνθηκών.

Ως προς το σχήμα της καρδιάς, αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης συνδέθηκε με πιο κυκλικό σχήμα κοιλίας στα αρσενικά (μείωση κατά 22% του VL/VD), αλλά όχι στα θηλυκά zebrafish. Ως προς τους υπόλοιπους προς εξέταση μορφολογικούς χαρακτήρες της καρδιάς των ενηλίκων, η θερμοκρασία ανάπτυξης προκάλεσε έντονες φυλο-εξαρτώμενες διαφορές. Στους 32 °C τα θηλυκά άτομα εμφάνισαν σημαντικά πιο μακρόστενη κοιλία από τα αρσενικά της ίδιας θερμοκρασιακής συνθήκης (αύξηση κατά 22% του VL/VD). Το μήκος του αρτηριακού βολβού των αρσενικών που μεγάλωσαν στους 28 °C βρέθηκε υψηλότερο από των θηλυκών της αντίστοιχης θερμοκρασιακής συνθήκης (αύξηση κατά 7% του BaL/SL). Ο σχετικός όγκος της κοιλίας των αρσενικών στους 24 και 28 °C ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από των θηλυκών των αντίστοιχων θερμοκρασιών (αύξηση κατά 26% του VeV/SL στους 24 °C και στους 28 °C των αρσενικών έναντι των θηλυκών). Ο σχετικός όγκος του αρτηριακού βολβού βρέθηκε και αυτός σημαντικά υψηλότερος στα αρσενικά των 28 και 32 °C σε σχέση με τα θηλυκά των αντίστοιχων θερμοκρασιών (αυξημένος BuLV/SL στα αρσενικά κατά 22% στους 28 °C και κατά 19% στους 32 °C).

Στα ιχθύδια, ως προς το σχήμα της καρδιάς, παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης (μείωση κατά 10% του VL/VD με την αύξηση της θερμοκρασίας). Ως προς τους υπόλοιπους υπό εξέταση μορφολογικούς χαρακτήρες της καρδιάς, παρατηρήθηκαν αποκρίσεις εγκλιματισμού έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης. Με την αύξηση της θερμοκρασίας, μειώθηκε το μήκος του αρτηριακού βολβού (μείωση κατά 12% του BaL/SL) καθώς και ο σχετικός όγκος της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού (μείωση κατά 45% του VeV/SL και του BuLV/SL).

Η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στην κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης των ενηλίκων zebrafish. Στα αρσενικά, αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης από τους 24 στους 32 °C οδήγησε σε μείωση της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης κατά 16%. Στα θηλυκά, τα άτομα που μεγάλωσαν στους 32 °C είχαν σημαντικά πιο χαμηλή κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης από τα άτομα των 24 και των 28 °C (μείωση κατά 25% και κατά 30% αντίστοιχα). Η επίδραση του φύλου αποδείχτηκε σημαντική σε όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες με τα αρσενικά να επιτυγχάνουν υψηλότερες τιμές κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης έναντι των θηλυκών (αυξημένη RU_{crit} κατά 16% στους 24 °C, κατά 7% στους 28 °C και κατά 26% στους 32 °C στα αρσενικά). Στα ιχθύδια, η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης δεν αποδείχτηκε σημαντική αν και η ύπαρξη μιας ανάλογης τάσης δεν μπορεί να παραβληθεί.

Η μελέτη της γονιδιακής έκφρασης στο τέλος της επίδρασης των διαφορετικών θερμοκρασιών αποκάλυψε σημαντική υπερέκφραση στη χαμηλότερη θερμοκρασία ανάπτυξης (24 °C) του *nppa* (κατά 16 φορές περισσότερη από τους 28 °C), του *myh7* (κατά 74 φορές μεγαλύτερη από τους 28 °C), του *myhpc3* (κατά 9 φορές μεγαλύτερη από τους 28 °C) και του *actinb2* (κατά 4 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τους 32 °C). Μετά από 20 μέρες εγκλιματισμού σε κοινές συνθήκες (28 °C), οι διαφορές στα περισσότερα γονίδια εξομαλύνθηκαν, ενώ παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης των γονιδίων *nfatc1* και *myhpc3*

στους 24 °C ως προς την τιμή αναφοράς των 28 °C (κατά 3 και 2 φορές μικρότερη, αντίστοιχα).

Ως προς το σχήμα σώματος των ενηλίκων, η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στο σχήμα σώματος των αρσενικών, διαφοροποιώντας την ομάδα των 24 °C από τις ομάδες των 28 και 32 °C. Τα αρσενικά που αναπτύχθηκαν στους 24 °C εμφάνισαν πιο υδροδυναμικό σχήμα σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες. Αντίστοιχα στα θηλυκά, η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά, διαφοροποιώντας τα άτομα που μεγάλωσαν στους 32 °C από τα άτομα που μεγάλωσαν στους 24 και 28 °C. Τα θηλυκά άτομα των 32 °C εμφάνισαν αισθητά πιο διογκωμένη κοιλία από τις υπόλοιπες ομάδες. Στα ιχθύδια, η θερμοκρασία ανάπτυξης διαφοροποίησε σημαντικά το σχήμα σώματος των ατόμων που μεγάλωσαν στους 32 °C σε σχέση με αυτά που μεγάλωσαν στους 24 °C και στους 28 °C. Τα άτομα των 32 °C είχαν λιγότερο βαθειά κοιλία σε σχέση με τις υπόλοιπες ομάδες.

Ως προς την πλαστικότητα της γονιμότητας των θηλυκών zebrafish έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης, τα αποτελέσματα έδειξαν πως η σχετική γονιμότητα των θηλυκών ατόμων αυξάνει στις χαμηλές (24 °C) έναντι των υψηλών (32 °C) θερμοκρασιών ανάπτυξης (αύξηση κατά 40% του EggsT/W). Στη δεύτερη πειραματική επανάληψη τα αποτελέσματα δεν επιβεβαιώθηκαν στατιστικά.

Τα ευρήματα της παρούσας εργασίας αποδεικνύουν πως η θερμοκρασία των πρώιμων οντογενετικών σταδίων προκαλεί μόνιμες αλλαγές στη καρδιά και την κολύμβηση των ενηλίκων. Δεδομένης της μεγάλης οικολογικής σημασίας που έχει η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης για τους φυσικούς πληθυσμούς (μετανάστευση, αποφυγή θήρευσης, θρέψη), τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας υποδεικνύουν τις πιθανές αποκρίσεις της υπερθέρμανσης του πλανήτη και των εποχιακών διακυμάνσεων στους πληθυσμούς των ψαριών. Εκτός από τα ψάρια, τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται εδώ θα μπορούσαν να αφορούν και τις πιθανές πλαστικές αποκρίσεις της καρδιάς των υπόλοιπων εξώθερμων οργανισμών (αμφίβια, ερπετά).

II. Abstract

Temperature has long been recognized as a major environmental factor contributing to species abundance and geographical distribution. During the last decades, ectotherms' adaptation to global change is becoming of crucial importance to better understand the diversity of adaptive mechanisms in response to temperature increase. As fish constitute a large group of ectotherms, the susceptibility of their embryonic and larval stages to temperature fluctuations can permanently or temporarily alter growth and survival through phenotypic plasticity. The term phenotypic plasticity, characterizes the ability of a single genotype to produce a variety of phenotypes, as a response to the different environmental stimuli experienced during development.

Within the zone of tolerance, temperature affects fish performance at a variety of levels of biological organization. In some fish species, developmental temperature has already been proven as an acute regulating factor in sex determination, muscle anatomy, body shape, meristic characters, developmental progress, thermal acclimation capacity and swimming performance. Despite the significance of water temperature for the cardiac function in developing fish, to our knowledge, this is the first study demonstrating the programming of cardiac shape by the temperature which was experienced by the fish during embryonic and larval stages.

The purpose of this study was to determine the acute and prolonged changes of cardiac anatomy and swimming performance in response to developmental temperature, several months after exposure to different thermal regimes. On a secondary level, we intended to study the expression of five marker genes involved in heart remodeling, as well as the effect of developmental temperature on zebrafish body shape and relative fecundity. We used the zebrafish as an experimental model since it's characterized by a variety of plastic responses against developmental temperature and has the same ontogenetic pattern of development with most teleost fish.

Zebrafish embryos were subjected to three developmental temperature treatments ($T_D = 24, 28$ or $32\text{ }^\circ\text{C}$) up to metamorphosis and then all maintained under common conditions ($28\text{ }^\circ\text{C}$) up to adulthood. Cardiac anatomy measurements were assessed via micro-ct imaging, at the end of the different treatments and at the adult stage. Critical swimming speed (U_{crit}) was used as a reliable indicator of aerobic swimming performance. Swimming performance assays took place at the juvenile and adult stages, after 20 and 100 days of acclimation at the common conditions ($28\text{ }^\circ\text{C}$). After the swimming performance assays, fish body shape measurements took place. Gene expression analysis was assessed at the end of the different treatment period and after 20 days of acclimation at the common conditions ($28\text{ }^\circ\text{C}$). The effect of developmental temperature on zebrafish relative fecundity was measured at the adult stage at 180 and 300 days after the end of the different exposure period.

The elevation of T_D induced a significant increase of the ventricle roundness in male (22% decrease of VL/VD ratio), but not in female zebrafish. Sex-related differences were evident in the rest of the under-study morphometrical characters of the zebrafish heart. At 32 °C, females exhibited more elongated ventricles than males of the same temperature treatment (22% increase of VL/VD ratio). Bulbus arteriosus length of males raised at 28 °C was longer than of females raised at the same temperature (7% increase of BaL/SL in males). Relative ventricular volume of males at 24 and 28 °C was significant bigger than of females of the same temperature treatments (26% increase in VeV/SL in both temperature treatments). Bulbus arteriosus relative volume was also found bigger in males of 28 and 32 °C as opposed to females of the same temperature treatments (22% increase of BuLV/SL in males raised at 28 °C and 19% increase in males raised at 32 °C).

Developmental temperature exhibited significant effects on the juvenile heart shape (elevation of T_D induced a 10% reduction in VL/VD ratio). As for the rest of the heart morphometrics, juveniles exhibited significant acclimation responses to developmental temperature. The elevation of T_D resulted in shorter bulbus arteriosus length (12% reduction of BaL/SL) and to a significant reduction of the relative ventricular and bulbus arteriosus volume (45% reduction in VeV/SL and BuLV/SL).

Adults reared at different developmental temperatures exhibited significant differences in critical swimming speed velocities. In males, elevation of T_D from 24 to 32 °C resulted in reduction of critical swimming speed by 16%. Females raised at 32 °C exhibited significant lower swimming capacity as opposed to females at 24 and 28 °C (25% and 30% reduction respectively). Sex-related responses were evident in all temperature treatments where males achieved higher velocities than females (16% increase of RU_{crit} at 24 °C, 7% increase of RU_{crit} at 28 °C, and 26% increase at 32 °C). In juveniles the effect of temperature on swimming performance was not significant but the existence of a similar trend with adults cannot be omitted.

Gene expression analysis that was performed at the end of the temperature treatments revealed significant up-regulation at colder temperatures (24 °C) of *nppa* (16-fold higher expression levels than 28 °C), *myh7* (74-fold higher expression levels than 28 °C), *mybpc3* (9-fold higher expression levels than 28 °C) and *actinb2* (4-fold higher expression levels than 32 °C). After 20 days of acclimation at the common conditions (28 °C), differences in most of the genes studied were normalized, while there was a significant up-regulation of *nfatc1* and *mybpc3* genes at 28 °C opposed to 24 °C (increase of gene expression by 3- and 2-fold, respectively).

Developmental temperature had a significant effect on male body shape, inducing significant differences between the 24 °C group and the 28 and 32°C groups. Males raised at 24 °C had more slender bodies as opposed to the rest of the groups. In females, developmental temperature had also a significant effect on body shape, inducing significant differences between the 32 °C group and the 24 and 28°C groups. Females raised at 32 °C had more swollen bellies as compared to rest of the temperature groups. In juveniles, developmental

temperature induced significant differences between the 32 °C group and the 24 and 28 °C groups. Juveniles raised at 32 °C appeared to have more slender bodies.

With regards to thermal plasticity of fecundity, female zebrafish that were raised at lower developmental temperatures (24 °C) exhibited higher relative fecundity than females raised at high developmental temperatures (32 °C). Results were not confirmed statistically at the second experimental replicate.

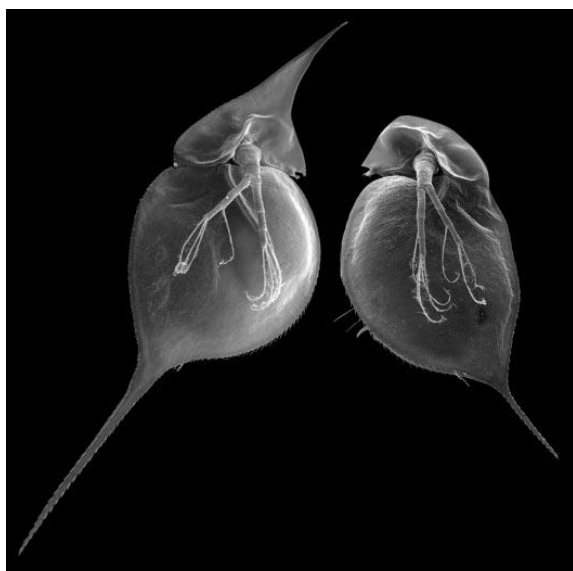
Our data show that rises in water temperature at critical early life stages can have detrimental effects on cardiac anatomy and physical capacity of adult fish. Given that critical swimming speed has a vital ecological significance for fish populations (i.e. for migration, foraging, feeding) our findings have relevance to fish populations and the concerns of global warming and seasonal temperature perturbations. Besides fish, our results could also have implications to the plastic responses of other ectothermic vertebrates.

1. Εισαγωγή

1.1 Φαινοτυπική πλαστικότητα

Τις τελευταίες δεκαετίες, το ενδιαφέρον της κοινής γνώμης και της επιστημονικής κοινότητας έχει αρχίσει να επικεντρώνεται στις περιβαλλοντικές επιπτώσεις της υπερθέρμανσης του πλανήτη και στις συνέπειες που αυτή έχει στη διαβίωση των φυσικών πληθυσμών (Walther *et al.* 2002, Pigliucci *et al.* 2006). Η ικανότητα των οργανισμών να προσαρμόζονται στις συνεχώς μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες βρίσκεται στο επίκεντρο του ενδιαφέροντος τα τελευταία χρόνια, σε μια προσπάθεια μελέτης της ενδοειδικής ποικιλομορφίας και του τρόπου με τον οποίο αυτή συνεισφέρει στην επιβίωση του ατόμου, του πληθυσμού αλλά και του είδους (Forsman 2014).

Στην ικανότητα της προσαρμογής που εμφανίζουν οι οργανισμοί προσκειμένου να



Εικόνα 1.1: Ανάπτυξη άκανθας στην περιοχή του κεφαλιού και της ουράς σε άτομα του ίδιου είδους *Daphnia lumholzi*, όπου το ένα έχει εκτεθεί σε θηρευτική πίεση (αριστερά), ενώ το άλλο όχι (δεξιά). Εικόνα από Agrawal (2009).

επιβιώσουν στις συνεχώς μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, εντάσσεται το φαινόμενο της φαινοτυπικής πλαστικότητας (phenotypic plasticity)¹. Το φαινόμενο αυτό περιγράφει την ικανότητα ενός γονοτύπου να παράγει περισσότερους από ένα εναλλακτικούς φαινοτύπους σε απόκριση των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών (West-Eberhard 1989, Fordyce 2006, Pigliucci *et al.* 2006). Η φαινοτυπική πλαστικότητα εκδηλώνεται με την μορφή τροποποιήσεων του οντογενετικού προτύπου, και με παραλλαγές του φαινοτύπου σε απόκριση των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων (Kelly *et al.* 2011).

Ενώ στην αρχή η φαινοτυπική πλαστικότητα είχε συνδεθεί μόνο με μορφολογικά χαρακτηριστικά (Pigliucci and Schlichting 1998), είναι πλέον αποδεκτό πως η πλαστικότητα εκφράζεται τόσο σε μορφολογικό, βιοχημικό, φυσιολογικό, όσο και σε επίπεδο συμπεριφοράς του οργανισμού (Agrawal 2001, Pigliucci *et al.* 2006).

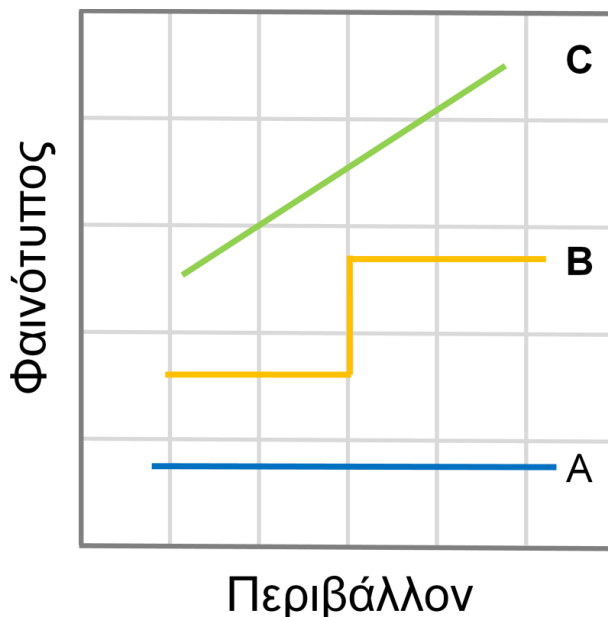
Μεταξύ των πιο χαρακτηριστικών παραδειγμάτων φαινοτυπικής πλαστικότητας που δόθηκε για τις επιπτώσεις της διατροφής και της θήρευσης, είναι μια διαφοροποίηση του φαινοτύπου του κλαδοκεραιωτού καρκινοειδούς *Daphnia*

¹ Φαινοτυπική πλαστικότητα (phenotypic plasticity): Ορίζεται ως η ικανότητα ενός γονοτύπου να παράγει περισσότερους του ενός διαφορετικούς φαινοτύπους σε απόκριση των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών (West-Eberhad 1989).

lumholtzi (Εικόνα 1.1). Ο Green (Green 1967), συνέδεσε την ανάπτυξη της άκανθας στην περιοχή του κεφαλιού και της ουράς, με την παρουσία θηρευτικής πίεσης, μια προσαρμογή που σήμερα θεωρείται καθοριστικής σημασίας για την προσαρμογή και την επιτυχή εξάπλωση της *D. lumholtzi* στη Νότια Αμερική (Engel *et al.* 2011).

1.1.1 Πρότυπα αντίδρασης (reaction norms)

Η φαινοτυπική πλαστικότητα μπορεί να αναπαρασταθεί γραφικά με τη χρήση των προτύπων αντίδρασης (reaction norms)² (Stearns 1989) (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Διαφορετικά πρότυπα αντίδρασης (reaction norms) που απεικονίζουν τη μεταβολή τριών φαινοτυπικών χαρακτήρων σε απόκριση δύο ή περισσότερων περιβαλλοντικών παραγόντων. Ο χαρακτήρας A δεν παρουσιάζει πλαστικότητα (canalization) ενώ οι χαρακτήρες B και C εμφανίζουν πλαστικότητα. Σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες τα πρότυπα αντίδρασης μπορεί να είναι συνεχή (C), ή ασυνεχή (B) στην περίπτωση που ένας γονότυπος δίνει διακριτούς φαινότυπους υπό την επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών.

Όπως φαίνεται και στην εικόνα, στον y-άξονα απεικονίζεται η πλαστικότητα ενός φαινότυπου που παράγεται από ένα συγκεκριμένο γονότυπο σε δύο ή περισσότερα περιβάλλοντα ή ερεθίσματα (x-άξονας) (Pigliucci and Schlichting 1998). Στις περιπτώσεις που ο φαινότυπος καθορίζεται αποκλειστικά από το γονότυπο, ο χαρακτήρας καλείται μη πλαστικός και η καμπύλη αντίδρασης αναπαρίσταται ως μια γραμμή παράλληλη στον άξονα των x (Εικόνα 1.2, [μπλε γραμμή](#)). Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται ως τροχοδρόμηση (canalization)³. Όσον αφορά στη μεταβολή των πλαστικών χαρακτήρων, τα πρότυπα μπορεί να περιλαμβάνουν από συνεχείς αναστρέψιμες μεταβολές (φαινοτυπική ευκαμψία, phenotypic flexibility)⁴ (Piersma and Lindström 1997, Debat and David 2001, Piersma and Drent 2003) του

² Πρότυπο αντίδρασης (Reaction norm): Το εύρος των φαινοτύπων που εκφράζονται ως απόκριση στις περιβαλλοντικές συνθήκες (Van Noordwijk 1988).

³ Τροχοδρόμηση (Canalization): Η δράση εσωτερικών παραγόντων κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης που μειώνουν (περιορίζουν) την επίδραση διαφορετικών παραγόντων (Van Noordwijk 1988).

⁴ Φαινοτυπική ευκαμψία (Phenotypic flexibility): Αναστρέψιμες αλλαγές του κάθε φαινότυπου που περιλαμβάνουν ευελιξία στην αλλαγή των συνθηκών (Kelly *et al.* 2011).

φαινοτύπου σε απόκριση των περιβαλλοντικών συνθηκών (Εικόνα 1.2, **πράσινη γραμμή**), μέχρι ασυνεχείς και διακριτές μεταξύ τους φαινοτυπικές προσαρμογές (Εικόνα 1.2, **κίτρινη γραμμή**) (Roff 1996, Windig *et al.* 2004). Τα ασυνεχή πρότυπα αντίδρασης περιγράφουν το φαινόμενο κατά το οποίο ένας γονότυπος μπορεί να παράγει δύο ή περισσότερες διακριτές μορφές ενός χαρακτήρα σε απόκριση των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών (Fusco and Minelli 2010). Αντίθετα, τα συνεχή πρότυπα εκφράζουν τη μη διακριτή αλλά συνεχόμενη έκφραση της πλαστικής απόκρισης (π.χ. επίδραση της διατροφής και της θερμοκρασίας στο ρυθμό ανάπτυξης και στο σωματικό μέγεθος).

1.1.2 Είδη πλαστικών αποκρίσεων

Ένα είδος φαινοτυπικής πλαστικότητας που εντάσσεται στην περίπτωση των ασυνεχών προτύπων και συναντάται ιδιαίτερα στα έντομα σε μια ποικιλία χαρακτήρων είναι το φαινόμενο του πολυφαινισμού (polyphenism)⁵. Χαρακτηριστικό παράδειγμα εποχιακού πολυφαινισμού αποτελούν οι κάμπιες του είδους *Nemoria arizonaria* (οικογένεια Geometridae) οι οποίες αναλόγως της εποχής εμφανίζουν και διαφορετική μορφή (Εικόνα 1.3). Ο πολυφαινισμός έχει επίσης παρατηρηθεί στα θηλυκά άτομα της αφίδας του είδους *Acyrtosiphon pisum* ενώ στα αρσενικά άτομα του ίδιου είδους εμφανίζεται το φαινόμενο του πολυμορφισμού (polymorphism)⁶ (Εικόνα 1.4), το οποίο οφείλεται αποκλειστικά σε παραλλαγές του γενετικού υλικού (Braendle *et al.* 2006).

Στην περίπτωση των συνεχών προτύπων, ένα παράδειγμα φαινοτυπικής πλαστικότητας που αναφέρεται στις περιβαλλοντικά ελεγχόμενες αλλαγές αποκλειστικές του φαινοτύπου των ενήλικων ατόμων είναι ο εγκλιματισμός (acclimation)⁷. Με τον εγκλιματισμό, προηγούμενη έκθεση σε ένα ερέθισμα μπορεί να μεταβάλλει τον τρόπο με τον οποίο ο οργανισμός θα ανταποκριθεί μελλοντικά στο ίδιο περιβαλλοντικό ερέθισμα (Angilletta 2009, Kassahn *et al.* 2009, Scott and Johnston 2012). Στο φαινόμενο του εγκλιματισμού εντάσσονται κυρίως αναστρέψιμες μεταβολές που αφορούν σε χαρακτήρες συμπεριφοράς ή φυσιολογίας του οργανισμού (Wilson and Franklin 2002, Brakefield *et al.* 2007) ενώ δεν ισχύει το ίδιο για την αναπτυξιακή πλαστικότητα (Piersma and Drent 2003, Pigliucci *et al.* 2006).

Η οντογενετική ή αλλιώς αναπτυξιακή πλαστικότητα (developmental plasticity)⁸ είναι μη αναστρέψιμη, εκφράζεται για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα από τον

⁵ Πολυφαινισμός (Polyphenism): Ορίζεται το είδος της φαινοτυπικής πλαστικότητας κατά το οποίο ένας γονότυπος σε απόκριση διαφορετικών περιβαλλοντικών ερεθισμάτων παράγει περισσότερες από μία διακριτές μορφές του ίδιου χαρακτήρα (Fusco and Minelli 2010).

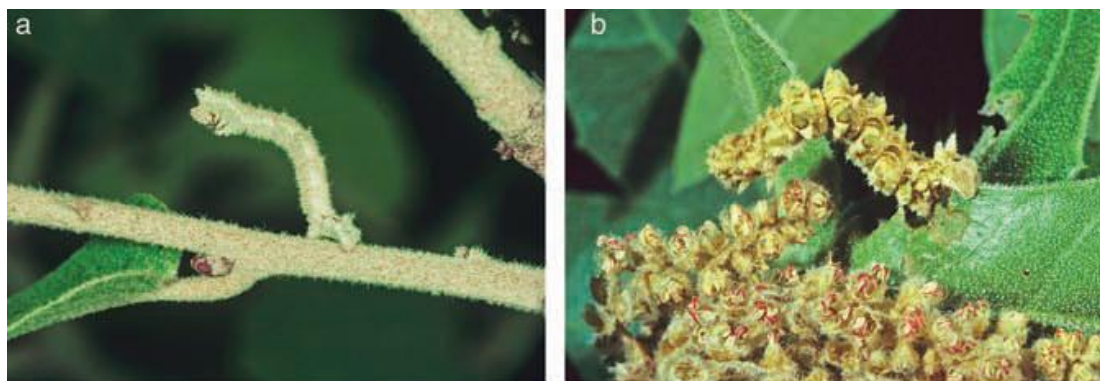
⁶ Πολυμορφισμός (Polymorphism): Η ύπαρξη δύο ή περισσότερων γονοτύπων μέσα σε ένα πληθυσμό. Ο γενετικός πολυμορφισμός μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικούς φαινοτύπους (Whitman and Agrawal 2009).

⁷ Εγκλιματισμός (Acclimation): Οι φυσιολογικές προσαρμογές χαρακτήρων σε απάντηση των περιβαλλοντικών συνθηκών (Kelly *et al.* 2011).

⁸ Οντογενετική πλαστικότητα (Developmental plasticity): Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη ανά πάσα στιγμή μετά το σχηματισμό του ζυγωτού. Οι διαφοροποιήσεις

Εισαγωγή

εγκλιματισμό, και αναφέρεται στην έκφραση εναλλακτικών φαινοτύπων στο ενήλικο στάδιο σε απόκριση των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών που έλαβαν μέρος κατά τη διάρκεια των πρώιμων οντογενετικών σταδίων (Kinne 1962, Whitman and Agrawal 2009).



Εικόνα 1.3: Φαινοτυπική πλαστικότητα στα έντομα. Διακριτές μορφές εποχιακού πολυφαινισμού στις κάμπιες του είδους *Nemoria arizonaria*. Τα άτομα του είδους που αναπτύσσονται το καλοκαίρι τρέφονται με φύλλα βελανιδιάς και μοιάζουν με κλαδιά (αριστερά), ενώ τα άτομα που αναπτύσσονται την άνοιξη τρέφονται και μοιάζουν με άνθη βελανιδιάς (δεξιά). Εικόνα από Whitman and Agrawal (2009).



Εικόνα 1.4: Διαφορετικοί φαινότυποι της αφίδας *Acyrthosiphon pisum* (με φτερά και χωρίς) είναι αποτέλεσμα του φαινομένου του πολυφαινισμού στα θηλυκά άτομα (αριστερά) και του πολυμορφισμού στα αρσενικά (δεξιά). Εικόνα από Braendle *et al* (2006).

αυτές του φαινοτύπου στο ενήλικο στάδιο έναντι των πρώιμων περιβαλλοντικών ερεθισμάτων ονομάζονται οντογενετική πλαστικότητα (Kelly *et al.* 2011).

Πολλές φορές, προκειμένου οι οργανισμοί να ανταπεξέλθουν στις μεταβαλλόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες, διαφορετικά είδη πλαστικότητας επιστρατεύονται, τα οποία αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Για παράδειγμα, εγκλιματισμός και αναπτυξιακή πλαστικότητα έχουν βρεθεί πολλές φορές να επηρεάζουν με την παράλληλη έκφραση τους τόσο τα θερμικά όρια ανοχής όσο και το ίδιο το πρότυπο της θερμικής καμπύλης αντίδρασης (για παράδειγμα στο zebrafish, τόσο ο εγκλιματισμός όσο και η θερμοκρασία ανάπτυξης προκαλούν μη αναστρέψιμες αλλαγές στη θερμική ανοχή των ενηλίκων (Schaefer and Ryan 2006, Terblanche and Chown 2006, Koumoundouros *et al.* 2009).

Τέλος, εκτός από τις αναστρέψιμες και τις μη αναστρέψιμες πλαστικές αποκρίσεις, ένα τρίτο είδος πλαστικότητας, η πλαστικότητα μεταξύ των γενεών (transgenerational plasticity)⁹ (Angilletta 2009) εκφράζεται, όταν το περιβάλλον που βιώνει ένας γονέας επηρεάζει τον φαινότυπο των μετέπειτα απογόνων του (Dyer *et al.* 2010, Pías *et al.* 2010). Αν και ο όρος αναφέρεται σε μη-γενετικές τροποποιήσεις, οι αλλαγές στο φαινότυπο των απογόνων μπορούν να τους παρέχουν κάποια προσαρμοστικά πλεονεκτήματα. Ένα παράδειγμα δια-γενεακής πλαστικότητας αποτελεί η *Daphnia ambigua* η οποία όταν εκτίθεται σε θηρευτική πίεση επισπεύδει το χρόνο ανάπτυξης της επόμενης γενεάς (Walsh *et al.* 2016). Ο βαθμός της έντασης της θηρευτικής πίεσης καθορίζει το αν οι πλαστικές αποκρίσεις θα εμφανίζονται εντός ή εκτός της ίδιας γενεάς.

Τέλος, η φυσική επιλογή (natural selection)¹⁰ αποτελεί έναν μέγιστης εξελικτικής σημασίας παράγοντα ο οποίος και αυτός καθορίζει την έκφραση της φαινοτυπικής πλαστικότητας (Schulte *et al.* 2011). Στο λαβράκι, η φυσική επιλογή βρέθηκε να επιδρά σημαντικά στην προσαρμογή (adaptation)¹¹ των ατόμων του θαλασσινού νερού όταν αυτά μεταφέρθηκαν σε γλυκά νερά, όπου οι απόγονοι της F3 γενεάς είχαν καλύτερη ανοχή στο κρύο από τη γονική γενεά (Barrett *et al.* 2011). Οι δια-γενεακές αυτές διαφορές στη θερμική ανοχή, οφείλονταν σε σημαντικές παραλλαγές του γονιδιώματος οι οποίες συνεισέφεραν στην εξέλιξη του είδους.

Η σημασία της φαινοτυπικής πλαστικότητας έχει αποκτήσει τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερο εξελικτικό ενδιαφέρον στα πλαίσια της ευρύτερης κατανόησης των μηχανισμών που βελτιώνουν την προσαρμογή των οργανισμών έναντι της υπερθέρμανσης του πλανήτη. Στο επόμενο κεφάλαιο συζητείται πιο αναλυτικά ο

⁹ Πλαστικότητα μεταξύ των γενεών (Transgenerational plasticity): Η έννοια βασίζεται στην αναγνώριση ότι οι γονείς μπορούν να μεταβάλλουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά ανάπτυξης των απογόνων τους σε απόκριση περιβαλλοντικών παραγόντων stress και ότι αυτές οι αλλαγές θα ενισχύσουν την ανάπτυξη και την επιτυχία των απογόνων (Allen *et al.* 2008).

¹⁰ Φυσική επιλογή (Natural selection): Όταν αναπαραγόμενες μονάδες με κάποιες γενετικές διαφορές έχουν διαφορετικές πιθανότητες αντιπροσώπευσής τους στις επόμενες γενιές. Οι μονάδες μπορεί να είναι αλληλόμορφα, γονότυποι, πληθυσμοί ή και είδη (Van Noordwijk, 1988).

¹¹ Προσαρμογή (Adaptation): Μια διεργασία γενετικής αλλαγής ενός πληθυσμού, η οποία οφείλεται στη φυσική επιλογή και δια της οποίας η μέση κατάσταση ενός χαρακτήρα βελτιώνεται ως προς μια συγκεκριμένη λειτουργία ή δια της οποίας ένας πληθυσμός μπορεί να ανταποκρίνεται καλύτερα σε ορισμένα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντός του (Van Noordwijk, 1988).

ρόλος της φαινοτυπικής πλαστικότητας στην εξέλιξη των ειδών καθώς και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες αυτή συνεισφέρει στην προσαρμογή των ειδών.

1.1.3 Ο ρόλος της φαινοτυπικής πλαστικότητας στην εξέλιξη των ειδών

Αντικείμενο των εξελικτικών βιολόγων τα τελευταία χρόνια αποτελεί η μελέτη της γενετικής βάσης της φαινοτυπικής πλαστικότητας καθώς και οι συνθήκες κάτω από τις οποίες η τελευταία μπορεί να συνεισφέρει στην εξέλιξη των ειδών (Dudley and Schmitt 1996).

1.1.3.1 «Προγνωστικότητα» φαινοτυπικής πλαστικότητας

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, με τον όρο αναπτυξιακή ή οντογενετική πλαστικότητα περιγράφονται οι τροποποιήσεις το φαινοτύπου των ενήλικων ατόμων σε απόκριση των περιβαλλοντικών συνθηκών που επέδρασαν σε αυτούς κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης. Αν και δεν περιλαμβάνει γενετικές τροποποιήσεις, η αναπτυξιακή πλαστικότητα μπορεί να συνεισφέρει στην προσαρμοστική εξέλιξη (adaptive evolution)¹² όταν τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα κατά την ανάπτυξη του οργανισμού αποτελούν καλούς προγνωστικούς παράγοντες του μελλοντικού περιβάλλοντος διαβίωσής του (προσαρμοστική αναπτυξιακή πλαστικότητα, adaptive developmental plasticity)¹³ (Beldade *et al.* 2011). Πολλά παραδείγματα φαινοτυπικής πλαστικότητας είναι ξεκάθαρα προσαρμοστικά (π.χ. αποκρίσεις του ανοσοποιητικού, ο εγκλιματισμός, άμυνες έναντι θηρευτικής πίεσης, η διασπορά των ειδών), ενώ άλλες μορφές αναπτυξιακής πλαστικότητας δεν είναι προσαρμοστικές (Whitman and Agrawal 2009). Η ανάπτυξη άκανθας για παράδειγμα στη *Daphnia lumholtzi* έναντι θηρευτικής πίεσης, έχει αντίκτυπο στη διατροφή, στο ζευγάρωμα, αλλά και στη γονιμότητά της (Roff 2017).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην περίπτωση της προσαρμοστικής αναπτυξιακής πλαστικότητας, η σχέση μεταξύ φαινοτύπου και περιβάλλοντος είναι επιτυχής, όταν το περιβαλλοντικό ερέθισμα (environmental cue)¹⁴ που προκάλεσε την μεταβολή ενός χαρακτήρα κατά την ανάπτυξη του είναι ένας καλός «προγνωστικός παράγοντας» του μελλοντικού επιλεκτικού περιβάλλοντος στο οποίο θα διαβιώσει ο οργανισμός. Η «προγνωστικότητα» αυτή της φαινοτυπικής πλαστικότητας (environmental

¹² Προσαρμοστική εξέλιξη (Adaptive evolution): Ορίζεται το είδος της εξέλιξης που περιλαμβάνει εξελικτικές αλλαγές οι οποίες επάγουν την προσαρμογή σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον (Olson-Manning *et al.* 2012).

¹³ Προσαρμοστική αναπτυξιακή πλαστικότητα (Adaptive developmental plasticity): Ο όρος χρησιμοποιείται στις περιπτώσεις όπου η περιβαλλοντικά επαγόμενη ποικιλομορφία οδηγεί σε μια καλύτερη αντιστοιχία μεταξύ του φαινοτύπου και του επιλεκτικού περιβάλλοντος (Beldade *et al.* 2011).

¹⁴ Περιβαλλοντικό ερέθισμα (Environmental cue): Συγκεκριμένα περιβαλλοντικά σήματα τα οποία προβλέπουν την περιβαλλοντική αλλαγή και προκαλούν την έκφραση προσαρμοστικής πλαστικότητας (Whitman and Agrawal 2009).

predictability)¹⁵ αποτελεί μια μεγάλη προσαρμοστική παράμετρο έναντι των περιβαλλοντικών διακυμάνσεων (Leimar *et al.* 2006, Reed *et al.* 2010).

Τα ερεθίσματα αυτά μπορεί να είναι είτε αβιοτικής φύσεως (π.χ. θερμοκρασία, φωτοπερίοδος), είτε βιοτικής (πυκνότητα πληθυσμού, παρουσία άλλων ειδών), με άμεσες ή έμμεσες επιδράσεις στους οργανισμούς αντίστοιχα. Στις άμεσες, συγκαταλέγονται οι βιοχημικές τροποποιήσεις (π.χ. επίδραση θερμοκρασίας στην κινητική των αντιδράσεων), ενώ στις έμμεσες συμπεριλαμβάνονται αποκρίσεις οι οποίες μεσολαβούνται από άλλα φυσιολογικά και αναπτυξιακά γεγονότα (π.χ. απόκριση νευρο-ενδοκρινικού συστήματος σε απελευθέρωση χημικών ουσιών από θηρευτές) (Beldade *et al.* 2011). Πολλές φορές, ένας περιβαλλοντικός παράγοντας μπορεί να επάγει τόσο πλαστικές αποκρίσεις όσο και επιβλαβείς φυσιολογικές διαταραχές σε ένα οργανισμό (π.χ. τοξίνες ή υψηλές θερμοκρασίες). Η προσαρμοστικότητα ενός οργανισμού λοιπόν, καθορίζεται και από το κατά πόσο ένα επιβλαβές στοιχείο μπορεί να εξελιχτεί σε «προγνωστικό παράγοντα» (Whitman and Agrawal 2009).

1.1.3.2 Επιγενετική και γενετική αφομοίωση

Σύμφωνα με τους Pigliucci *et al.* (2006), η πλαστικότητα είναι μια αναπτυξιακή διαδικασία πάνω στην οποία ο εξελικτικός μηχανισμός της φυσικής επιλογής μπορεί να δράσει (κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες), αποτυπώνοντας έτσι την αφομοίωση κάποιων χαρακτηριστικών στο γονιδίωμα του οργανισμού. Το φαινόμενο αυτό καλείται γενετική αφομοίωση (genetic assimilation)¹⁶.

Πολλοί είναι οι συγγραφείς (West-Eberhard 2005, Pigliucci *et al.* 2006) που προτείνουν πως η πλαστικότητα των φαινοτυπικών χαρακτήρων αποτελεί ένα «προπύργιο» της γενετικής εγκαθίδρυσης τους μέσω των μηχανισμών της επιγενετικής¹⁷ (Feinberg and Irizarry 2010, Bateson and Gluckman 2012). Οι γενετικές αυτές τροποποιήσεις σχετίζονται με τη γονιδιακή ρύθμιση χωρίς την αλλαγή DNA αλληλουχιών (Ho and Burggren 2010). Η εξελικτική σημασία της επιγενετικής έγκειται αρχικά στην αλληλεξάρτηση των εκάστοτε περιβαλλοντικών ερεθισμάτων με τη ρύθμιση των επιγενετικών μηχανισμών (Gertz *et al.* 2012, Herb *et al.* 2012, Wang *et al.* 2012) αλλά και στην αφομοίωση των τροποποιήσεων αυτών στο γονιδίωμα των ακόλουθων γενεών (Anway *et al.* 2005, Stouder and Paoloni-Giacobino 2010, Greer *et al.* 2011).

Επιγενετικοί μηχανισμοί όπως η μεθυλίωση του DNA, η ακετυλίωση ή/και η μεθυλίωση των ιστονών, ενεργοποιούνται από περιβαλλοντικά ερεθίσματα και

¹⁵ Προγνωστικότητα (Environmental predictability): Σχετίζεται με τη πρόγνωση βιολογικών λειτουργιών και συμπεριφορών τα οποία βασίζονται στην έκφραση γονιδίων και σε προηγούμενα βιώματα (Marshall *et al.* 2015).

¹⁶ Γενετική αφομοίωση (Genetic assimilation): Όταν η περιβαλλοντικά ελεγχόμενη φαινοτυπική ποικιλομορφία προκύπτει χωρίς το περιβαλλοντικό ερέθισμα (Pigliucci *et al.* 2006).

¹⁷ Επιγενετική: Η διαγενεακή μεταφορά φαινοτυπικών χαρακτήρων χωρίς την τροποποίηση της αλληλουχίας του γενετικού υλικού (Ho and Burggren 2010)

οδηγούν σε αλλαγές του γενετικού υλικού επηρεάζοντας το φαινότυπο του οργανισμού (Duncan *et al.* 2014). Η μεθυλίωση του DNA συγκεκριμένα, έχει ρόλο κλειδί στη ρύθμιση της περιβαλλοντικά ελεγχόμενης φαινοτυπικής ποικιλομορφίας ιδιαίτερα στα έντομα (π.χ. καθορισμός κάστας στις μέλισσες) (Moczek and Snell-Rood 2008). Οι PARs (Predictive Adaptive Responses) αφορούν επιγενετικές τροποποιήσεις του γενετικού υλικού με στόχο την καλύτερη επιβίωση των οργανισμών στο μελλοντικό τους περιβάλλον, βάσει των ερεθισμάτων που θα δεχτούν κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξής τους (Gluckman *et al.* 2005). Οι επιγενετικές αυτές αλλαγές μπορούν να επηρεάσουν το μεταβολισμό ή τη μορφολογία των ενήλικων ατόμων έχοντας έτσι θετικές επιδράσεις στην επιβίωση και την επιτυχία των οργανισμών (Varley *et al.* 2013).

Συμπεραίνοντας λοιπόν, στην περίπτωση της προσαρμοστικής αναπτυξιακής πλαστικότητας, οι περιβαλλοντικά ελεγχόμενες φαινοτυπικές τροποποιήσεις καταλήγουν στην δημιουργία ενός καταλληλότερου ενήλικου φαινοτύπου, που είναι αποτέλεσμα αλλαγών που καθιερώθηκαν πριν από την ενηλικίωση (Beldade *et al.* 2011). Ένα παράδειγμα φαινοτυπικής πλαστικότητας που μπορεί να μετατραπεί σε εξελικτική προσαρμογή αποτελούν οι μεταλλάξεις σε απόκριση του stress. Κάτω από συνθήκες stress οι οργανισμοί παράγουν DNA πολυμεράσες οι οποίες αναπαράγουν λανθασμένο ή μεταλλαγμένο DNA, πιθανώς γιατί απαιτείται η εισαγωγή νέων φαινοτύπων σε ένα αμιγώς επιλεκτικό περιβάλλον (Radman 1999). Αυτές οι περιβαλλοντικά προκαλούμενες μεταλλάξεις έχουν ιδιαίτερα εξελικτικές δυνατότητες, ειδικά σε οργανισμούς όπως τα μικρόβια και τα φυτά.

Συμπερασματικά, η μοντέρνα θεώρηση της πλαστικότητας συνοψίζεται στη δήλωση ότι η φαινοτυπική πλαστικότητα εξελίσσεται για να μεγιστοποιήσει την αρμοστικότητα (fitness)¹⁸ των οργανισμών σε συνεχώς μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα (Dudley and Schmitt 1996). Η μελέτη τόσο της επιγενετικής όσο και των υπόλοιπων μοριακών μηχανισμών (γονιδιακή έκφραση, επίπεδα ορμονών) θεωρείται απαραίτητη για τη καλύτερη κατανόηση της επίδρασης του περιβάλλοντος στην ανάπτυξη και την εξέλιξη των οργανισμών (Beldade *et al.* 2011).

1.2 Πλαστικότητα στα ψάρια και θερμοκρασία ανάπτυξης

Τα ψάρια αποτελούν μια ιδιαίτερα πλαστική ομάδα σπονδυλωτών καθώς καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους έρχονται σε επαφή με συνεχώς μεταβαλλόμενους βιοτικούς ή αβιοτικούς παράγοντες. Ιδιαίτερα τα πρώιμα οντογενετικά στάδια ανάπτυξης των ψαριών (έμβρυο, νύμφη, ιχθύδιο) εμφανίζουν υψηλού βαθμού πλαστικότητα έναντι των διαφορετικών περιβαλλοντικών διακυμάνσεων.

Οι διάφοροι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τους φαινοτυπικούς χαρακτήρες των ψαριών είτε άμεσα, μέσω αποκρίσεων του εγκλιματισμού, είτε έμμεσα, μέσω της αναπτυξιακής πλαστικότητας (Blaxter 1991,

¹⁸ Αρμοστικότητα (Fitness): Η αναπαραγωγική επιτυχία ενός γονότυπου σε σχέση με κάποιον άλλο (Van Noordwijk 1988).

Fuiman *et al.* 1998). Παράγοντες όπως η συγκέντρωση του διαλυμένου οξυγόνου (Shang *et al.* 2006, Widmer *et al.* 2006), η φωτοπερίοδος και η αλατότητα (Lindsey 1988), το είδος και η πυκνότητα της τροφής (Meyer 1987), καθώς και η μέθοδος εκτροφής των ψαριών (Koumoundouros *et al.* 1999, Svanbäck and Eklöv 2002) έχουν βρεθεί να επηρεάζουν με άμεσο τρόπο χαρακτήρες, όπως το ρυθμό αύξησης και διαφοροποίησης, τους μεριστικούς χαρακτήρες, το σχήμα σώματος και την κολύμβηση (Corti *et al.* 1996). Στην περίπτωση των έμμεσων επιδράσεων, συγκαταλέγονται η επίδραση της υποξίας στην πλαστικότητα του καρδιαγγειακού συστήματος (Pelster 2002), της συμπεριφοράς (Christopher *et al.* 2005), αλλά και της σεξουαλικής διαφοροποίησης και ανάπτυξης των ενηλίκων (Shang *et al.* 2006).

Η θερμοκρασία ανάπτυξης, θεωρείται ως ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες με τη μεγαλύτερη επίδραση στην ανάπτυξη και επιβίωση των ψαριών (Blaxter and Hempel 1963, Chambers and Leggett 1987). Η θερμοκρασία ανάπτυξης μπορεί να επιδράσει είτε άμεσα, μέσω εγκλιματισμού, είτε έμμεσα, μέσω αναπτυξιακής πλαστικότητας. Σε απόκριση της θερμοκρασίας, μεταβάλλονται οι ρυθμοί αύξησης και διαφοροποίησης (Jordaan *et al.* 2006, Parichy *et al.* 2009), ο μεταβολικός ρυθμός αλλά και οι ενεργειακές ανάγκες των ψαριών (Kamler 2002, Pittman *et al.* 2013), ενώ στην περίπτωση της έκφρασης αναπτυξιακής πλαστικότητας, η θερμοκρασία ανάπτυξης έχει βρεθεί να καθορίζει μακροπρόθεσμα τον τελικό φαινότυπο των ενηλίκων (Koumoundouros *et al.* 2001, Sfakianakis *et al.* 2004).

Ως προς τις μακροπρόθεσμες επιδράσεις της θερμοκρασίας ανάπτυξης στα ψάρια, η τελευταία έχει βρεθεί να επηρεάζει την πλαστικότητα πληθώρας χαρακτήρων όπως τους μεριστικούς χαρακτήρες (Lindsey 1988, Georgakopoulou *et al.* 2007), το σχήμα σώματος (Georga and Koumoundouros 2010), την αναλογία φύλου (Pavlidis *et al.* 2000, Koumoundouros *et al.* 2002, Piferrer *et al.* 2005, Navarro-Martín *et al.* 2011, Anastasiadi *et al.* 2017), και τη δυνατότητα εγκλιματισμού (Scott and Johnston 2012).

Η θερμοκρασία ανάπτυξης έχει επίσης αποδειχτεί μέγιστος παράγοντας πλαστικότητας για τους μύες των ψαριών (Johnston 1993, Johnston *et al.* 1997, Johnston and Cole 1998, Johnston *et al.* 2001). Η πλαστικότητα αυτή σχετίζεται με τον αριθμό και το μέγεθος των μυϊκών ινών (Johnston *et al.* 2001, Stoiber *et al.* 2002, Johnston and Hall 2004), με την οντογένεση των μυών και το χρονισμό αυτής (Johnston 1993, Ayala *et al.* 2000), καθώς και με τις κυτταρικές και βιοχημικές ιδιότητές τους (Johnston 1993, Guderley and Johnston 1996, Galloway *et al.* 1998, Sängler and Stoiber 2001, Stoiber *et al.* 2002, Guderley 2004, Schnurr *et al.* 2014). Οι αλλαγές αυτές έχουν δειχτεί να διατηρούνται κατά τη διάρκεια της οντογένεσης, επηρεάζοντας την αύξηση των μετέπειτα σταδίων (Johnston and Hall 2004, Martell *et al.* 2005, 2005), καθώς και την κολυμβητική ικανότητα (Fuiman and Batty 1997, Johnston *et al.* 2001, Johnston and Hall 2004, Koumoundouros *et al.* 2009).

Η πλαστική επίδραση της θερμοκρασίας στην κολύμβηση έχει μελετηθεί σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, μετά από έκθεση σε μεγάλα (πλαστικότητα) ή μικρά

(εγκλιματισμός) χρονικά διαστήματα, καθώς και σε διάφορα επίπεδα βιολογικής οργάνωσης (Fuiman and Batty 1997, 2006, Claireaux *et al.* 2007, Georgakopoulou *et al.* 2007, Koumoundouros *et al.* 2009, Dhillon and Schulte 2011, Johansen and Jones 2011, Scott and Johnston 2012). Η θερμοκρασιακή πλαστικότητα της κολύμβησης στα ψάρια αναλύεται εκτεταμένα στα επόμενα κεφάλαια (§1.5)

Τέλος, καθώς η καρδιά κατέχει μείζονα ρόλο στην ανάπτυξη και λειτουργία των ψαριών (π.χ κολυμβητική ικανότητα), η απόκριση της στη θερμοκρασία (μέσω εγκλιματισμού ή πλαστικότητας) έχει μελετηθεί μέχρι τώρα εκτενώς (Pelster 2002, Gamperl and Farrell 2004, Klaiman *et al.* 2011, Keen *et al.* 2017) (§1.4.3). Παρόλα αυτά, μέχρι σήμερα, δεν υπάρχουν εργασίες που να συσχετίζουν τη θερμοκρασιακή πλαστικότητα της καρδιάς των ψαριών με την κολύμβηση.

1.3 Το zebrafish ως οργανισμός «μοντέλο» μελέτης της φαινοτυπικής πλαστικότητας

Το zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822) είναι ένα τροπικό είδος των γλυκών νερών, της οικογένειας των κυπρινοειδών. Τα φυσικά ενδιαίτηματά του είδους εντοπίζονται σε ποτάμια και λίμνες των τροπικών περιοχών της Ν.Α. Ασίας, στο Πακιστάν, την Ινδία, το Μπαγκλαντές, το Νεπάλ και τη Μιανμάρ (Εικόνα 1.5). Τα zebrafish στη φύση συναντώνται σε μικρά κοπάδια (5-20 ατόμων) και τρέφονται με ζωοπλαγκτόν, έντομα και φυτοπλαγκτόν. Παράλληλα αποτελεί ένα ευρύθερμο είδος, με τη θερμοκρασία στα περιβάλλοντά διαβίωσής του να κυμαίνεται από 6 °C το χειμώνα μέχρι 38 °C το καλοκαίρι, σε pH ελαφρώς αλκαλικό (~ 8.0) (Lawrence 2007, Spence *et al.* 2008).



Εικόνα 1.5: Η γεωγραφική κατανομή του zebrafish. Με μαύρες κηλίδες υποδεικνύονται οι περιοχές καταγραφής του είδους. Εικόνα από Spence *et al.* (2008).



Εικόνα 1.6: Το zebrafish (*Danio rerio*).
Εικόνα από fishbase.org

Το είδος είναι φωτόκο, με ασύγχρονη ωρίμανση των γονάδων και χωρίς γονική φροντίδα των απογόνων. Καθώς είναι προσαρμοσμένο στο κλίμα των μουσώνων, η αναπαραγωγή συγχρονίζεται με την άφιξη των βροχών. Η αναπαραγωγή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την διαθεσιμότητα της τροφής, τα επίπεδα της οποίας εξαρτώνται θετικά από τις αυξανόμενες βροχοπτώσεις (Spence *et al.* 2008). Η αναπαραγωγή ρυθμίζεται επίσης από τη φωτοπερίοδο. Τα zebrafish γεννούν τις πρώτες ώρες της αυγής τόσο στο εργαστήριο (Selman *et al.* 1993) όσο και στη φύση (Spence *et al.* 2006). Τα αυγά του είδους είναι βενθικά και ανάλογα με τις συνθήκες (θερμοκρασία, χημεία νερού) εκκολάπτονται σε 4-7 μέρες σε ελεύθερες κολυμβητικές νύμφες (Lawrence 2007). Στους 28 °C η εκκόλαση πραγματοποιείται 48-72 ώρες μετά τη γονιμοποίηση. Στην ίδια θερμοκρασία το νυμφικό στάδιο ολοκληρώνεται σε περίπου 20 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Σε εργαστηριακές συνθήκες το είδος μπορεί να ωτοκεί συνεχώς όταν υποβάλλεται σε συνθήκες φωτοπεριόδου 14:10 L:D (φώς : σκοτάδι). Ο χρόνος γενεάς κυμαίνεται από 3 έως 4 μήνες και η διάρκεια ζωής από 5 έως 7 χρόνια (Westerfield 2007).

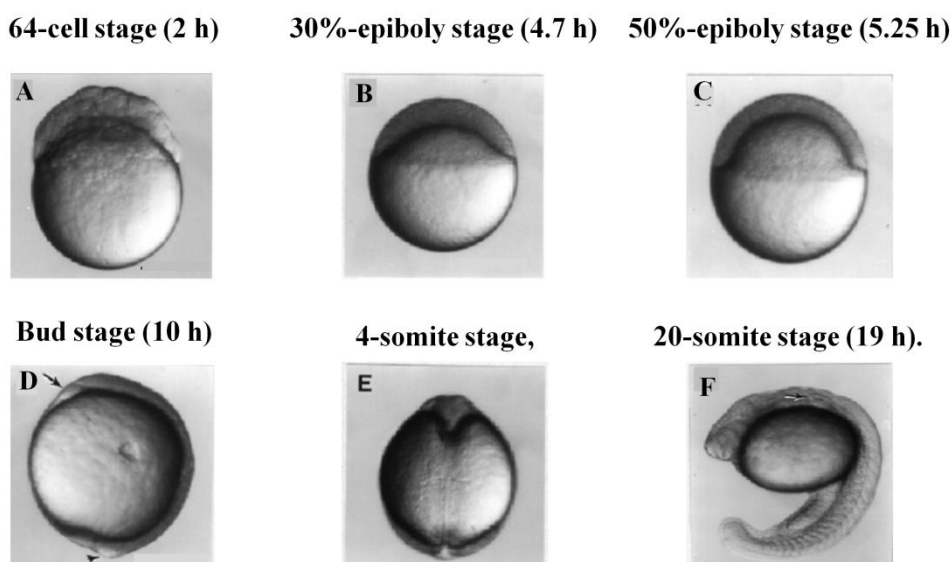
Το zebrafish αποτελεί τα τελευταία χρόνια ένα από τα καλύτερα μοντέλα μελέτης σε πολλούς διαφορετικούς τομείς της Βιολογίας. Η ευκολία συντήρησης και αναπαραγωγής του στο εργαστήριο και η εκτενής γενετική ανάλυση του γονιδιώματός του, το καθιστούν αποτελεσματικό πειραματικό μοντέλο στην Μοριακή και Αναπτυξιακή Βιολογία. Ακόμη, το μικρό του μέγεθος, ο μικρός χρόνος γενεάς του, η πλήρως χαρακτηρισμένη εμβρυική του ανάπτυξη (Spence *et al.* 2008) σε συνδυασμό με το διαφανές κατά την εμβρυική και νυμφική ανάπτυξη του σώμα το καθιστούν από τους πιο δημοφιλείς οργανισμούς μοντέλα για τη μελέτη της περιβαλλοντικής βιολογίας των πρώιμων οντογενετικών σταδίων. Επίσης το γεγονός ότι η εκκόλαση των αυγών πραγματοποιείται σε σχετικά αδιαφοροποίητο στάδιο ανάπτυξης, και ακολουθείται από ένα εκτενές νυμφικό στάδιο, τη φάση της μεταμόρφωσης των νυμφών σε ιχθύδια και τη μετάβαση από το πλαγκτονικό στο βενθοπελαγικό τρόπο διαβίωσης (Spence *et al.* 2008), καθιστούν το zebrafish ιδανικό για τη μελέτη της έκφρασης της αναπτυξιακής πλαστικότητας.

1.3.1 Η οντογένεση του zebrafish

Η οντογένεση του zebrafish είναι πολύ καλά μελετημένη ενώ παράλληλα παρουσιάζει παρόμοιο πρότυπο ανάπτυξης με την πλειονότητα των τελεόστεων. Η οντογένεση στο zebrafish χωρίζεται στα εξής στάδια: στάδιο του εμβρύου (embryo), στάδιο της νύμφης (larva), στάδιο του ιχθυδίου (juvenile) και στο ενήλικο στάδιο (adult). Τα στάδια αυτά αποτελούν σημεία «σταθμούς» για τον κύκλο ζωής των ψαριών τόσο μορφολογικά όσο και λειτουργικά (Kendall 1984). Η διάρκεια του κάθε σταδίου καθώς και ο χρονισμός των οντογενετικών γεγονότων είναι σε άμεση

εξάρτηση με το περιβάλλον και ειδικά με τη θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται τα ψάρια. Ειδικά τα πρώτα οντογενετικά στάδια παρουσιάζουν μεγαλύτερη ευαισθησία στις μεταβολές των περιβαλλοντικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία, η περιεκτικότητα σε οξυγόνο ή η φωτοπερίοδος (Fuiman and Werner 2002).

Το εμβρυικό στάδιο (στάδιο του αβγού) ορίζεται από τη γονιμοποίηση μέχρι την εκκόλαψη (hatching). Με τη γονιμοποίηση ξεκινούν οι διαδοχικές αυλακώσεις των κυττάρων. Μετά τις πρώτες αυλακώσεις ($2^{1/4}$ hpf, ώρες μετά τη γονιμοποίηση), το έμβρυο εισέρχεται στο στάδιο του βλαστιδίου καθώς ο βλαστώδισκος σχηματίζει μια σφαιρική δομή που επικάθεται στη λέκιθο (Εικόνα 1.7-A). Η γαστριδίωση ξεκινά στο 50% της επιβολής όπου το βλαστώδερμα έχει καλύψει το 50% της απόστασης ανάμεσα στο ζωικό και φυτικό πόλο στις $5^{1/4}$ hpf (Εικόνα 1.7-C). Με το τέλος της επιβολής, το βλαστώδερμα πλέον καλύπτει τελείως το αβγό (100% επιβολή, Εικόνα 1.7-D). Η σωματογένεση ξεκινά στις 10 hpf (στάδιο 4-σωμιτών, Εικόνα 2.7-E) και ολοκληρώνεται μέχρι τις 22 hpf (στάδιο 22 σωμιτών, Εικόνα 1.7-F). Η εμβρυογένεση τελειώνει με την ολοκλήρωση του σταδίου του γαστριδίου και την εκκόλαψη.



Εικόνα 1.7: Στάδια της οντογένεσης του zebrafish. (A) Στάδιο των 64-κυττάρων, (B) Τέλος του σταδίου του βλαστιδίου (επιβολή έχει φτάσει στο 30%), (C) Έναρξη του σταδίου του γαστριδίου (50% επιβολής), (D) Τέλος του σταδίου του γαστριδίου (Bud stage, στάδιο ουράς) όπου η ουρά είναι εμφανής (100% επιβολής), (E) Αρχή γαστριδίωσης (στάδιο 4-σωμιτών), (F) Τέλος του σταδίου του γαστριδίου (στάδιο 20-σωμιτών). Εικόνες από Kimmel *et al.* (1994)

Η εκκόλαψη λαμβάνει μέρος στις 48-72 hpf. Κατά την εκκόλαψη, οι νύμφες έχουν μικρό βαθμό διαφοροποίησης και στηρίζονται στα μητρικής προέλευσης λεκιθικά αποθέματα. Το μοναδικό πτερύγιο που έχουν οι λεκιθοφόρες νύμφες είναι η πρωτογενής περιφερειακή πτερυγιοπτυχή. Η εκκόλαψη σηματοδοτείται από την εμφάνιση του προεξέχοντος στόματος (Εικόνα 1.8-A) (Kimmel *et al.* 1995, Parichy *et al.* 2009). Σύμφωνα με τους (Kimmel *et al.* 1995) στους $28,5^{\circ}\text{C}$ η εκκόλαψη διαρκεί από 48 έως 72 hpf. Ο χρονισμός της εκκόλαψης είναι σε άμεση σχέση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται τα έμβρυα (Kamler 2002) και

αποτελεί ένα στάδιο ορόσημο για την οντογένεση του zebrafish καθώς μετά από αυτήν ακολουθεί η μετάβαση από την ενδογενή θρέψη στην εξωγενή (απορρόφηση λεκιθικού σάκου) (Kendall 1984).

Το στάδιο της νύμφης (larva) οριοθετείται μεταξύ του τέλους του εμβρυικού σταδίου και μέχρι πριν την έναρξη του σταδίου του ιχθυδίου (~ μέχρι τις 45 dpf στους 28,5 °C) (Singleman and Holtzman 2014). Το στάδιο ξεκινά με την κάμψη της νωτοχορδής (από ~ 4.6 έως 6.3 mm SL, Εικόνα 1.8-B) και τελειώνει με το σχηματισμό των ακτινών των πτερυγίων. Κατά τη διάρκεια του νυμφικού σταδίου έντονες μορφολογικές αλλαγές λαμβάνουν μέρος, όπως η μεταμόρφωση του χρωματικού προτύπου του σώματος και των πτερυγίων, του σχήματος του κεφαλιού, της νυκτικής κύστης, του βαθμού οστεοποίησης των πτερυγίων και του βαθμού κάμψης της νωτοχορδής (Parichy *et al.* 2009).

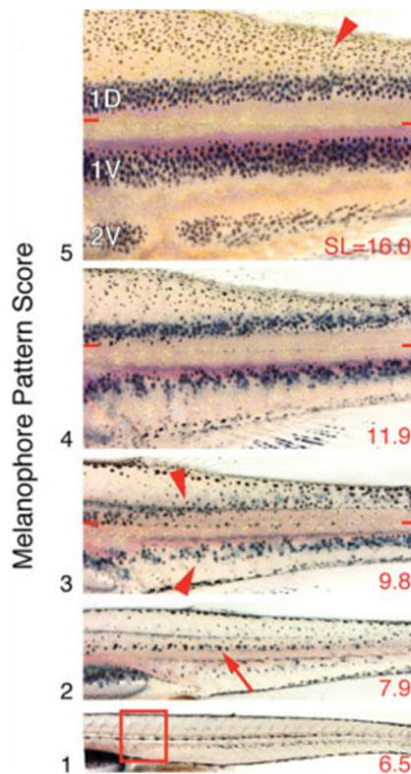


Εικόνα 1.8: (A) Εμφάνιση προεξέχοντος στόματος κατά την εκκόλαψη και (B) κάμψη της νωτοχορδής κατά το νυμφικό στάδιο. Με κόκκινα γράμματα απεικονίζονται οι μοίρες της κάμψης και το αντίστοιχο τυπικό μήκος (SL) του ψαριού. Εικόνα από Parichy *et al.* (2009).

Το στάδιο της μεταμόρφωσης (metamorphosis) αποτελεί ένα πολύ σημαντικό στάδιο ορόσημο για την οντογένεση των ψαριών, καθώς σηματοδοτεί το πέρασμα από το στάδιο της νύμφης στο στάδιο του ιχθυδίου (Webb 1999). Η μεταμόρφωση ολοκληρώνεται όταν το ψάρι έχει αποκτήσει όλα τα εξωτερικά χαρακτηριστικά του ιχθυδίου (Kendall 1984). Αν και δεν υπάρχουν πολλά πειραματικά δεδομένα για το καθορισμό του σταδίου της μεταμόρφωσης, το στάδιο αυτό έχει μέχρι τώρα συσχετιστεί με την αλλαγή του χρωματικού προτύπου της διασποράς των μελανοφόρων (Parichy and Turner 2003) (Εικόνα 1.9). Κατά τους (Parichy and Turner 2003) το πρότυπο διασποράς των μελονοφόρων στο zebrafish ενδείκνυται για

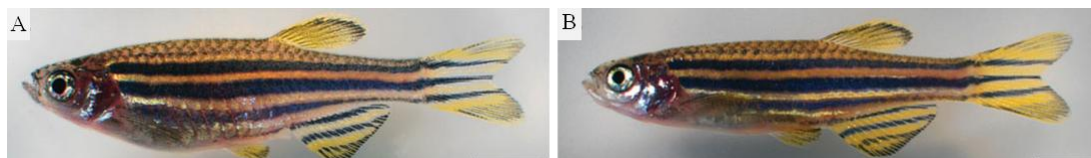
την αναγνώριση του σταδίου της μεταμόρφωσης καθώς κατά το στάδιο αυτό εμφανίζεται ένα το ενήλικο πρότυπο διασποράς των μελανοφόρων.

Στην Εικόνα 1.9 παρουσιάζεται η μεταβολή του χρωματικού προτύπου κατά μήκος του σώματος της αναπτυσσόμενης νύμφης μέχρι το στάδιο του ιχθυδίου όπως αποτυπώθηκε από τους Parichy *et al.* (2009). Η εμφάνιση των πρώτων ενήλικων μελανοφόρων ξεκινά στα ~ 6 mm SL (Εικόνα 1.9-1). Ο αριθμός των μεταμορφωτικών μελανοφόρων αυξάνει στα ~ 9 mm SL όταν οι δύο πρωταρχικές ενήλικες λωρίδες κάνουν την εμφάνισή τους (Εικόνα 1.9-3). Στα 12 mm SL, ο χρωματισμός των λωρίδων έχει ολοκληρωθεί με τη μετανάστευση μεταμορφωτικών μελανοφόρων προς αυτές, σηματοδοτώντας το στάδιο της μεταμόρφωσης (Εικόνα 1.9-4). Τέλος, μέχρι τα ~ 16 mm SL έχουν εμφανιστεί και οι δευτερεύουσες λωρίδες μελανοφόρων εκατέρωθεν των πρωταρχικών (Εικόνα 1.9-5), ενδεικτικές του σταδίου του ιχθυδίου. Το στάδιο του ιχθυδίου ολοκληρώνεται με την εμφάνιση όλων των χαρακτηριστικών που φέρει ένα ενήλικο άτομο, απουσίας της φυλετικής διαφοροποίησης (Webb 1999).



Εικόνα 1.9: Πρότυπο διασποράς μελανοφόρων κατά την ανάπτυξη του zebrafish. **1.** Στα 6.5 mm (standard length, SL) κάνουν την εμφάνισή τους τα πρώτα μεταμορφωτικά μελανοφόρα. **2.** Στα 7.9 mm SL, τα μελανοφόρα μεταμόρφωσης έχουν επεκταθεί ενώ διαφαίνονται ακόμα κάποια εναπομείναντα εμβρυικά μελανοφόρα (τόξο). **3.** Στα 9.8 mm SL έχουν αρχίσει να διαγράφονται οι δύο λωρίδες μελανοφόρων εκατέρωθεν μιας λωρίδας που δεν περιλαμβάνει μελανοκύτταρα. **4.** Στα 11.9 mm SL, οι δύο λωρίδες μελανοφόρων γίνονται ακόμα πιο έντονες. **5.** Στα 16 mm SL το πρότυπο διασποράς των μελανοφόρων που απεικονίζεται είναι χαρακτηριστικό του σταδίου του ιχθυδίου, με τις δύο λωρίδες μελανοφόρων (1D, 1V) και μιας τρίτης (2V) να ξεχωρίζουν, ενώ παράλληλα εντοπίζονται μελονοφόρα και στη ράχη και στα λέπια του ιχθυδίου. Εικόνα από Parichy *et al.* (2009).

Η έναρξη του ενήλικου σταδίου τοποθετείται περίπου στις 90 dpf. Το ενήλικο στάδιο καθορίζεται από την παραγωγή γαμετών και των δευτερογενών φυλετικών χαρακτηριστικών (στρογγυλή κοιλιά στα θηλυκά, διαφορές στο χρωματισμό του σώματος) τα οποία αρχίζουν και γίνονται ορατά στα 17.5 ± 0.6 mm SL για τα αρσενικά και στα 18.3 ± 0.7 mm SL για τα θηλυκά άτομα (Parichy *et al.* 2009) (Εικόνα 1.10).



Εικόνα 1.10: Ενήλικα zebrafish 23 mm SL. **A.** Θηλυκό, **B.** αρσενικό. Εκτός από την παραγωγή των γαμετών, τα ενήλικα άτομα χαρακτηρίζονται από κάποια δευτερογενή χαρακτηριστικά. Τα θηλυκά είναι πιο βαριά, με εξογκωμένη κοιλιά ενώ τα αρσενικά έχουν πιο υδροδυναμικό σώμα και εκφράζουν ένα κίτρινο χρωματισμό κοιλιακά. Scale bar = 0.4 mm. (Από Parichy *et al.* 2009).

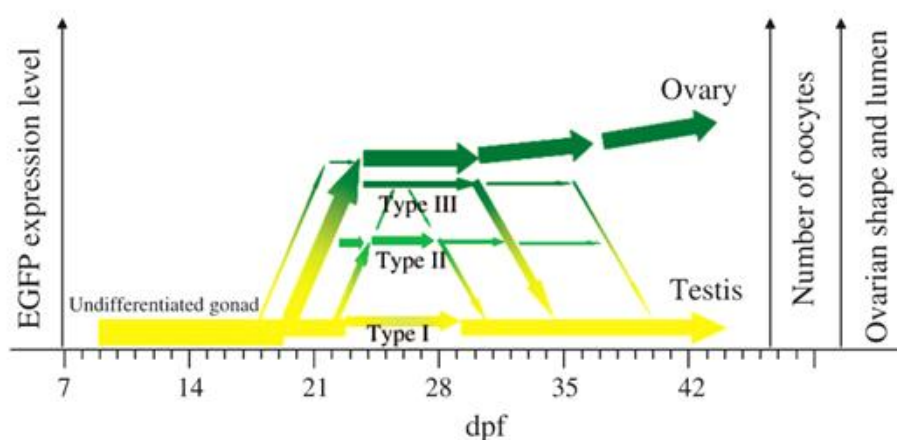
Η θερμοκρασία ανάπτυξης αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες μεταβολής του χρονισμού των οντογενετικών γεγονότων στα ψάρια μεταβάλλοντας τη σχέση ρυθμού αύξησης και διαφοροποίησης, επηρεάζοντας το μέγεθος στο οποίο συμβαίνουν τα διάφορα οντογενετικά γεγονότα. Οι Parichy *et al.* (2009) πρότειναν πως σε χαμηλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης (24°C) οι νύμφες μεταβαίνουν στα οντογενετικά στάδια ή αναπτύσσουν χαρακτήρες (π.χ. ανάπτυξη κοιλιακού πτερυγίου) σε μεγαλύτερα μήκη σώματος (§1.3.3).

1.3.2 Ο καθορισμός του φύλου και ο φυλετικός διμορφισμός στο zebrafish

Ως προς τον καθορισμό του φύλου, το zebrafish εμφανίζει το φαινόμενο του νεαικού «juvenile» ερμαφροδιτισμού. Το είδος αναπτύσσει αρχικά αδιαφοροποίητες γονάδες όμοιες με ωθήκες (στις 10-12 dpf) οι οποίες είτε θα ωριμάσουν δίνοντας θηλυκά άτομα, είτε θα αναστραφούν σε όρχεις, μέσω απόπτωσης των ωοκυττάρων, δίνοντας τελικά αρσενικά άτομα (διαφοροποίηση λαμβάνει μέρος στις 23-25 dpf) (Uchida *et al.* 2002). Η απόπτωση των ωοκυττάρων ελέγχεται από την αρωματάση P450 της οποίας η αυξημένη έκφραση οδηγεί σε διαφοροποίηση των γονάδων σε ωθήκες, ενώ η μειωμένη έκφρασή της έχει παρατηρηθεί να προκαλεί διαφοροποίηση της νεανικής ωθήκης (juvenile ovary) σε όρχεις (Guiguen *et al.* 2010). Η απόπτωση των ωοκυττάρων και η απενεργοποίηση της P450 με αποτέλεσμα τη διαφοροποίηση των κυττάρων σε σπερματογόνια, είναι σε άμεση εξάρτηση με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Συγκεκριμένα, η ανάπτυξη των ιχθυδίων κατά την περίοδο της διαφοροποίησης των γονάδων σε υψηλές θερμοκρασίες οδηγεί σε αύξηση της απόπτωσης των ωοκυττάρων και μείωση της δραστηριότητας της αρωματάσης (Uchida *et al.* 2004, Guiguen *et al.* 2010). Ο θερμο-εξαρτώμενος φυλοκαθορισμός (TSD, Temperature-dependent Sex Determination) αποτελεί το πιο κοινό τύπο περιβαλλοντικού καθορισμού του φύλου (ESD, Environmental Sex Determination) κατά τον οποίο το φύλο ενός ατόμου καθορίζεται από τις θερμοκρασιακές συνθήκες του περιβάλλοντος κατά την πρώιμη ανάπτυξη. Κατά τους Shang *et al.* (2006), η

θερμοευαίσθητη περίοδος του φυλετικού καθορισμού στο zebrafish είναι από τις 10 μέχρι τις 42 dpf (μέρες μετά την εκκόλαψη).

Ο χρονισμός της μετατροπής της «νεανικής ωοθήκης» σε αρσενική, καθώς και η διάρκεια παραμονής σε αυτό το στάδιο ποικίλουν σημαντικά στα αρσενικά άτομα του είδους (Wang *et al.* 2007). Οι Wang *et al.* (2007) πρότειναν πως βάσει της έκφρασης φθορισμού (ενδεικτικής του αριθμού ωοκυττάρων) κατά το στάδιο της «νεανικής ωοθήκης», τα αρσενικά κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες οι οποίες διαφέρουν ως προς τη δέσμευσή τους για θηλυκοποίηση (Εικόνα 1.11). Οι συγγραφείς προτείνουν πως η ποικιλομορφία αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στους διάφορους ανασταλτικούς μηχανισμούς που επιστρατεύονται για την καταστολή της διαφοροποίησης των ωοκυττάρων, είτε λόγω της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων.



Εικόνα 1.11: Το μοντέλο της διαφοροποίησης των γονάδων στο zebrafish επιδεικνύει μεγάλη ποικιλομορφία ως προς το χρονισμό και τη διάρκεια της μετατροπής. Η αυξανόμενη ένταση φθορισμού (EGFP) υποδηλώνει αύξηση του αριθμού των ωοκυττάρων και την ανάπτυξη της ωοθήκης ενώ η μειωμένη ένταση φθορισμού υποδεικνύει την απόπτωση των ωοκυττάρων και τη μετατροπή της «νεανικής ωοθήκης» σε όρχεις. Κατά το στάδιο αυτό, τα αρσενικά χωρίστηκαν σε τρεις τύπους με βάση το επίπεδο έκφρασης φθορισμού. (Εικόνα από Wang *et al.*, 2007).

Ο καθορισμός του φύλου και η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης συζητείται αναλυτικά στα επόμενα κεφάλαια (§4.5, Συζήτηση). Ως προς τα υπόλοιπα αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά, ο φυλετικός διμορφισμός των ενήλικων zebrafish, είναι έκδηλος σε μια πληθώρα χαρακτήρων και επιπέδων βιολογικής οργάνωσης. Χαρακτήρες όπως η αναπαραγωγική συμπεριφορά (Spence *et al.* 2008), αλλά και η απόκριση στο stress (Ampatzis and Dermon 2016) έχουν βρεθεί να διαφοροποιούνται σημαντικά στα δύο φύλα. Παράλληλα, η διαφορετική μορφολογία των θηλυκών έναντι των αρσενικών ατόμων ως προς το σχήμα σώματος και τους μεριστικούς χαρακτήρες επηρεάζει σημαντικά την κολυμβητική ικανότητα (Conradsen and McGuigan 2015). Η ταχύτητα κολύμβησης μεταξύ των φύλων βρέθηκε να διαφοροποιείται και μετά από ανάπτυξη των ατόμων στους 31°C (Leris *et al.* 2013). Διαφυλετικές διαφορές έχουν επίσης παρατηρηθεί σε γονίδια που ρυθμίζουν το μεταβολισμό του zebrafish (έκφραση διαφόρων γονιδίων του ήπατος που σχετίζονται με τον οξειδωτικό μεταβολισμό και με την παραγωγή ενέργειας) (Robison *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2012). Τέλος, ως προς το καρδιαγγειακό σύστημα, η δύναμη διαστολής

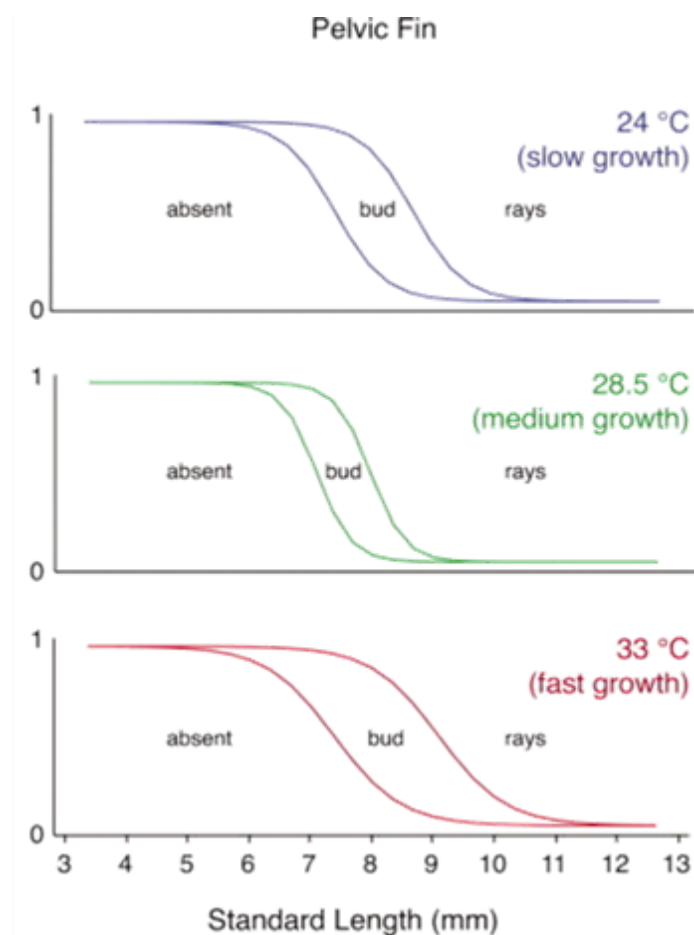
της κοιλίας των θηλυκών ατόμων έχει βρεθεί πιο χαμηλή σε σχέση με τα αρσενικά άτομα, υποδεικνύοντας πως η πλήρωση της καρδιάς με αίμα στα θηλυκά άτομα βασίζεται κυρίως στη συστολή του κόλπου (Wang *et al.* 2017).

1.3.3 Θερμοκρασιακή πλαστικότητα του zebrafish

Στο zebrafish, ο μικρός χρόνος γενεάς, καθώς και η ευαισθησία των πρώιμων οντογενετικών σταδίων στους μεταβαλλόμενους περιβαλλοντικούς παράγοντες, το καθιστούν ιδανικό οργανισμό-μοντέλο για την μελέτη της θερμοεξαρτώμενης πλαστικότητας.

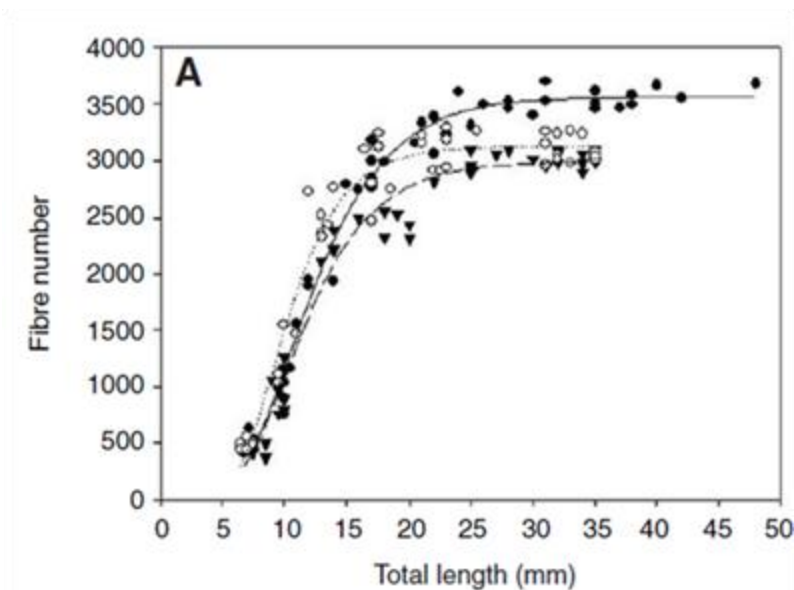
Η θερμοκρασία ανάπτυξης έχει ήδη αποδειχτεί πως προκαλεί πλαστικότητα σε μια σειρά από χαρακτήρες του zebrafish. Ως προς τη θερμοκρασιακή πλαστικότητα του καθορισμού του φύλου, υψηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης οδηγούν σε «αρρενοποίηση» εκτρεφόμενων zebrafish κατά ένα οικογενειακά-καθοριζόμενο τρόπο μέσω μετα-μεταφραστικών επιγενετικών τροποποιήσεων (Ribas and Liew 2017). Ως προς την ανάπτυξη, αναλόγως της θερμοκρασίας στην οποία μεγαλώνουν τα ψάρια, αλλάζει και ο χρονισμός της οντογένεσης. Πιο συγκεκριμένα, στο zebrafish, ψάρια που έχουν την ίδια χρονολογική ηλικία παρουσιάζουν μεγάλη ποικιλομορφία στο μήκος σώματος και στην ανάπτυξη των μεριστικών χαρακτήρων λόγω διαφορετικών θερμοκρασιών ανάπτυξης (π.χ. κοιλιακό πτερύγιο, Εικόνα 1.12) (Parichy *et al.* 2009). Σε μια άλλη εργασία, ιχθύδια zebrafish που αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στο σχήμα σώματος και στους μεριστικούς χαρακτήρες (ακτίνες πτερυγίων) (Sfakianakis *et al.* 2011). Στα ενήλικα, η θερμοκρασία ανάπτυξης και το φύλο διαφοροποίησε σημαντικά το σχήμα σώματος των ατόμων που αναπτύχθηκαν στους 22 °C έναντι αυτών που αναπτύχθηκαν στους 28 και 32 °C (Georga and Koumoundouros 2010).

Η παρατηρούμενη ποικιλομορφία στη μορφολογία σώματος σε απόκριση της θερμοκρασίας ανάπτυξης οφείλεται στη θερμοκρασιακή πλαστικότητα του προτύπου ανάπτυξης των μυών αλλά και των οστών (Wimberger 1992). Πιο συγκεκριμένα, στο zebrafish, έχει αποδειχτεί πως η θερμοκρασία κατά την πρώιμη ανάπτυξη επηρεάζει την ανάπτυξη και τη δομή των μυών των ενήλικων ατόμων (Johnston *et al.* 2009). Ψάρια που αναπτύχθηκαν στους 22 °C ολοκλήρωσαν την παραγωγή των λευκών μυϊκών ινών μέχρι το ολικό μήκος σώματός (TL) να φτάσει τα 25 mm, ενώ ψάρια που μεγάλωσαν στους 26 °C και 31 °C ολοκλήρωσαν την παραγωγή των λευκών μυϊκών ινών σε TL = 28mm και 23mm, αντίστοιχα. Παράλληλα, ο τελικός αριθμός των λευκών μυϊκών ινών για τα άτομα που αναπτύχθηκαν στους 26 °C ήταν σημαντικά μεγαλύτερος αυτών που αναπτύχθηκαν στους 22 και 31 °C (Εικόνα 1.13). Επιπλέον, έχουν παρατηρηθεί μεταβολές στην πυκνότητα των μιτοχονδρίων, στη διαφοροποίηση των λευκών και κόκκινων μυϊκών ινών, στη διάμετρό τους, καθώς και στην πυκνότητα και την έκταση που καλύπτουν οι λευκές μυϊκές ίνες (Johnston 2006, Johnston *et al.* 2009).



Εικόνα 1.12: Η θερμοκρασία ανάπτυξης επιδρά στη σχέση τυπικού μήκους (SL) και της ανάπτυξης του κοιλιακού πτερυγίου. Απεικονίζεται η οντογένεση του κοιλιακού πτερυγίου σε νύμφες που αναπτύχθηκαν στους 24 °C, στους 28.5 °C και στους 33 °C. Στα ψάρια που αναπτύχθηκαν στους 24 °C η ανάπτυξη του κοιλιακού πτερυγίου έλαβε μέρος σε μεγαλύτερα μεγέθη σώματος σε σχέση με την ανάπτυξη στους 28.5 °C. Στα ψάρια που αναπτύχθηκαν στους 33 °C το μέγεθος στο οποίο υποβλήθηκαν στη μετάβαση του πτερυγίου εμφάνισε μεγάλη ποικιλομορφία (Εικόνα από Parichy *et al.*, 2009).

Στην εργασία τους, οι Scott and Johnston (2012) εξέτασαν την επίδραση της θερμοκρασίας (22, 27 και 32 °C) στη θερμική ανοχή (μέσω υπολογισμού της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης) του zebrafish επιδρώντας μόνο για ένα πολύ μικρό διάστημα από τη γονιμοποίηση μέχρι την εκκόλαψη. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η κολυμβητική επίδοση των ψαριών σε νερά χαμηλής ή υψηλής θερμοκρασίας διαφοροποιήθηκε ανάλογα με τη θερμοκρασία ανάπτυξης. Παράλληλα, μετά από εγκλιματισμό στους 16 °C, η κολυμβητική επίδοση στο κρύο ήταν κατά 20% καλύτερη για τα άτομα που αναπτύχθηκαν στους 32 °C και 22 °C σε σχέση με αυτά που αναπτύχθηκαν στους 27 °C. Οι διαφορές αυτές συσχετίστηκαν με την έκφραση γονιδίων, το μεταβολισμό και τη σύσταση των μυών.



Εικόνα 1.13: Απεικονίζεται η σχέση του ολικού μήκους σώματος (TL) και του αριθμού λευκών μυικών ινών για τις θερμοκρασίες ανάπτυξης στους 22°C (n=41, γεμάτα τρίγωνα) 26°C (n=44, γεμάτοι κύκλοι) και 31°C (n=46, άδειοι κύκλοι). Εικόνα από Johnston *et al.* (2009).

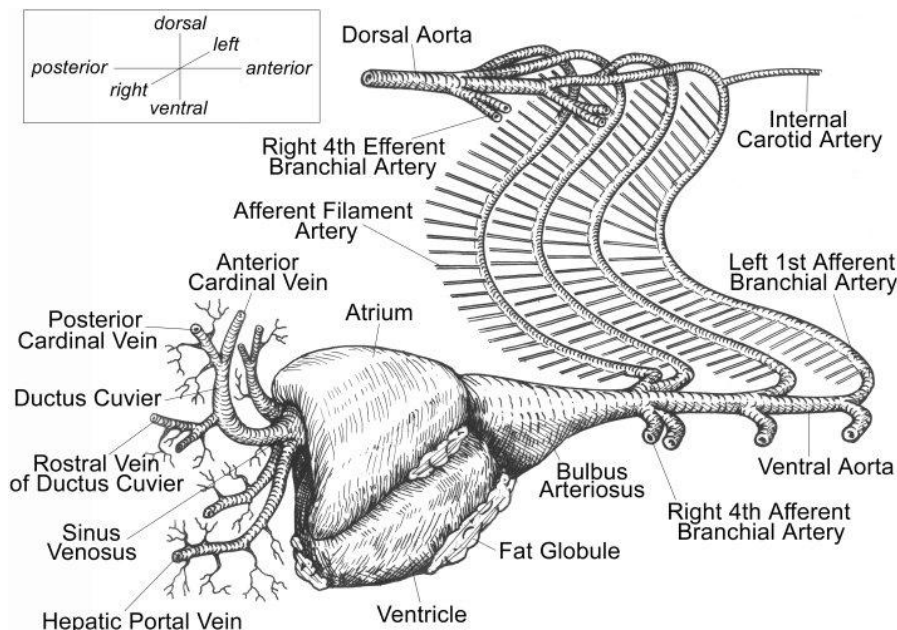
Παρά τη μεγάλη σημασία που έχει η καρδιά στην κολύμβηση των ψαριών, δεν έχει εξεταστεί μέχρι τώρα, από όσο ξέρουμε, η πλαστική της απόκριση έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης. Στην εργασία τους, οι Hicken *et al.* (2011) μελέτησαν την πλαστική απόκριση που έχει η καρδιά των ενήλικων zebrafish μετά από έκθεση σε υποθνησιγόνα ποσότητα πετρελαιοειδών κατά το εμβρυικό στάδιο ανάπτυξης. Οι τελευταίοι συσχέτισαν την έκθεση σε πετρελαιοειδή με μειωμένη κολυμβητική ικανότητα και με πιο κυκλικό σχήμα κοιλίας στα ενήλικα.

1.4 Η καρδιά των τελεόστεων

Η καρδιά είναι το πρώτο όργανο που σχηματίζεται και λειτουργεί στα έμβρυα των σπονδυλωτών (Pelster 2002, Yalcin *et al.* 2017). Στους τελεόστεους, η καρδιά είναι δίχωρη και αποτελείται από τον καρδιακό κόλπο και την κοιλία. Ένας αρτηριακός βολβός βρίσκεται μπροστά από την κοιλία, και ο κόλπος δέχεται αίμα από το φλεβώδη κόλπο που είναι ο πρώτος θάλαμος που δέχεται το αίμα από την ηπατική κυκλοφορία (Εικόνα 1.14) (Singleman and Holtzman 2012).

Φλεβικό αίμα (μη οξυγονωμένο) από την ηπατική κυκλοφορία και τους σωλήνες του Cuvier συγκεντρώνεται στο φλεβώδη κόλπο ο οποίος παρέχει μια σταθερή ροή του αίματος προς την καρδιά. Ο καρδιακός κόλπος είναι πολύ μεγαλύτερος από τον φλεβώδη και επιταχύνει τη ροή του αίματος. Βρίσκεται νωτιαία της κοιλίας, στην οποία ωθείται το αίμα μέσω της κολποκοιλιακής οπής, που φέρει δύο μεμβρανώδεις βαλβίδες. Η κοιλία έχει παχιά μυϊκά τοιχώματα και έχει σχήμα κώνου στους τελεόστεους. Σε αντίθεση με τον καρδιακό κόλπο ή την κοιλία, ο αρτηριακός βολβός δεν επιταχύνει τη ροή του αίματος. Τα τοιχώματα του αορτικού βολβού αποτελούνται από ελαστικό ιστό και λείους μύες. Η λειτουργία του είναι σημαντική αφού διατηρεί σταθερή τη ροή του αίματος προς τα αγγεία των βραγχίων κατά την καρδιακή

σύσπαση, μέσω του μηχανισμού που διαθέτει να διαστέλλεται και να επανέρχεται στο αρχικό του σχήμα (Icardo *et al.* 1999, Braun *et al.* 2003, Evans *et al.* 2003).



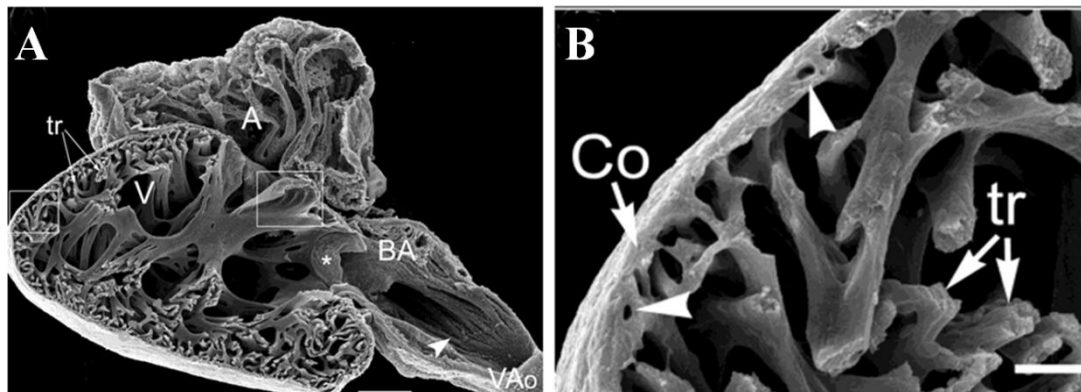
Εικόνα 1.14: Απεικόνιση της καρδιάς και των αγγείων του καρδιαγγειακού συστήματος ενήλικου zebrafish. Ο κόλπος (atrium) δέχεται το αίμα από το φλεβώδη κόλπο (sinus venosus) ο οποίος συνδέεται με τους σωλήνες του Cuvier και τις ηπατικές αρτηρίες. Η καρδιά ωθεί το αίμα στον αρτηριακό βολβό (bulbus arteriosus) κατά μήκος του κόλπου και της κοιλίας. Η κοιλία ωθεί το αίμα στην κοιλιακή αορτή (ventral aorta) η οποία στη συνέχεια διακλαδώνεται σε βραγχιακά τόξα (branchials) τα οποία εκτείνονται προς τα πάνω μέσα στα βράγχια και σχηματίζουν τη ραχιαία αορτή (dorsal aorta). Εικόνα από Hu *et al.* (2001).

1.4.1 Η δομή της κοιλίας και του αορτικού βολβού στο zebrafish

Η κοιλία στο zebrafish όπως και σε άλλα είδη τελεόστεων αποτελείται από ένα εξωτερικό στρώμα καρδιομυοκυττάρων γνωστό ως συμπαγές μυοκάρδιο (με εκτεταμένες και επιμηκυσμένες δοκίδες-trabeculae) το οποίο δέχεται οξυγόνο και θρεπτικά από την στεφανιαία κυκλοφορία και περικλείει το σπογγώδες μυοκάρδιο. Το τελευταίο αποτελείται από ένα μεγάλο δίκτυο από δοκίδες που εκτείνονται σε όλη την κοιλότητα (lumen) της κοιλίας και αιματώνεται από το φλεβικό αίμα το οποίο και αντλεί (καρδιά τύπου 2, Εικόνα 1.15-B) (Tota 1983, Davie and Farrell 1991, Farrell and Jones 1992). Οι δοκίδες αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό της κοιλιακής μάζας και διατηρούν τη δομή της καρδιάς κατά τη διάρκεια της συστολικής και της διαστολικής κίνησης. Οι πτυχώσεις των δοκίδων και η οργάνωσή τους ενισχύουν τη δύναμη άντλησης αίματος κατά την κοιλιακή συστολή (Icardo and Fernandez-Teran 1987, Sanchez-Quintana and Hurlle 1987, Hu *et al.* 2000).

Η καρδιακή λειτουργία, εξαρτάται από το μηχανισμό Frank-Starling και το νόμο του Laplace. Η λειτουργία κάθε ενός θαλάμου εξαρτάται από τις υδροδυναμικές του ιδιότητες (πίεση που ασκείται στο θάλαμο, αντίσταση τοιχωμάτων) (Regen 1988). Το πυραμιδικό σχήμα της κοιλίας στο zebrafish είναι πλεονεκτικό για την ανάπτυξη

πίεσης καθώς η κορυφή (apex) έχει μικρή ακτίνα καμπυλότητας (Farrell and Jones 1992).



Εικόνα 1.15: (A) Εγκάρσια τομή από ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης σε καρδιά zebrafish και (B) η μεγέθυνση της. Απεικονίζονται ο κόλπος (A), η κοιλία (V), ένα κομμάτι της αορτής (VAo), ο αρτηριακός βολβός (BA), οι δοκίδες του σπογγώδους μυοκαρδίου (tr), και το συμπαγές (Co) μυοκάρδιο. Τα βέλη στο (B) υποδεικνύουν τα στεφανιαία αγγεία μέσα στο συμπαγές (compact) μυοκάρδιο. Εικόνα από Hu *et al.* (2001).

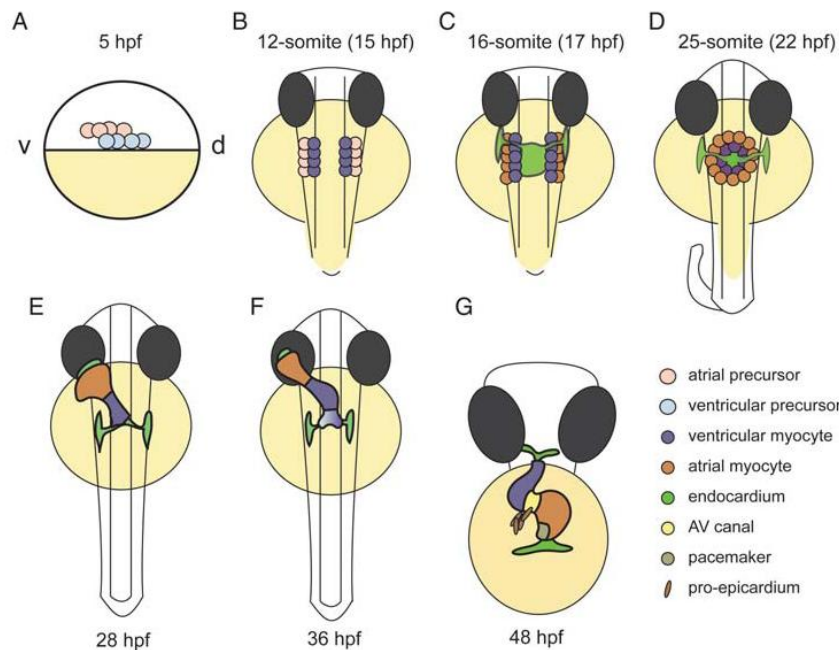
Το τοίχωμα του αρτηριακού βολβού αποτελείται από ένα συμπαγές μυϊκό αγγειακό σύστημα το οποίο εκβάλλει στην κοιλιακή αορτή (Εικόνα 1.12-A). Ο αρτηριακός βολβός αποτελείται από τρία στρώματα: το εξωτερικό, το μεσαίο και το εσωτερικό στρώμα. Το εξωτερικό στρώμα αποτελείται από διάσπαρτες στρώσεις ελαστικού ιστού που ακολουθούνται από 7 έως 10 στρώματα ελικοειδώς διατεταγμένου λείου μυός που περιβάλλεται από ένα λεπτό δίκτυο κολλαγόνου και δικτυωτών ινιδίων (reticular fibrils) στο μέσο. Το εσωτερικό στρώμα αποτελείται από το υπο-ενδοθήλιο (sub-endothelium) το οποίο συνιστούν κολλαγόνο, δικτυωτά ινίδια, ελαστικές ίνες και κύτταρα λείου μυός που συνδέονται από ένα λεπτό ενδοθηλιακό στρώμα (Hu and Keller 1995).

Η διατήρηση της πίεσης του αίματος αποτελεί βασική παράμετρο του καρδιαγγειακού συστήματος στο zebrafish. Το αίμα ωθείται προς την κοιλία χάρη στη διαφορά πίεσης όπου και αναγνωρίζει την βαλβίδα αορτικού βολβού-κοιλίας ως σημάδι αντίστασης για την πλήρωση της κοιλίας με αίμα (Hu *et al.* 2001). Ο αρτηριακός βολβός είναι μη συσταλτικός, και εκτείνεται με κάθε συστολή της κοιλίας, ενώ κατά τη διαστολή επιστρέφει στο κανονικό του μέγεθος. Η ελαστικότητα αυτή του αορτικού βολβού εξομαλύνει την πίεση του αίματος κατά τη συστολή στα λεπτά αγγεία των βραγχίων και καθιστά τη διατήρηση μιας σταθερής ροής απαραίτητης για την επαρκή ανταλλαγή αερίων (Johansen 1965, Nakazawa *et al.* 1986, Farrell and Jones 1992).

1.4.2 Οντογένεση της καρδιάς στο zebrafish

Η οντογένεση της καρδιάς ξεκινά με τη διαφοροποίηση των κυττάρων του μουοκαρδίου και του ενδοκαρδίου. Στο στάδιο του γαστριδίου (gastrulation) τα προγονικά κύτταρα του κόλπου και της κοιλίας είναι τοποθετημένα αμφίπλευρα, κοιλιακά και νωτιαία (Εικόνα 1.16-A) (Stainier *et al.* 1993, Keegan *et al.* 2004). Σε

αυτό το στάδιο, τα προγονικά κύτταρα του ενδοκαρδίου (κόλπου και κοιλίας) δεν παρουσιάζουν κάποια οργάνωση. Στη συνέχεια, η κυτταρική διαφοροποίηση συνεχίζεται στην εμπρόσθια μεσοδερμική πλάγια πλάκα (anterior later plate mesoderm, ALPM) με τα κύτταρα του μυοκαρδίου να αναδιοργανώνονται πλευρικά: σε αυτό το σημείο τα μέσα κύτταρα εκφράζουν τη βαριά αλυσίδα μυοσίνης της κοιλίας (*ventricle myosin heavy chain, vmhc*), ενώ τα εξωτερικά πλευρικά, τη βαριά αλυσίδα μυοσίνης τους κόλπου (*atrial myosin heavy chain, myh6/amhc*) (Εικόνα 1.16-B). Στις 17 ώρες μετά τη γονιμοποίησης (hpf, hours post fertilization), ο ιστός του μυοκαρδίου επεκτείνεται πλευρικά με τη διαφοροποίηση των μελλοντικών κυττάρων του κόλπου του μυοκαρδίου (Εικόνα 1.16-C).



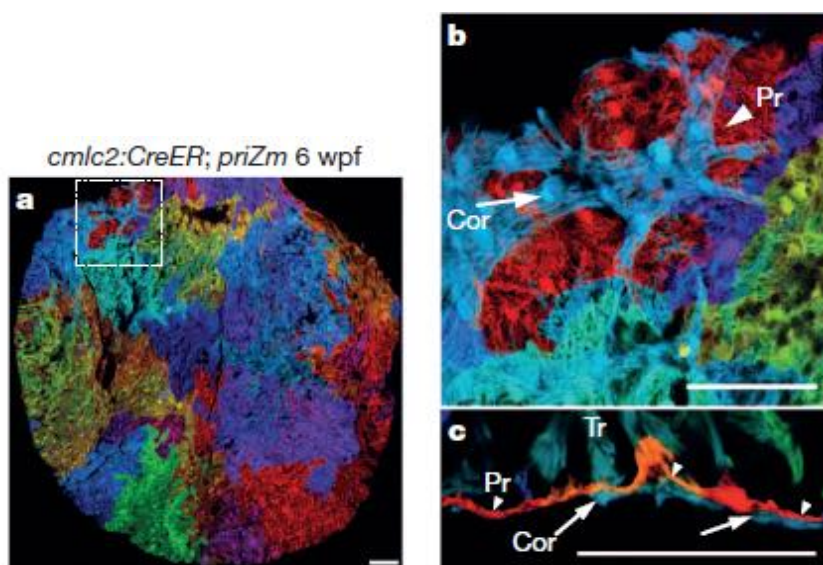
Εικόνα 1.16: Στάδια οντογένεσης της καρδιάς του zebrafish. (A) Στις 5 hpf το βλαστίδιο (άσπρο χρώμα) καλύπτει περίπου το 50% του εμβρύου. Σε αυτό το στάδιο, τα καρδιακά προγονικά κύτταρα (cardiac progenitor cells) βρίσκονται αμφίπλευρα στην πλευρική περιθωριακή ζώνη. Τα προγονικά κύτταρα του κόλπου (ροζ) βρίσκονται πιο κοιλιακά από τα προγονικά κύτταρα της κοιλίας (ανοιχτό μπλε). (B) Στις 15 hpf, τα καρδιακά προγονικά κύτταρα μετακινούνται στη μέση γραμμή (mid-line) για να αποτελέσουν την εμπρόσθια μεσοδερμική πλάγια πλάκα (ALPM; anterior later plate mesoderm). Η κυτταρική διαφοροποίηση ξεκινά από τα μελλοντικά κύτταρα του μυοκαρδίου κοιλίας με την έκφραση μυοσινών (μώβ). (C) Ο ιστός του μυοκαρδίου επεκτείνεται με συνεχή διαφοροποίηση στις πιο πλευρικές περιοχές του ALPM μέσω της διαφοροποίησης κυρίως των μελλοντικών κυττάρων του κόλπου (πορτοκαλί). Παράλληλα, τα κύτταρα του ενδοκαρδίου (πράσινο) έχουν μεταναστεύσει από το ALPM προς τη μέση γραμμή ενώ τα κύτταρα του μυοκαρδίου θα μεταναστεύσουν αργότερα. (D). Όταν όλα τα είδη των κυττάρων μεταναστεύσουν στη μέση γραμμή, σχηματίζουν ένα δίσκο με τα κύτταρα του ενδοκαρδίου στη μέση, τα κύτταρα μυοκαρδίου κοιλίας στο ενδιάμεσο, και τα κύτταρα μυοκαρδίου του κόλπου στην περιφέρεια. Η μορφογένεση της καρδιάς μετατρέπει τον καρδιακό δίσκο σε καρδιακό σωλήνα. (E) Στις 28 hpf, ο γραμμικός σωλήνας έχει σχηματιστεί με τον φλεβικό πόλο (venous pole) τοποθετημένο στο αριστερό πρόσθιο κομμάτι, και τον αρτηριακό πόλο να έχει σταθεροποιηθεί στο mid-line. (F) Η διαφοροποίηση συνεχίζεται με νέα καρδιο-μυοκύτταρα (διαβαθμισμένο μωβ) να προστίθενται στον αρτηριακό πόλο. Στις 36 hpf έχει ξεκινήσει η «περιτύλιξη» (looping) της καρδιάς, με την κοιλία να μετατοπίζεται προς τη μέση γραμμή και τον καρδιακό σωλήνα να σχηματίζει ένα βρόχο σχήματος S. (G) Τα ελλειψοειδή προ-επικαρδιακά κύτταρα (καφέ) βρίσκονται κοντά στο κανάλι AV (κίτρινο), από όπου αρχίζουν να καλύπτουν το μυοκάριο με ένα επικαρδιακό στρώμα. Ο βηματοδότης (pacemaker) βρίσκεται κοντά στον φλεβικό πόλο (σκούρο πράσινο). hpf, hours post fertilization. Εικόνα από Bakkers (2011).

Στις 22 hpf, τα μελλοντικά κύτταρα του κόλπου περικλύουν τα μελλοντικά κύτταρα της κοιλίας με κατεύθυνση προς το κέντρο της μέσης γραμμής σχηματίζοντας ένα δίσκο όπου το μελλοντικά κύτταρα του ενδοκαρδίου είναι τοποθετημένα στο κέντρο (fusion) (Εικόνα 1.16-D). Με τη δημιουργία του δίσκου, η οντογένεση της καρδιάς παύει να είναι συμμετρική και ξεκινά η δημιουργία και περιστροφή του καρδιακού σωλήνα, με τον φλεβικό πόλο (venous pole) τοποθετημένο στην αριστερή πλευρά και τον αρτηριακό πόλο (arterial pole) να είναι ακόμα στη μέση γραμμή (Εικόνα 1.16-E). Με την ολοκλήρωση της δημιουργίας του καρδιακού σωλήνα, αυτός κάμπτεται προς τα δεξιά (cardiac looping) και οι δύο χώροι της καρδιάς, ο κόλπος και η κοιλία είναι πλέον ευδιάκριτοι (chamber ballooning) (Voronov *et al.* 2004). Το στάδιο αυτό χαρακτηρίζεται από έκφραση του κολπικού νατριουρητικού πεπτιδίου (*natriuretic peptide type A, nppa*) που εκφράζεται στην εξωτερική πλευρά (outer curvature) του μυκαρδίου (Auman *et al.* 2007), ενώ μετά τη δημιουργία του καρδιακού σωλήνα (30 hpf), η κυτταρική διαφοροποίηση συνεχίζει στον αρτηριακό πόλο (Yelon *et al.* 1999) (Εικόνα 1.16-F). Κατά τη μορφογένεση των καρδιακών χώρων, λαμβάνουν μέρος στην εξωτερική πλευρά του μυκαρδίου αλλαγές στο σχήμα των κυττάρων ενώ η ροή του αίματος κατά την ανάπτυξη της κοιλίας προκαλεί την επιμύκνιση των καρδιο-μυοκυττάρων οδηγώντας στη δημιουργία της εξωτερικής πλευράς του μυκαρδίου (Auman *et al.* 2007).

Στο zebrafish συναντάται μια βαλβίδα στο κολποκοιλιακό κανάλι (AV canal) και μια μεταξύ του αρτηριακού βολβού και της κοιλίας. Η οντογένεση των βαλβίδων ξεκινά με τη διαφοροποίηση των κυττάρων του ενδοκαρδίου στο κολποκοιλιακό κανάλι στις 36 hpf, όταν φολιδωτά κύτταρα του ενδοκαρδίου μετατρέπονται σε κυβοειδή, εκφράζοντας την *Dm-grasp* (Beis *et al.* 2005). Στις 40 hpf, αρχίζει ο σχηματισμός των πρώιμων φύλλων (valve leaflets), τα οποία διασφαλίζουν τη ροή του αίματος προς μια μόνο κατεύθυνση (Yalcin *et al.* 2017). Στο zebrafish, στη δημιουργία των βαλβίδων συμμετέχουν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια (Notch, nfat, ErbB, Tgf-b) αλλά και αιμοδυναμικές δυνάμεις (Chang *et al.* 2004, Timmerman *et al.* 2004, Beis *et al.* 2005, Scherz *et al.* 2008, Yalcin *et al.* 2017).

Στις 60 hpf, στο zebrafish, ξεκινά ο σχηματισμός των δοκίδων (trabeculation) όπου οι προεξοχές του μυοκαρδίου ξεκινούν να εμφανίζονται στην κοιλότητα της καρδιάς (Sedmera *et al.* 2000). Οι δοκίδες αυτές σχηματίζουν ένα δίκτυο μέσα στην κοιλότητα το οποίο αποτελείται από κύτταρα του μυοκαρδίου και καλύπτεται από ένα στρώμα ενδοκαρδίου. Οι δοκίδες αυξάνουν την καρδιακή παροχή και την πρόσληψη οξυγόνου στο εμβρυικό μυοκάρδιο, με το μέγεθος της καρδιάς να παραμένει αμετάβλητο (Liu *et al.* 2010). Κατά την οντογένεση, οι δοκίδες υπόκεινται σε έντονη αναδιαμόρφωση μαζί με τον πολλαπλασιασμό του συμπαγούς μυοκαρδίου, τη δημιουργία των στεφανιαίων αρτηριών, και την ολοκλήρωση του συστήματος αγωγιμότητας (conduction system) (Samsa *et al.* 2013).

Με τη μέθοδο της συνεστιακής μικροσκοπίας (confocal microscopy) έχουν αναγνωριστεί δύο διαφορετικά οντογενετικά είδη μυοκαρδίου να συνθέτουν τα τοιχώματα της κοιλίας των ενήλικων ατόμων (Gupta and Poss 2012). Η απεικόνιση της κοιλίας ιχθυδίων zebrafish ηλικίας έξι εβδομάδων μετά τη γονιμοποίηση (wpf, weeks post fertilization) αποδεικνύει την εναπόθεση ενός νέου στρώματος κλώνων κυττάρων το οποίο προέρχεται από ένα συγκεκριμένο αριθμό μυοκυττάρων (Εικόνα 1.17-ab). Οι συγγραφείς αναφέρονται στο εσωτερικό του μυϊκού τοιχώματος ως το «αρχέγονο στρώμα» (primordial layer) καθώς διατηρεί τη χαρακτηριστική μονόστρωμη στοιβάδα μυοκυττάρων της εμβρυϊκής κοιλίας καθόλη τη διάρκεια της ανάπτυξής του. Στην νέα εξωτερική στοιβάδα αναφέρονται ως το «φλοιώδες στρώμα» (cortical layer). Στο σύνολο λοιπόν, οι κυτταρικές γραμμές του μυοκαρδίου της κοιλίας που εντοπίζονται στα ενήλικα zebrafish είναι του αρχέγονου μύ (primordial), του φλοιώδη (cortical) και του δοκιδωτού (trabecular) (Εικόνα 1.17-c).



Εικόνα 1.17: Είδη μυοκυττάρων επισημασμένα με τη μέθοδο της συνεστιακής μικροσκοπίας σε 6 wpf zebrafish *cm1c2:CreER; priZm*. Cor, μυοκύτταρα φλοιώδους στρώματος (κόκκινο χρώμα), Pri, μυοκύτταρα αρχέγονου στρώματος, Tr, μυοκύτταρα δοκιδωτών. wpf, εβδομάδες μετά τη γονιμοποίηση. Scale bars= 50 μm. Εικόνα από Gupta and Poss (2012).

Κατά την οντογένεση της καρδιάς του zebrafish, λαμβάνουν μέρος μηχανισμοί όπως η υπερτροφία και η υπερπλασία με ρόλους - κλειδί στην αύξηση του καρδιακού μύ (Gamperl and Farrell 2004). Διάφορες ομάδες έχουν εστιάσει στον πιθανό ρόλο των δύο αυτών μηχανισμών στην οντογένεση της καρδιάς των ψαριών. Τελικά αποδεικνύεται πως οι μηχανισμοί ανάπτυξης της καρδιάς στα ψάρια ποικίλλουν. Για παράδειγμα, στην πέστροφα, επιστρατεύεται τόσο υπερπλασία όσο και υπερτροφία κατά την ανάπτυξη (Farrell *et al.* 1988) ή μόνο υπερπλασία ή υπερτροφία αναλόγως των περιβαλλοντικών ή φυσιολογικών ερεθισμάτων. Σε απόκριση κρύου εγκλιματισμού, η υπερτροφία αποτελεί τον κύριο μηχανισμό αντιστάθμισης στο κρύο και αύξησης σε καρδιακή μάζα (Graham and Farrell 1989, Gamperl and Farrell 2004, Klaiman *et al.* 2011, Keen *et al.* 2017).

Το zebrafish αποτελεί ιδανικό οργανισμό μοντέλο για τη μελέτη της πλαστικότητας της καρδιάς, καθώς εμφανίζει μια σειρά από πλεονεκτήματα για τη μελέτη του καρδιαγγειακού συστήματος. Ειδικά για τη μελέτη της καρδιακής ανάπτυξης και παθογένεσης στον άνθρωπο, το zebrafish αποτελεί κατάλληλο πειραματόζωο χάρη στο πλήρες αλληλουχισμένο γονιδίωμα το οποίο είναι κατά μεγάλο μέρος συντηρημένο και στον άνθρωπο (Howe *et al.* 2013). Παράλληλα, στο zebrafish είναι δυνατή η φθορίζουσα σήμανση σε μια σειρά από πρωτείνες και στελέχη ενώ παράλληλα παρουσιάζει αναγεννητική ικανότητα στην καρδιά μετά από τραύμα (Poss *et al.* 2002). Τέλος, η καρδιά του zebrafish παρουσιάζει μεγάλου βαθμού ομοιότητα με την ανθρώπινη καρδιά. Και στις δύο περιπτώσεις, η καρδιά αποτελείται από χώρους με βαλβίδες που διασφαλίζουν τη ροή του αίματος προς μια μόνο κατεύθυνση ενώ η άντληση του αίματος γίνεται ρυθμικά από τα μυοκύτταρα τα οποία αποτελούν μέρος της ανώτερης οργάνωσης της καρδιάς.

1.4.3 Πλαστικές αποκρίσεις της καρδιάς στους τελεόστεους

Η καρδιά των ψαριών έχει αποδειχτεί πως εμφανίζει διάφορες πλαστικές αποκρίσεις όταν εκτίθεται σε μακρόχρονα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Σε αυτά τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα συγκαταλέγονται παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υποξία, η διαθεσιμότητα τροφής, και οι συνθήκες εκτροφής (Gamperl and Farrell 2004).

Η απόκριση τη καρδιάς σε συνθήκες υποξίας έχει μελετηθεί και μέσω αναπτυξιακής πλαστικότητας (επίδραση κατά το εμβρυικό και πρώιμο νυμφικό στάδιο) (Pelster 2002, Moore *et al.* 2006) αλλά και μέσω μελέτης των επιδράσεων του εγκλιματισμού κατά το ενήλικο στάδιο (Petersen and Gamperl 2010). Ως προς τον παράγοντα της θερμοκρασίας, οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν εστιάσει στη διατήρηση της καρδιακής λειτουργίας των ενηλίκων σε εποχιακές κυρίως διακυμάνσεις (εγκλιματισμός) και όχι στη θερμο-εξαρτώμενη αναπτυξιακή πλαστικότητα.

Ως προς τη φυσιολογία και την ανατομία της καρδιάς, έχει βρεθεί πως εγκλιματισμός σε χαμηλές θερμοκρασίες προκαλεί αύξηση της σχετικής κοιλιακής μάζας (RVM, Relative Ventricular Mass), μείωση του συμπαγούς μυοκαρδίου, και αύξηση του σπογγώδους στην αρσενική πέστροφα (Klaiman *et al.* 2011). Η αύξηση που παρατηρείται στο σχετικό όγκο της κοιλίας είναι ενδεικτική υπερτροφίας, και θεωρείται ότι είναι ένας μηχανισμός αντιστάθμισης στην επίδραση που έχει η χαμηλή θερμοκρασία στη μείωση της συσταλτικότητας (Graham and Farrell 1989, Gamperl and Farrell 2004, Klaiman *et al.* 2011, Keen *et al.* 2017). Παρόμοιες αλλαγές στην μορφολογία της καρδιάς ως απόκριση εγκλιματισμού έχουν καταγραφεί στην πέστροφα (Farrell *et al.* 1988, Keen *et al.* 2017) και στο zebrafish (Johnson *et al.* 2014). Άλλη απόκριση έναντι εγκλιματισμού σε κρύο που έχει παρατηρηθεί είναι η αύξηση σε συνδετικό ιστό και κολλαγόνο της κοιλίας στην πέστροφα (Klaiman *et al.* 2011, Keen *et al.* 2017), μηχανισμός που θεωρείται ότι προστατεύει το μυοκάρδιο από το αυξημένο υδροδυναμικό stress της άντλησης κρύου αίματος με χαμηλό ιξώδες

(Keen *et al.* 2017). Αντίθετα, στο zebrafish, παρατηρήθηκε μείωση του κολλαγόνου της κοιλίας σε ψάρια που εγκλιματίστηκαν σε πιο κρύες θερμοκρασίες (Johnson *et al.* 2014).

Ως προς την καρδιακή λειτουργία, έχει βρεθεί πως σε απόκριση εγκλιματισμού χαμηλής θερμοκρασίας, αυξάνει ο βασικός καρδιακός ρυθμός (Keen *et al.* 1993, Haverinen and Vornanen 2007, Lurman *et al.* 2012), ο μέγιστος όγκος συστολής (Farrell 1991, Driedzic *et al.* 1996, Lurman *et al.* 2012), η μέγιστη παροχή ισχύος (Bailey and Driedzic 1990, Lurman *et al.* 2012), και η μέγιστη καρδιακή παροχή (maximum cardiac output) (Lurman *et al.* 2012).

Τέλος, το σχήμα της καρδιάς και συγκεκριμένα η κυκλικότητά της έχει συσχετιστεί στο παρελθόν με πλαστικές αποκρίσεις έναντι της πρώιμης έκθεσης σε πετρελαιοειδή (Hicken *et al.* 2011). Ταυτόχρονα, ο βαθμός κυκλικότητας της κοιλίας έχει προταθεί στο παρελθόν ως κατάλληλος δείκτης παροχής του αίματος στην καρδιά (Santer *et al.* 1983, Gallagher *et al.* 1995, Farrell 2002, Claireaux *et al.* 2005, Farrell 2007) και ως δείκτης της αερόβιας κολύμβησης (Claireaux *et al.* 2006, Hicken *et al.* 2011). Η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης χρησιμοποιήθηκε επίσης ως δείκτης καλής καρδιακής λειτουργίας στο σολομό και την πέστροφα (Incardona *et al.* 2015).

2.5 Κολύμβηση ιχθύων και θερμοκρασία

Στα ψάρια, η κολυμβητική επίδοση μπορεί να χωριστεί σε τρεις κατηγορίες: τη διαρκή κολύμβηση (cruising ή sustained swimming), την παρατεταμένη κολύμβηση (prolonged ή endurance swimming) και την κολύμβηση εκτίναξης (burst swimming). Η διαρκής κολύμβηση επιτυγχάνεται σε χαμηλές ταχύτητες με τη συμμετοχή πρωτίστως κόκκινων μυϊκών ινών που τροφοδοτούνται με ενέργεια αερόβιου μεταβολισμού ενώ η κολύμβηση εκτίναξης περιλαμβάνει άσπρες μυϊκές ίνες που χρησιμοποιούν την ενέργεια αναερόβιου μεταβολισμού (Beamish 1979). Ως προς την παρατεταμένη κολύμβηση, στην αρχή επιστρατεύονται κόκκινες μυϊκές ίνες, ενώ σε ταχύτητες μεγαλύτερες του 80% της U_{crit} συμμετέχουν επιπρόσθετα και ροζ μυϊκές ίνες αλλά και άσπρες (Beamish 1979, Hammer 1995, Reidy *et al.* 2000).

Ο πιο καθιερωμένος (μέχρι τώρα) τρόπος υπολογισμού της κολυμβητικής ικανότητας των ψαριών είναι μέσω μέτρησης της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης (U_{crit} , Brett, 1964). Κατά τον (Brett 1964), U_{crit} είναι η μέγιστη παρατεταμένη ταχύτητα κολύμβησης που επιτυγχάνεται στο σημείο της κόπωσης, κατά την οποία λαμβάνει χώρα η μέγιστη παρατεταμένη λήψη οξυγόνου.

Η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης χρησιμοποιείται ως μια σημαντική φυσιολογική παράμετρος υπολογισμού της μέγιστης αερόβιας άσκησης στα ψάρια (Brett 1964, Hammer 1995, Farrell 2007). Παράλληλα, η οικολογική σημασία της ταχύτητας αυτής για τα ψάρια είναι καθοριστική για τη μετανάστευση (Plaut 2001), την αποφυγή της θύρευσης για τις λαύρες (Fuiman *et al.* 2006), αλλά και για την αναζήτηση τροφής (Reidy *et al.* 2000). Ως εκ τούτου, η U_{crit} αποτελεί ένα σημαντικό

παράγοντα καθορισμού της αρμοστικότητας (fitness) των ψαριών και συχνά χρησιμοποιείται ως μέσο υπολογισμού αυτής (Hammer 1995, Reidy *et al.* 2000).

Τέλος, η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης χρησιμοποιείται ευρέως για να εκτιμήσει την επίδραση των διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων στην αερόβια άσκηση των ιχθύων (Fuiman and Batty 1997, Plaut 2001, Claireaux *et al.* 2005, Claireaux *et al.* 2006, Hicken *et al.* 2011, Scott and Johnston 2012) αλλά και την επίδραση φυσιολογικών παραμέτρων σε αυτήν, όπως του οντογενετικού σταδίου (Fuiman and Webb 1988, Koumoundouros *et al.* 2009) αλλά και του φύλου (Leris *et al.* 2013, Conradsen and McGuigan 2015).

Όπως σε όλα τα εξώθερμα, η κολυμβητική ικανότητα στα ψάρια επηρεάζεται σε πολλά βιολογικά επίπεδα από τη θερμοκρασία. Στις άμεσες επιδράσεις τη θερμοκρασίας συγκαταλέγονται οι επιδράσεις της θερμοκρασίας άσκησης η οποία καθορίζει πολλές φυσιολογικές αποκρίσεις των ιχθύων, οι οποίες συν-διαμορφώνουν την κινητική της κολύμβησης (Beamish 1979, O'Steen and Bennett 2003). Η απόκριση της κρίσιμης ταχύτητας στη θερμοκρασία άσκησης ποικίλλει ανάλογα με το είδος του ψαριού. Σε πολλά είδη ψαριών, η μέγιστη ταχύτητα μειώνεται σε χαμηλές θερμοκρασίες, αυξάνεται μέχρι ένα σημείο σε μια βέλτιστη θερμοκρασία, και μετά μειώνεται καθώς η θερμοκρασία πλησιάζει το ανώτατο όριο (Randall and Brauner 1991, Myrick and Cech 2000, Ojanguren and Braña 2000, Lee 2006). Αυτή η κωδωνοειδής απόκριση της ταχύτητας κολύμβησης έναντι της θερμοκρασίας άσκησης (Huey and Stevenson 1979) δείχνει πως καθώς τα ψάρια επιτυγχάνουν τη μέγιστη αερόβια άσκηση, η καρδιακή παροχή αίματος, ο κορεσμός σε O₂ στα βράγχια και η απορρόφηση του O₂ από τους ιστούς είναι στο μέγιστο δυνατό όριο (Randall and Brauner 1991, Farrell 2002, Farrell and Clutterham 2003). Άλλος ένας παράγοντας που παίζει ρόλο στην υδροδυναμική της κολύμβησης και επηρεάζει την κινητική της είναι το ιζώδες του νερού το οποίο επίσης καθορίζεται από τη θερμοκρασία άσκησης.

Τέλος, ως προς την πλαστική απόκριση της κολύμβησης στη θερμοκρασία ανάπτυξης, αυτή έχει μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με πολλούς παράγοντες, όπως τη σύσταση των κολυμβητικών μυών (Johnston 2006, Johnston *et al.* 2009, Koumoundouros *et al.* 2009, Scott and Johnston 2012), το φύλο (Leris *et al.* 2013), τους μεριστικούς χαρακτήρες (Georgakopoulou *et al.* 2007, Georga and Koumoundouros 2010, Sfakianakis *et al.* 2011), τα μιτοχόνδρια (Guderley and Johnston 1996) και τη δραστικότητα των ενζύμων (Schnurr *et al.* 2014).

Η θερμοκρασιακή πλαστικότητα της κολύμβησης στα ψάρια επηρεάζεται από την πλαστικότητα πολλών χαρακτήρων όπως του σχήματος σώματος και των μεριστικών χαρακτήρων (Blaxter and Hempel 1963, Georgakopoulou *et al.* 2007), της φυσιολογίας των μυών (Johnston *et al.* 1997), και των βιοχημικών αντιδράσεων που σχετίζονται με την κινητική της κολύμβησης (Johnston and Temple 2002, Johnston 2006). Οι Johnston (2006) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης σε πολλούς χαρακτήρες που σχετίζονται με την κινητική της κολύμβησης και εκφράζουν

φαινοτυπική πλαστικότητα (είδος μυϊκών ινών, πυκνότητα μιτοχονδρίων, μυϊκή μάζα, σχήμα σώματος). Οι Georgakopoulou *et al.* (2007) συσχέτισαν αλλαγές της μορφολογίας του σχήματος του λαβρακιού, με τη θερμοκρασία ανάπτυξης. Οι Koumoundouros *et al.* (2009) επέκτειναν την έρευνα για να συσχετίσουν ιστολογικές αλλαγές των μυών με τη θερμοκρασία ανάπτυξης και έδειξαν ότι ψάρια που αναπτύχθηκαν σε κρύα νερά (15 °C) είχαν αυξημένη κολυμβητική ικανότητα και περισσότερες κόκκινες μυϊκές ίνες. Οι Scott and Johnston (2012), εξέτασαν τη δυνατότητα εγκλιματισμού (acclimation capacity) του zebrafish, μέσω μέτρησης της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης (Ucrit), της μυϊκής σύστασης και της έκφρασης των μεταγραφικών παραγόντων του μυϊκού τρανσκριπτώματος.

1.6 Αναπαραγωγή ιχθύων και περιβαλλοντικοί παράγοντες

Η θερμοκρασία ως περιβαλλοντικός παράγοντας, συμμετέχει στη ρύθμιση των αναπαραγωγικών μηχανισμών στα ψάρια από την παραγωγή των γαμετών και την ωρίμανση τους, μέχρι την ωοτοκία, την εμβρυογένεση, την εκκόλαψη και την επιβίωση (Pankhurst and Munday 2011). Μέσω της άμεσης δράσης της στον άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης (HPG axis) η θερμοκρασία ενεργοποιεί ή απενεργοποιεί την παραγωγή των ορμονών (Davies *et al.* 1986, Pankhurst and Munday 2011) και αλλάζει τη δομή τους επηρεάζοντας έτσι τη δημιουργία των γαμετών (Pankhurst and Munday 2011).

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην αναπαραγωγή μπορεί να διαφοροποιείται αναλόγως με τη φωτοπερίοδο (Pankhurst and Porter 2003) και τη διαθεσιμότητα τροφής (Donelson *et al.* 2010). Στο σολομό, οι (Yoneda and Wright 2005) πρότειναν πως ο παράγοντας της θερμοκρασίας επιδρά στο ποσοστό των αρσενικών που φτάνουν στην αναπαραγωγική ωρίμανση ενώ ο παράγοντας της τροφής καθορίζει περισσότερο την αύξηση και την παραγωγή των γαμετών. Στο πείραμά τους, υψηλές θερμοκρασίες σε συνδυασμό με υψηλή διαθεσιμότητα τροφής οδήγησαν σε μεγαλύτερη παραγωγή γαμετών.

Ως προς τη διαθεσιμότητα τροφής, έχει βρεθεί πως τα ψάρια αυξάνουν σε αναπαραγωγική ικανότητα όταν ταϊστούν καλά πριν την ωοτοκία ή μπορούν να παραβλέψουν την ωοτοκία όταν τα αποθέματα τροφής είναι λίγα (Bunnell *et al.* 2007, Kennedy *et al.* 2008). Η επίδραση της διαθεσιμότητας τροφής και συνεπώς του ρυθμού αύξησης του zebrafish μελετήθηκε και από τους (Lawrence *et al.* 2008). Οι τελευταίοι είδαν πως τα ψάρια που αναπτύχθηκαν με μεγαλύτερο ρυθμό είχαν περισσότερες πιθανότητες να γίνουν θηλυκά από τα ψάρια που τρέφονταν λιγότερο και μεγάλωναν με πιο αργούς ρυθμούς. Η συσχέτιση του φυλο-καθορισμού με το ρυθμό αύξησης έχει γίνει και από προηγούμενες εργασίες μέσω της μελέτης της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης (Schirone and Gross 1968, Sfakianakis *et al.* 2011), υποδεικνύοντας το ρυθμό αύξησης ως μέγιστης σημασίας παράγοντα για το καθορισμό του φύλου στο zebrafish.

Εκτός από τη θερμοκρασία, τη φωτοπερίοδο και τη διαθεσιμότητα τροφής, άλλοι παράγοντες που επιδρούν στους αναπαραγωγικούς χαρακτήρες είναι η πυκνότητα του πληθυσμού, η υποξία και το μέγεθος των γονέων (Shang *et al.* 2006, Uusi-Heikkilä *et al.* 2012, Jonsson and Jonsson 2014). Η έλλειψη O₂ σύμφωνα με τους Shang *et al.* (2006) επηρεάζει τη σεξουαλική διαφοροποίηση και τη σεξουαλική ωρίμανση στο zebrafish. Στο ίδιο είδος, μεγαλύτερα σε μέγεθος θηλυκά άτομα, παρήγαγαν περισσότερα αυγά και καλύτερη ποιότητα απογόνων (better conditional offspring) (Uusi-Heikkilä *et al.* 2012).

Στα ψάρια, το περιβάλλον πρώιμης ανάπτυξης έχει αποδειχτεί να επιδρά στην αρμοστικότητα και την αναπαραγωγική επιτυχία των ψαριών επηρεάζοντας χαρακτήρες όπως η αναλογία φύλου, το μέγεθος των αυγών, η γονιμότητα και η ηλικία πρώτης αναπαραγωγικής ωρίμανσης (Jonsson and Jonsson 2014). Η θερμοκρασία ανάπτυξης συγκεκριμένα κατέχει σημαντικό ρόλο επηρεάζοντας τόσο τους χαρακτήρες της αναπαραγωγικής ωρίμανσης (Davies *et al.* 1986, Pankhurst and Munday 2011), όσο και το χρονισμό αυτής (Pankhurst and Munday 2011). Οι πλαστικές αποκρίσεις των αναπαραγωγικών χαρακτήρων των ψαριών, έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης συζητούνται αναλυτικά στο κεφάλαιο 4.5 (Συζήτηση).

1.7 Στόχοι εργασίας

Συνοψίζοντας, η φαινοτυπική πλαστικότητα, δηλαδή η ικανότητα των οργανισμών να παράγουν περισσότερους του ενός φαινοτύπους σε απόκριση των διαφορετικών περιβαλλοντικών συνθηκών, προσελκύει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας καθώς γίνεται αναγκαία η κατανόηση των φυσιολογικών αποκρίσεων των οργανισμών στα πλαίσια της αύξησης της θερμοκρασίας του πλανήτη λόγω του φαινομένου του θερμοκηπίου (Pigliucci *et al.* 2006).

Καθώς τα ψάρια αποτελούν μια ιδιαίτερα πλαστική ομάδα εξώθερμων οργανισμών (Baker *et al.* 2005, Crozier and Hutchings 2014), οι πλαστικές τους αποκρίσεις έναντι της θερμοκρασίας έχουν μελετηθεί σε διάφορα στάδια της βιολογικής οργάνωσης (Viña 2002, Crozier and Hutchings 2014). Συγκεκριμένα η θερμοκρασία ανάπτυξης έχει βρεθεί να επηρεάζει στα ψάρια χαρακτήρες όπως το φυλετικό καθορισμό (Navarro-Martín *et al.* 2011, Ribas and Liew 2017), την αναπτυξιακή διαδικασία (Parichy *et al.* 2009), το σχήμα σώματος (Marcil *et al.* 2006, Georga and Koumoundouros 2010), τη δραστηριότητα ενζύμων των μυών (Schnurr *et al.* 2014), τη δομή και ανατομία των μυών (Johnston 2006, Johnston *et al.* 2009), την κολυμβητική ικανότητα (Koumoundouros *et al.* 2009), και τη δυνατότητα εγκλιματισμού (Scott and Johnston 2012). Ως προς την καρδιά των ψαριών, και παρά τη σύνδεση του σχήματος της με την αερόβια κολύμβηση (Claireaux *et al.* 2005, Farrell 2007, Hicken *et al.* 2011), οι μέχρι τώρα εργασίες έχουν εστιάσει κυρίως σε αποκρίσεις εγκλιματισμού (Gamperl and Farrell 2004, Farrell *et al.* 2009, Klaiman *et al.* 2011, Keen *et al.* 2015) χωρίς να εστιάζουν τις πλαστικές αποκρίσεις.

Σε αυτό το πλαίσιο, η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε ως στόχο να μελετήσει τις μορφο-ανατομικές πλαστικές αποκρίσεις της καρδιάς έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης, και να συσχετίσει τα αποτελέσματα αυτά με διαφορές που προέκυψαν στην κολυμβητική ικανότητα του zebrafish. Για τον έλεγχο της υπόθεσής μας, επιλέξαμε το zebrafish ως κατάλληλο πειραματόζωο, καθώς ακολουθεί το πρότυπο ανάπτυξης των περισσότερων ειδών ψαριών με εξωτερική γονιμοποίηση και πλαγκτονικά νυμφικά στάδια. Παράλληλα, έχει μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος διαβίωσης (6 - 38 °C) (Spence *et al.* 2008), μικρό χρόνο γενεάς, και αρκετά ανεπτυγμένο καρδιαγγειακό σύστημα από τις πρώτες μέρες της οντογένεσης του οργανισμού (~ 42 hpf) (Gupta and Poss 2012).

Ως προς τον πειραματικό σχεδιασμό, τρεις πληθυσμοί zebrafish διαμοιράστηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης (24, 28 και 32 °C) από το στάδιο του βλαστιδίου (έμβρυο) μέχρι και τη μεταμόρφωση, ενώ μετά παρέμειναν σε κοινές συνθήκες (28 °C) μέχρι την ενηλικίωση.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη μορφολογία της καρδιάς των ιχθυδίων και ενήλικων zebrafish, στη μελέτη της φυσιολογικής σημασίας των αλλαγών αυτών ως προς την κολυμβητική ικανότητα των ιχθυδίων και των ενήλικων ατόμων, καθώς και στη μελέτη της μεταβολής του οντογενετικού προφίλ στην έκφραση τεσσάρων γονιδίων σημαντικών για την αναδιαμόρφωση της καρδιάς στο τέλος της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών. Παράλληλα, η εργασία εστίασε στην αναπαραγωγική πλαστικότητα του zebrafish μελετώντας την επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης σε μια σειρά από αναπαραγωγικούς χαρακτήρες των θηλυκών ατόμων. Η θερμοκρασιακή πλαστικότητα τόσο της καρδιάς του zebrafish όσο και η αναπαραγωγική του πλαστικότητα δεν έχουν μελετηθεί μέχρι τώρα. Η εργασία αυτή αποτελεί μια πρώτη προσέγγιση στις θερμοκρασιακές πλαστικές αποκρίσεις του καρδιαγγειακού συστήματος του zebrafish, της κολυμβητικής του ικανότητας, της έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την αναδιαμόρφωση της καρδιάς, αλλά και των αναπαραγωγικών χαρακτήρων, ενδεικτικών της γονιμότητας των θηλυκών ατόμων.

2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

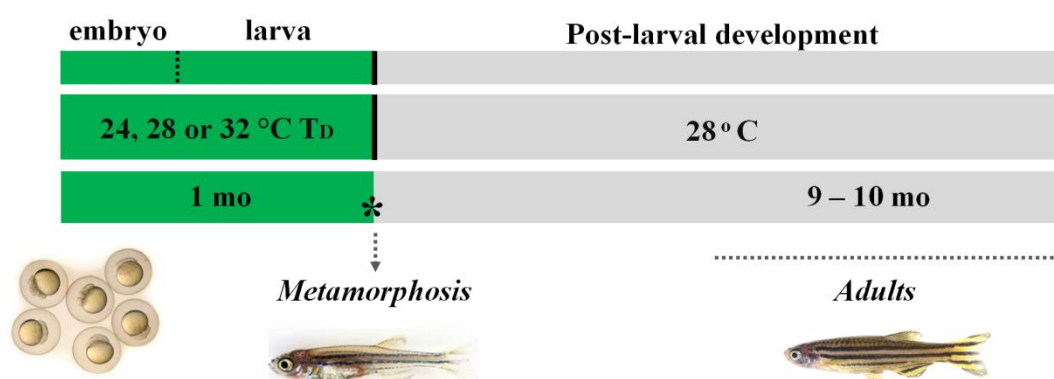
Στο παρόν κεφάλαιο περιγράφεται αναλυτικά ο σχεδιασμός των πειραμάτων που ακολουθήθηκε για τη μελέτη της θερμο-εξαρτώμενης πλαστικότητας στο zebrafish. Για τη διεξαγωγή όλων των πειραμάτων, εφαρμόστηκαν δύο πανομοιότυπα πειράματα με δύο επαναλήψεις (A και B) το κάθε ένα. Στο πρώτο πείραμα μελετήθηκε η θερμοκρασιακή πλαστικότητα της καρδιάς, η ποσοτική έκφραση τεσσάρων γονιδίων-δεικτών εμπλεκόμενα στη διαμόρφωση της καρδιάς, και η αναπαραγωγική πλαστικότητα του zebrafish. Το δεύτερο πείραμα είχε ως στόχο τη μελέτη της λειτουργικής σημασίας των αποτελεσμάτων της πλαστικότητας της καρδιάς μέσω μέτρησης της κολυμβητικής ικανότητας του zebrafish.

Για κάθε επιμέρους πείραμα, περιγράφονται επιπροσθέτως οι δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν καθώς και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των αποτελεσμάτων.

2.1. Πρώτο πείραμα: Επίδραση θερμοκρασίας ανάπτυξης στο ρυθμό αύξησης, την πλαστικότητα καρδιάς, τη γονιδιακή έκφραση και τη γονιμότητα του zebrafish

2.1.1 Βασικός πειραματικός σχεδιασμός

Ο βασικός πειραματικός σχεδιασμός που περιγράφεται παρακάτω (Εικόνα 2.1) αφορά στο πρώτο πείραμα που είχε ως στόχο τη μελέτη της πλαστικότητας της καρδιάς σε ιχθύδια και ενήλικα zebrafish, τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης τεσσάρων γονιδίων που εμπλέκονται στη διαμόρφωση της καρδιάς στο τέλος της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών, και τη μελέτη της αναπαραγωγικής πλαστικότητας των θηλυκών zebrafish.



Εικόνα 2.1: Σχηματική αναπαράσταση του γενικού πειραματικού σχεδιασμού. Τρεις πληθυσμοί zebrafish υποβλήθηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης (24, 28 ή 32 °C) από τη γονιμοποίηση μέχρι τη μεταμόρφωση (*). Μετά την λήξη της εφαρμογής των διαφορετικών θερμοκρασιών (*), η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε κοινές συνθήκες (28 °C). Το πείραμα περιέλαβε 2 πειραματικές επαναλήψεις για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης. (T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (mo) μήνες, (SL) τυπικό μήκος σώματος.

Γονιμοποιημένα αβγά από κοινό απόθεμα γεννητόρων διαμοιράστηκαν στο στάδιο του βλαστιδίου (2,25 – 5,25 hpf, ώρες μετά τη γονιμοποίηση) σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης ($23,9 \pm 0,3$, $27,8 \pm 0,3$, ή $31,5 \pm 0,5$ °C, \pm SD). Οι διαφορετικές θερμοκρασίες εφαρμόστηκαν μέχρι το στάδιο της μεταμόρφωσης, περίπου στα 12,5-14 mm τυπικό μήκος (SL, Standard Length) (Πίνακας 2.1). Το στάδιο της μεταμόρφωση αναγνωρίστηκε βάση του χρωματικού προτύπου της διασποράς των μελανοφόρων που πρότειναν οι (Parichy and Turner 2003) (§1.3.1 Εισαγωγή). Η επιλογή των ατόμων που μεγάλωσαν στους 24 °C έγινε σε μεγαλύτερο μήκος σώματος λόγω του διαφορετικού χρονισμού της οντογένεσης (§1.3.3, Εισαγωγή).

Πίνακας 2.1: Ηλικία και μέσο τυπικό μήκος σώματος των ιχθυδίων zebrafish στο τέλος της επίδρασης των διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών.

T _D (°C)	Dpf	A		B	
		n	SL (mm)	n	SL (mm)
24	35	30	13,9 ±0,7	30	12,9±0,5
28	28	20	12,7 ±0,7	20	13,6 ±0,9
32	28	26	12,6 ±0,8	30	13,9± 0,8

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (Dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, (SL) τυπικό μήκος σώματος. Οι τιμές είναι Μ.Ο. \pm 2SE

Μετά την λήξη της εφαρμογής των διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών, η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε κοινές συνθήκες (με τους πληθυσμούς να παραμένουν φυσικά διαχωρισμένοι) και σε θερμοκρασία 28.0 ± 0.2 °C (\pm SD). Σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, οι υπόλοιπες συνθήκες (φωτοπερίοδος, pH, αγωγιμότητα) παρέμειναν σταθερές και κοινές για όλους τους πληθυσμούς. Οι εκτροφές των πληθυσμών πραγματοποιήθηκαν σε 2 πειραματικές επαναλήψεις για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης (A και B).

2.1.2 Σύσταση και διατήρηση των πειραματικών πληθυσμών

Οι πειραματικοί πληθυσμοί προέρχονται από κοινό απόθεμα γεννητόρων άγριου τύπου (ZF WT2 F13, Wageningen Agricultural University, The Netherlands). Η διατήρηση και η εκτροφή των νυμφών και των ενήλικων ψαριών πραγματοποιήθηκε βάσει μεθοδολογίας που περιγράφεται στο «The Zebrafish Book» (Westerfield 1995).

Πιο αναλυτικά, οι γεννήτορες, διατηρούνταν σε ενυδρεία χωρητικότητας 100L με αναλογία φύλου 1:1 (125 αρσενικά και 125 θηλυκά). Τα ενυδρεία ήταν μέρος κλειστού συστήματος ανακύκλωσης νερού με θερμοκρασία στους 28.0 °C (± 0.5 °C), αγωγιμότητα 500–700 μ S/cm, pH 7.0–7.5, 85-95% κορεσμό σε οξυγόνο και φωτοπερίοδο σταθερή στις 14:10 h L:D. Η συγκέντρωση αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων διατηρούνταν σε τιμές χαμηλότερες από 0.1mg/L. Η ανανέωση του νερού ήταν συνεχής στα ενυδρεία των γεννητόρων. Οι γεννήτορες τρέφονταν *ad libitum* δύο φορές την ημέρα με βιομηχανική τροφή (Cichlid Omni Flakes, Ocean Nutrition Europe, Essen, Belgium) η οποία συμπληρώνονταν από σκώληκες (Cultivated bloodworms, Ocean Nutrition) δύο φορές την εβδομάδα. Επίσης, μια μέρα την

εβδομάδα γινόταν τοποθέτηση ειδικών δοχείων για την απόθεση των αβγών («γεννήστρες») και τη συλλογή τους. Η ωτοκία και η γονιμοποίηση λάμβανε χώρα το επόμενο πρωί μία περίπου ώρα μετά την έναρξη της φωτεινής φάσης. Οι γεννήστρες τοποθετούνταν στα ενυδρεία των γεννητόρων το προηγούμενο βράδυ.

Δύο με τρεις ώρες μετά τη γονιμοποίηση τα έμβρυα διαμοιράστηκαν στις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης, σε επωαστήρες όγκου 4,5 L μέσα σε ενυδρεία 9 L (33 αβγά/L αρχική συγκέντρωση). Πριν τη μεταφορά των αβγών στις θερμοκρασίες των 24 και 32 °C προηγήθηκε εγκλιματισμός τους, μεταβάλλοντας τη θερμοκρασία κατά 1 °C/h. Τα ενυδρεία στα οποία έγινε η εκτροφή των εμβρύων και των νυμφών ήταν κλειστά συστήματα ανακύκλωσης νερού με 500–700 $\mu\text{S}/\text{cm}$ αγωγιμότητα, pH 7,0–7,5, 85-95% κορεσμό σε οξυγόνο, φωτοπερίοδο σταθερή στις 14:10 h L:D και ανανέωση νερού 100% /h. Καθώς το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο πειραματικές επαναλήψεις για κάθε θερμοκρασία χρησιμοποιήθηκαν συνολικά έξι ενυδρεία, τα οποία ανά δύο είχαν την ίδια θερμοκρασία (28°C- A και 28°C- B, 24°C- A και 24°C- B, 32°C- A και 32°C- B). Οι νύμφες, αφού κατανάλωσαν τη λέκιθο, τρέφονταν πέντε φορές την ημέρα με ναύπλιους *Artemia sp.* Καθώς οι νύμφες μεγάλωναν σε μέγεθος, περίπου κατά την 20^η με 28^η ημέρα μετά τη γονιμοποίηση – ανάλογα με τη θερμοκρασία ανάπτυξης οι νύμφες τρέφονταν παράλληλα με βιομηχανική τροφή (Cichlid Omni Flakes, Ocean Nutrition Europe, Essen, Belgium), ενώ σταδιακά η χορήγηση ναύπλιων *Artemia sp.* έπαυε.

Μετά το τέλος της επίδρασης των διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών (12,5 -14 mm SL) όλοι οι πειραματικοί πληθυσμοί τοποθετήθηκαν σε ενυδρεία 8L με πυκνότητα 8 άτομα/L. Τα ενυδρεία αποτελούν μέρος του αυτοματοποιημένου συστήματος εκτροφής zebrafish ZebTEC (Techniplast, Italy). Με τη μεταφορά των ατόμων στο ZebTEC μετρήθηκε η πυκνότητα των ατόμων στο κάθε ενυδρείο και αναλόγως το βαθμό επιβίωσης, οι πληθυσμοί της κάθε πειραματικής επανάληψης χωρίστηκαν σε 2 ενυδρεία. Όλα τα ενυδρεία από τα οποία πάρθηκαν τα δείγματα του πειράματος είχαν τον ίδιο βαθμό ιχθυοφόρτισης. Το ποσοστό επιβίωσης για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης κυμάνθηκε από 53-68% για τους 24 °C, από 66-81% για τους 28 °C, και από 40-52% για τους 32°C.

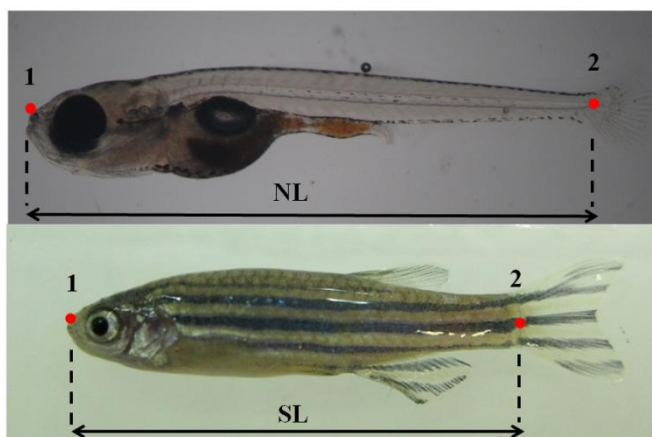
Στο σύστημα εκτροφής ZebTEC, η θερμοκρασία βρισκόταν στους $28,0 \pm 0,2$ °C, η φωτοπερίοδος ήταν σταθερή στις 14:10 h L:D. Το pH ήταν ίσο με 7,0-7,5 και ο κορεσμός του οξυγόνου στο νερό ήταν 70-100%. Στα ενυδρεία, η ανανέωση του νερού ήταν 100% /h. Επιπρόσθετα, στο σύστημα αυτό υπάρχει βιολογικό και μηχανικό φίλτρο για την ανακύκλωση του νερού, αερισμός και UV για την αποστείρωση του νερού και την απομάκρυνση παθογόνων μικροοργανισμών). Το νερό όλων των ενυδρείων και των συστημάτων προερχόταν από το νερό του αστικού δικτύου επεξεργασμένο με σύστημα αντίστροφης ώσμωσης.

2.1.3 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο ρυθμό αύξησης του zebrafish

2.1.3.1 Δειγματοληψίες και μέτρηση του μήκους των ψαριών

Για την παρακολούθηση της αύξησης των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών και τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης σε αυτήν, πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες από τις 6-8 dpf μέχρι τις 126 dpf. Η πρώτη δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στο στάδιο έναρξης της διατροφής (first feeding), την ημέρα που οι νύμφες αποκολλήθηκαν από τα τοιχώματα των ενυδρείων και άρχισαν να κολυμπούν ενεργητικά (στις 6 dpf για τους 28 και τους 32 °C και στις 8 dpf για τους 24°C). Η συχνότητα των υπολοίπων δειγματοληψιών, ο αριθμός των ατόμων, καθώς και το μέσο τυπικό μήκος σώματος των ατόμων που ελήφθησαν μέχρι τις 126 dpf αναγράφονται στον Πίνακα 2.2.

Για τη μέτρηση του τυπικού μήκους σώματος γινόταν λήψη τυχαίου δείγματος ατόμων, αναισθητοποίησή τους με φαίνοξυ-αιθανόλη (2-phenoxyethanol, $C \approx 0,15-0,25\text{ml/L}$), φωτογράφιση με ψηφιακή μηχανή (Canon PowerShot G9) σε στερεοσκόπιο για τις νύμφες και σε φωτεινή τράπεζα για τα μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια, και συντήρηση σε ρυθμιστικό διάλυμα 5% φορμαλίνης. Η φωτογράφιση και η συντήρηση ήταν πάντα ατομική. Το μήκος σώματος του κάθε ατόμου μετρήθηκε από τις ατομικές φωτογραφίες του, με τη βοήθεια του λογισμικού tpsDig (έκδοση 1.37) (Rohlf 2015). Το μήκος που μετρήθηκε είναι το μήκος της νωτοχορδής (NL) στα πρώτα στάδια ζωής των νυμφών, και στη συνέχεια το τυπικό μήκος σώματος (SL) των ιχθυδίων και ενήλικων zebrafish (Εικόνα 2.2).



Εικόνα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση της θέσης των μορφομετρικών σημείων (1 και 2) που χρησιμοποιήθηκαν για τη μέτρηση του μήκους της νωτοχορδής (NL, 1-2) και του τυπικού μήκους σώματος (SL, 1-2) των νυμφών, ιχθυδίων και ενήλικων zebrafish.

Πίνακας 2.2: Δειγματοληψίες ατόμων για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην αύξηση του zebrafish στις δύο πειραματικές επαναλήψεις (A, B).

dpf	T _D (°C)	SL±2SE	T _D	SL±2SE	
A			B		
8	24	4,1±0,2 (10)	8	24	4,0±0,1 (10)
14	24	5,0±0,5 (10)	14	24	4,7±0,5 (10)
19	24	7,8±0,6 (5)	19	24	7,5±0,9 (5)
20	24	7,8±0,7 (5)	20	24	7,6±0,4 (5)
35	24	14,0±0,7(30)	35	24	12,9±0,5 (30)
50	24	16,5±0,5(20)	50	24	15,6±0,5 (20)
126	24	22,4±1,2(40)	126	24	21,2±1,2 (40)
6	28	4,2±0,2 (5)	6	28	4,1±0,3 (5)
7	28	4,5±0,5 (5)	7	28	4,5±0,2 (5)
13	28	6,8±0,7 (10)	13	28	6,56±0,77 (10)
15	28	7,3±0,4 (5)	15	28	8,1±0,5 (5)
16	28	7,3±1,3 (5)	16	28	8,1±1,4 (5)
27	28	13,4±1,3 (10)	27	28	14,8±0,9 (10)
28	28	12,7±0,7(19)	28	28	13,6±0,9 (20)
44	28	15,3±0,7(20)	44	28	17,2±0,5 (20)
126	28	20,6±1,1 (40)	126	28	22,7±1,0 (40)
6	32	4,5±0,4 (5)	6	32	3,7±0,3 (5)
7	32	4,0±0,2 (5)	7	32	4,0±0,2 (5)
12	32	6,9±1,0 (10)	12	32	5,9±0,5 (10)
14	32	6,4±0,8 (5)	14	32	6,5±0,8 (5)
16	32	7,6±1,0 (10)	16	32	8,0±1,2 (10)
27	32	12,6±0,8 (30)	27	32	13,9±0,8 (30)
44	32	17,4±0,7 (20)	44	32	18,5±0,7 (20)
126	32	21,4±1,1 (40)	126	32	22,8±0,9 (40)

(T_D) Θερμοκρασία ανάπτυξης, (dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Οι τιμές είναι M.O. ± 2SE (n).

2.1.2.2 Εκτίμηση του ρυθμού αύξησης

Ο ρυθμός αύξησης των νυμφών κατά την επίδραση των διαφορετικών συνθηκών (μέχρι τις 27 και 28 dpf για 32 και 28°C, και μέχρι τις 35 dpf για τους 24°C) εκτιμήθηκε μετά από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο εκθετικό μοντέλο αύξησης:

$$SL = a e^{SGR \times t} \text{ (Ricker 1979)}$$

όπου SL το μέσο τυπικό μήκος (mm) κάθε δείγματος, a το μέγεθος των ατόμων (SL) σε χρόνο t₀=0, SGR ο ειδικός ρυθμός αύξησης του SL (ημέρες⁻¹), και t ο χρόνος μετά το τέλος του αυτότροφου σταδίου (ημέρες).

Για τη μελέτη της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών στο ρυθμό αύξησης, χρησιμοποιήθηκε το γραμμικό μοντέλο αύξησης, μετά από λογαριθμοποίηση των τιμών του μήκους σώματος. Ο στατιστικός έλεγχος της επίδρασης της θερμοκρασίας στο ρυθμό αύξησης των πληθυσμών έγινε με ανάλυση συνδιασποράς ANCOVA (Stagraphics Plus v.5).

Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο συνολικό μοντέλο αύξησης του zebrafish μέχρι και την ενηλικίωση (126 dpf) εφαρμόστηκε η εξίσωση von Bertalanffy

$$Lt_t = L_{\infty} \times (1 - e^{-K(t-t_0)}) \text{ (μοντέλο VBGF, 1934, 1938, 1957)}$$

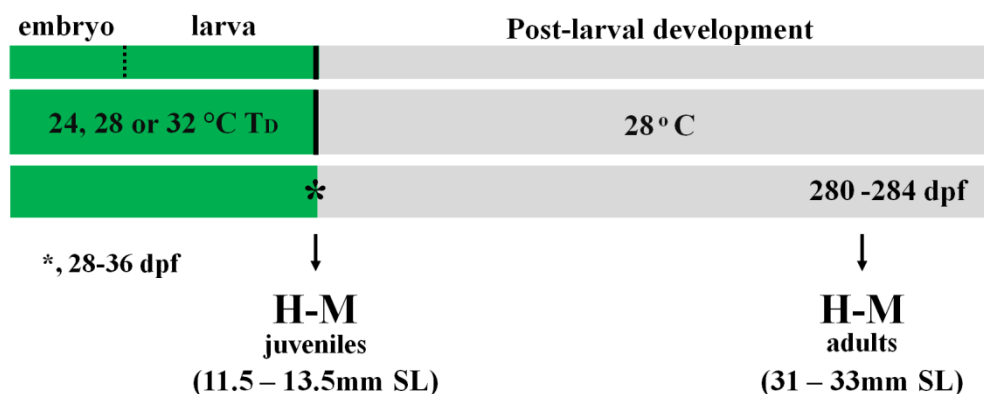
όπου L_t = το τυπικό μήκος σώματος σε ηλικία t , L_{∞} = το ασυμπτωτικό μήκος του ψαριού, K = η σταθερά της εξίσωσης του von Bertalanffy, ο ρυθμός με το οποίο το ψάρι πλησιάζει το L_{∞} , t = ηλικία του ψαριού και t_0 ο θεωρητικός χρόνος στον οποίο το ψάρι έχει μηδενικό μήκος. Η τιμή του t_0 θεωρήθηκε ίση με τη μηδενική, για όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες, μετά από έλεγχο του εύρους των τιμών του t_0 . Με εφαρμογή του μοντέλου VBGF υπολογίστηκαν οι παράμετροι αύξησης (L_{∞} και K) με τη μέθοδο της μη γραμμικής παλινδρόμησης (STATISTICA, version 7).

2.1.4 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην πλαστικότητα της καρδιάς του zebrafish

Το πείραμα είχε ως στόχο τη μελέτη της θερμοκρασιακά ελεγχόμενης πλαστικότητας της καρδιάς του zebrafish. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω υπολογιστικής μικροτομογραφίας ακτίνων X (micro-computed tomography, micro - CT). Πιο αναλυτικά, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχήμα της καρδιάς των ιχθυδίων και ενηλίκων zebrafish μέσω υπολογισμού του λόγου VL/VD (μήκος προς ύψος κοιλίας) ως καταλληλότερου δείκτη της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης. Παράλληλα, στα δύο αυτά οντογενετικά στάδια (ιχθυδίου και ενηλίκου) υπολογίστηκαν οι σχετικές διαστάσεις της κοιλίας σε σχέση με τον αρτηριακό βολβό (BaL/VL, BaL/VD και BuLV/VeV), οι διαστάσεις της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού κανονικοποιημένες ως προς το τυπικό μήκος σώματος (SL), η διάταξη (μέσω μέτρησης των γωνιών) της κοιλίας σε σχέση με τον αρτηριακό βολβό, και η ποσότητα του μυοκαρδίου κοιλίας σε σχέση με το συνολικό όγκο κοιλίας. Το σχήμα της κοιλίας μελετήθηκε επιπρόσθετα με Fourier ανάλυση του περιγράμματός της.

2.1.4.1 Λήψη και προετοιμασία δειγμάτων

Η δειγματοληψία των ιχθυδίων πραγματοποιήθηκε στο τέλος της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών στα 11,5 -13,5 mm SL (στις 28-36 dpf) ενώ η δειγματοληψία των ενηλίκων, περίπου 9-10 μήνες αργότερα στα 31 -33mm SL (στις 280 – 284 dpf). Ο αριθμός καθώς και το μέσο τυπικό μήκος σώματος των δειγμάτων που ελήφθησαν για κάθε πειραματική συνθήκη αναγράφεται στον πίνακα 2.2.



Εικόνα 2.3: Δειγματοληψίες σε ιχθυΐδια (juveniles) και ενήλικα (adults) για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην καρδιά του zebrafish. (T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης (H-M) Μορφομετρία καρδιάς, (dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, (SL) τυπικό μήκος.

Πίνακας 2.3: Το πλήθος (n) και το μέσο τυπικό μήκος σώματος (SL) των ιχθυΐδιων και ενήλικων zebrafish που ελήφθησαν για τη μελέτη πλαστικότητας της καρδιάς του zebrafish στις δύο πειραματικές επαναλήψεις (A και B).

T_D (°C)	Dpf	A		B	
		Juveniles			
		n	SL (mm)	n	SL (mm)
24	35	10	12,9 ± 1,0	5	13,4 ± 1,6
28	28	5	11,9 ± 0,2	5	12,9 ± 1,2
32	28	4	11,5 ± 0,3	4	13,3 ± 0,2
		Females			
24	280	5	33,0±0,7	4	32,0±2,2
28	280	4	32,7±0,6	4	31,4±2,6
32	280	3	31,9±1,7	4	33,0±1,9
		Males			
24	280	5	32,0±0,7	4	31,9±1,4
28	280	5	31,7±1,2	4	32,1±1,8
32	280	5	31,8±0,8	3	31,1±1,4

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (Dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, (SL) τυπικό μήκος

Για τη μέτρηση του τυπικού μήκους σώματος γινόταν λήψη τυχαίου δείγματος ατόμων, ευθανασία με υπερβολική δόση MS-222 (tricaine methanesulfonate) και φωτογράφιση με ψηφιακή μηχανή (Canon PowerShot G9). Το μήκος σώματος του κάθε ατόμου υπολογίστηκε με τη βοήθεια του λογισμικού tpsDig (έκδοση 1.37), (Rohlf 2015). Ακολούθησε συντήρηση των δειγμάτων σε ρυθμιστικό διάλυμα φορμαλίνης 5%, χρώση σε 2,5% φωσφομολυβδαινικό οξύ (phosphomolybdic acid, PMA, Sigma Aldrich) για 6 μέρες (Descamps *et al.* 2014) και σταδιακή αφυδάτωσή τους σε 70% αιθανόλη (25% αιθανόλη για 3 ώρες, 50% για 3 ώρες, 70% κατά τη διάρκεια της νύχτας, και 70% τελικό διάλυμα). Το PMA είναι ένα υδατικό διάλυμα που προσδένεται σε πρωτεΐνες και συγκεκριμένα στο κολλαγόνο, με αποτέλεσμα να είναι πιο ευδιάκριτοι οι ιστοί (και συγκεκριμένα η καρδιά) κατά τη σάρωση στον μικροτομογράφο.

2.1.4.2 Μικροτομογραφία

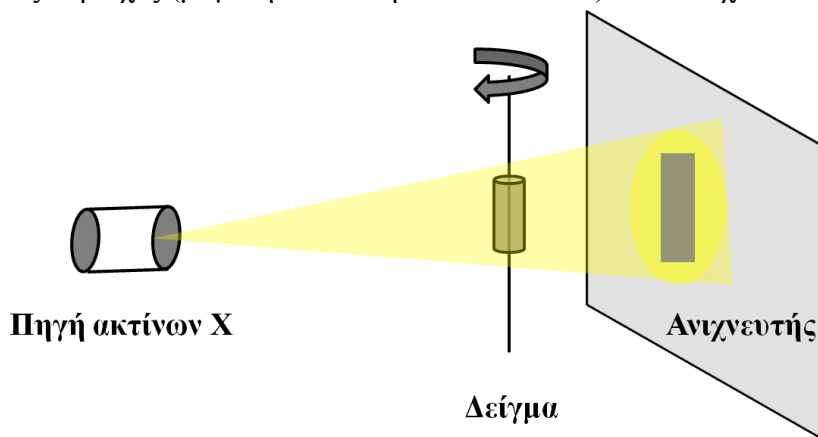
2.1.4.2.1 Micro-CT απεικόνιση (micro-CT imaging)

Οι σαρώσεις των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών Κρήτης (ΕΛΚΕΘΕ) με ένα υπολογιστικό μικροτομογράφο SkyScan 1172 (Εικόνα 2.4). Χρησιμοποιώντας ακτίνες X γίνεται δυνατή η σάρωση και η απεικόνιση των υπό εξέταση ιστών στις τρεις διαστάσεις.



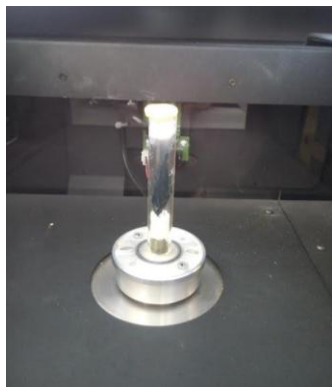
Εικόνα 2.4: Ο μικροτομογράφος SkyScan 1172 εγκατεστημένος στα εργαστήρια του στο Ινστιτούτο Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών.

Κατά τη σάρωση, το δείγμα τοποθετείται και περιστρέφεται μεταξύ μιας σειράς ανιχνευτών και μιας πηγής ακτίνων X υψηλής ενέργειας (Εικόνα 2.5). Από κάθε γωνία (συνήθως μικρότερη από 1°) αποκτάται μια εικόνα προβολής (projection image, Εικόνα 2.5). Οι εικόνες προβολής είναι εικόνες διαβαθμίσεων του γκρι στις οποίες απεικονίζεται η απορρόφηση των ακτίνων X από το αντικείμενο. Πυκνές περιοχές (μικρή διέλευση των ακτίνων X) αντιστοιχούν στο λευκό χρώμα, ενώ λιγότερο πυκνές περιοχές (μεγάλη διέλευση των ακτίνων X) αντιστοιχούν στο μαύρο.



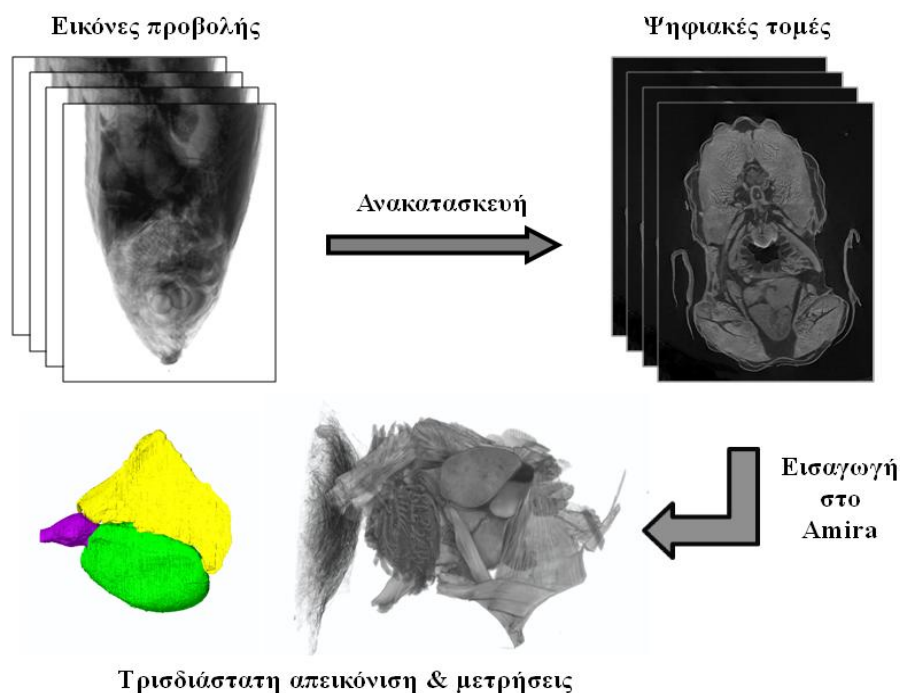
Εικόνα 2.5: Σχηματική αναπαράσταση εικόνας στον μικροτομογράφο

Τα εμβαπτισμένα με PMA δείγματα, σαρώθηκαν ατομικά και με τυχαία σειρά. Για την αποφυγή συρρίκνωσης, τα δοχεία σάρωσης περιείχαν βαμβάκι εμβαπτισμένο σε αιθανόλη και είχαν σφραγιστεί με πάραφιλμ (Εικόνα 2.6). Οι παράμετροι σάρωσης που εφαρμόστηκαν ήταν κοινές για όλα τα δείγματα, με 180° περιστροφή, 1450 ms χρόνο έκθεσης, 50 kV τάση και 199 μ A αμπερ. Το μέγεθος του ογκοστοιχείου (voxel) κυμάνθηκε από 5 έως 5,3 μ m.



Εικόνα 2.6: Τα δείγματα σαρώθηκαν σε σωληνάρια καλυμμένα με βαμβάκι εμποτισμένο σε αιθανόλη για την αποφυγή συρρίκνωσης.

Μετά από ανακατασκευή (Reconstruction) των εικόνων προβολής που αποκτήθηκαν (λογισμικό NRecon, SKYSCAN) και την επιλογή της περιοχής ενδιαφέροντος (ROI), προέκυψε ένα δεύτερο σύνολο εικόνων (ψηφιακές τομές, cross sections, Εικόνα 2.7) σε μορφή αρχείου φωτογραφίας TIFF, που μπορεί να αναλυθεί ποιοτικά και ποσοτικά. Η περαιτέρω επεξεργασία των εικόνων TIFF, πραγματοποιήθηκε σε δύο και τρεις διαστάσεις (Εικόνα 2.7) με τη βοήθεια του λογισμικού Amira v.5.2. (VSG, Burlington USA).



Εικόνα 2.7: Επεξεργασία εικόνων από εικόνες προβολής σε ψηφιακές τομές και σε τρισδιάστατες απεικονίσεις.

2.1.4.2.2 Μετρήσεις σχήματος και όγκου

Για τον υπολογισμό του σχήματος της καρδιάς, όλες οι μετρήσεις πάρθηκαν στο ίδιο επίπεδο (Εικόνα 2.8B) με τη χρήση της υπολογιστικής παραμέτρου “Oblique Slice” (Amira) σύμφωνα με την οποία ο χρήστης ορίζει ένα επίπεδο τομής το οποίο διέρχεται από τα ακόλουθα σημεία: το πρόσθιο και το οπίσθιο άκρο του αυλού του αρτηριακού βολβού και το κέντρο το 1^ο σπονδύλου.

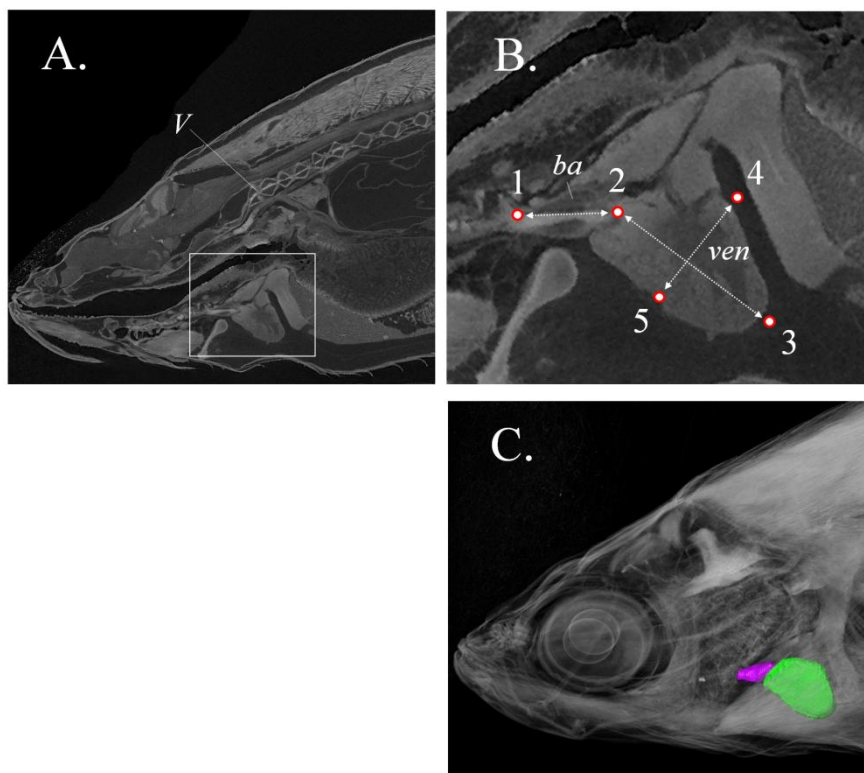
Το μήκος (μm) των προς μελέτη αποστάσεων υπολογίστηκε από τις xyz συντεταγμένες των σημείων που απεικονίζονται στην Εικόνα 2.8B με τον ακόλουθο τύπο:

$$D_{1-2} = \sqrt{(x_2 - x_1)^2 + (y_2 - y_1)^2 + (z_2 - z_1)^2}$$

όπου, D_{1-2} η απόσταση του σημείου 1 από το σημείο 2, $x_1 y_1 z_1$ οι συντεταγμένες του σημείου 1 και $x_2 y_2 z_2$ οι συντεταγμένες του σημείου 2. Το μήκος του αρτηριακού βολβού (Bulbus arteriosus length, BaL) ορίστηκε ως η απόσταση μεταξύ της 1^{ης} διακλάδωσης του αορτικού τόξου με τον αρτηριακό βολβό (Σημείο 1) και της βαλβίδας κοιλίας-βολβού (Σημείο 2). Το μήκος της κοιλίας (Ventricle Length, VL) ορίστηκε ως η απόσταση μεταξύ της βαλβίδας κοιλίας-βολβού (Σημείο 2) και του απώτερου άκρου της κοιλίας (apex) (Σημείο 3). Τέλος, το ύψος της κοιλίας (Ventricle Depth, VD) ορίστηκε ως η μέγιστη απόσταση κάθετα στο μήκος της κοιλίας (Σημεία 4-5) (Εικόνα 2.8B).

Για τον υπολογισμό του όγκου της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού, οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια ειδικών υπολογιστικών υπορουτίνων του λογισμικού Amira. Η τρισδιάστατη απεικόνιση έλαβε μέρος με την ημι-αυτόματη σήμανση και ομαδοποίηση των δυσδιάστατων τομών ανά περιοχή ενδιαφέροντος (κοιλία και αρτηριακός βολβός), η οποία έγινε βάσει των διαβαθμίσεων του γκρι (“Segmentation Editor”, Amira). Για κάθε υπό εξέταση χώρο ορίστηκε ένα νέο πεδίο ενδιαφέροντος (“Label Field”) επιτρέποντας τη μετέπειτα επεξεργασία τους. Στη συνέχεια, κάθε πεδίο ενδιαφέροντος μετατράπηκε σε τρισδιάστατο πλέγμα (3-D mesh, “SurfaceGen” υπορουτίνα, Εικόνα 2.8C) αποτελούμενο από ογκοστοιχεία (voxels). Τα τρισδιάστατα πλέγματα που προέκυψαν «λειάνθηκαν» όλα μια φορά (smoothing, “SmoothSurface” υπορουτίνα). Η μέτρηση του όγκου του αρτηριακού βολβού και κοιλίας πραγματοποιήθηκε με μέτρηση των ογκοστοιχείων του τρισδιάστατου πλέγματος (“Surface area” υπορουτίνα).

Το σχήμα της καρδιάς και συγκεκριμένα η κυκλικότητα της κοιλίας εκτιμήθηκε από το λόγο VL/VD ο οποίος έχει προταθεί ως κατάλληλος δείκτης της καρδιακής παροχής στο zebrafish (§2.4.3). Παράλληλα, εκτιμήθηκαν οι σχετικές διαστάσεις της κοιλίας σε σχέση με τον αρτηριακό βολβό (BaL/VL, BaL/VD και BuL/VeV) όπως και οι διαστάσεις της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού κανονικοποιημένες ως προς το τυπικό μήκος σώματος (BaL/SL, VL/SL και VD/SL). Ο όγκος της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού (BuLV) υπολογίστηκαν κανονικοποιημένοι ως προς το τυπικό μήκος σώματος των ιχθύων (VeV/SL και BuLV/SL αντίστοιχα).

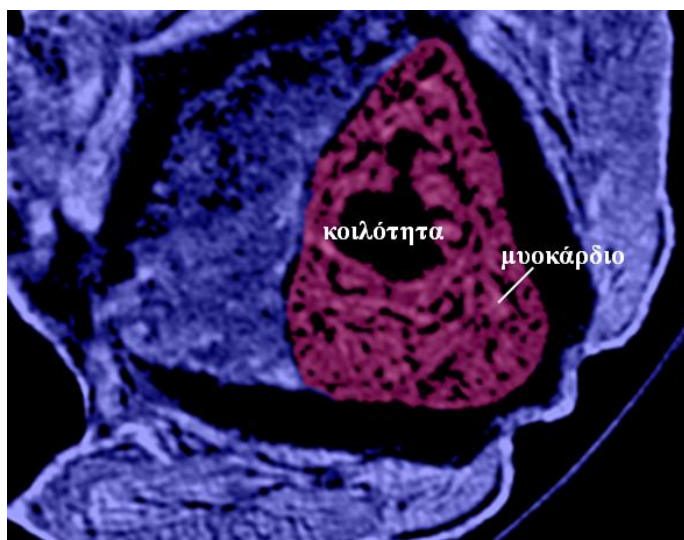


Εικόνα 2.8: Πολλαπλές όψεις μιας micro-CT σάρωσης zebrafish. (A) Αντιπροσωπευτική διατομή “oblique slice” που ορίζεται από τρία σημεία (το πρόσθιο άκρο του αυλού του αρτηριακού βολβού, το οπίσθιο άκρο του αυλού του αρτηριακού βολβού και το κέντρο του 1^{ου} σπονδύλου). (B) Μεγέθυνση του εικονιδίου (A) που δείχνει την κοιλία (ven), τον αρτηριακό βολβό (ba), και τις μετρήσεις των αποστάσεων που πραγματοποιήθηκαν. (C) Απεικόνιση του τρισδιάστατου πλέγματος (3-D mesh) της κοιλίας (πράσινο) και του αρτηριακού βολβού (μώβ). (V) πρώτος σπόνδυλος, (ba) αρτηριακός βολβός, (ven) κοιλία, (Σημείο 1) 1η πρόσθια βραγχιακή διασταύρωση του αρτηριακού βολβού, (Σημείο 2) βαλβίδα βολβού – κοιλίας, (Σημείο 3) κορυφή της κοιλίας, (D₁₋₂) μήκος αρτηριακού βολβού BaL, (D₂₋₃) μήκος κοιλίας VL, (D₄₋₅) μέγιστο ύψος κοιλίας VD, κάθετα στο VL.

2.1.4.2.3 Υπολογισμός του σχετικού όγκου μυοκαρδίου κοιλίας

Η ποσοτικοποίηση του όγκου του μυοκαρδίου κοιλίας πραγματοποιήθηκε σε ειδική υπορουτίνα του λογισμικού Amira (“Segmentation Editor”, Εικόνα 2.9). Η επιλογή (extraction) πραγματοποιήθηκε αυτόματα, ορίζοντας ένα όριο (threshold) στις διαβαθμίσεις του γκρι, ώστε να είναι ευδιάκριτες οι πυκνές περιοχές (μυοκάρδιο) από τις λιγότερο πυκνές περιοχές της κοιλότητας (lumen). Υπολογίστηκαν ο όγκος του μυοκαρδίου κοιλίας (Myo V), ο όγκος της κοιλότητας (Cavity V) και το άθροισμά τους (TotalV= Myo V + Cavity V).

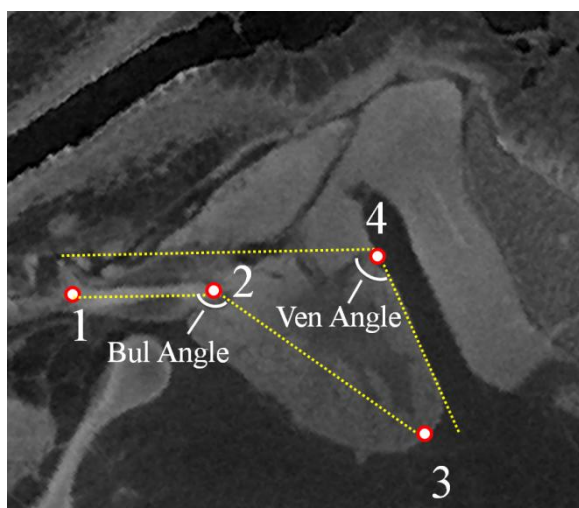
Στην Εικόνα 2.9 το μυοκάρδιο έχει χρωματιστεί με ροζ χρώμα, ενώ η κοιλότητα έχει παραμείνει μαύρη. Ο συνολικός όγκος του μυοκαρδίου για κάθε τρισδιάστατο πλέγμα υπολογίστηκε με την ειδική υπορουτίνα του Amira (“Surface area”).



Εικόνα 2.9: Ψηφιακή τομή όπου το μυοκάρδιο (ροζ χρώμα) είναι ευδιάκριτο σε σχέση με την κοιλότητα (μάυρο χρώμα) (“Segmentation Editor”, Amira).

2.1.4.2.4 Υπολογισμός της γωνίας του αρτηριακού βολβού και της κοιλίας

Η διάταξη της καρδιάς υπολογίστηκε μέσω μέτρησης των γωνιών της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού (Ven Angle και Bul Angle αντίστοιχα). Ως γωνία του αρτηριακού βολβού υπολογίστηκε η γωνία που ορίζεται από την παράλληλη του αορτικού αυλού που περνά από τη βαλβίδα βολβού – κοιλίας (Εικόνα 2.10, Σημεία 1 και 2) και της ευθείας που ενώνει τη βαλβίδα βολβού-κοιλίας (Σημείο 2) με το απώτερο άκρο της κοιλίας (apex, Σημείο 3). Η προς μέτρηση γωνία της κοιλίας ορίστηκε ως η γωνία που σχηματίζεται από την παράλληλη του αορτικού αυλού και την ευθεία που τέμνει (στο Σημείο 4) την οπίσθια πλευρά της κοιλίας.



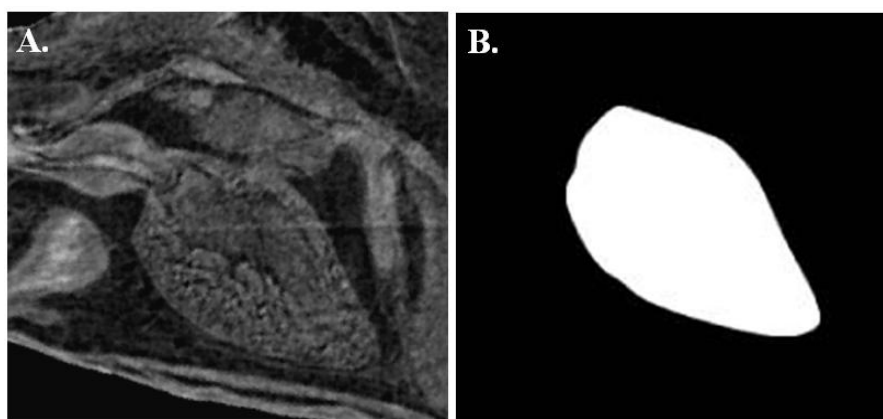
Εικόνα 2.10: Αντιπροσωπευτική 2-D διατομή των μετρήσεων σχήματος και υπολογισμού γωνιών. Απεικονίζονται οι μετρήσεις που έγιναν για τον υπολογισμό των γωνιών του αρτηριακού βολβού (BulAngle) και της κοιλίας (Ven angle). (Σημείο 1) 1η πρόσθια βραγχιακή διασταύρωση του αρτηριακού βολβού, (Σημείο 2) βαλβίδα βολβού – κοιλίας, (Σημείο 3) κορυφή της κοιλίας, (Σημείο 4) απώτερο σημείο του ραχιαίου μέρους της κοιλίας από το κοιλιακό, (Bul Angle), γωνία αρτηριακού βολβού, (Ven Angle) γωνία κοιλίας.

Οι μετρήσεις υπολογισμού των γωνιών πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού tpsDig (“make angle measurements” υπορουτίνα) (Rohlf 2015). Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στις ίδιες δισδιάστατες τομές όπου έλαβαν μέρος οι μετρήσεις του σχήματος και του όγκου (§ 2.1.4.2.2). Αφού έγινε εισαγωγή των τομών στο πρόγραμμα tpsDig με τη μορφή TIFF αρχείων, υπολογίστηκαν οι δύο γωνίες όπως απεικονίζεται στην Εικόνα 2.10.

2.1.4.2.5 Fourier ανάλυση του σχήματος της κοιλίας

Για την επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων του σχήματος της κοιλίας (με τη μέτρηση του λόγου VL/VD) πραγματοποιήθηκε μια ανεξάρτητη ανάλυση, μέσω της εξέτασης του περιγράμματος της κοιλίας. Για την ανάλυση του περιγράμματος χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες δισδιάστατες τομές με αυτές του υπολογισμού του σχήματος (VL/VD) της κοιλίας της καρδιάς.

Το περίγραμμα της κάθε κοιλίας σχεδιάστηκε στο πρόγραμμα Power Point, μετά από αναγωγή όλων των εικόνων σε κοινή κλίμακα. Οι τομές στη συνέχεια μετατράπηκαν σε δυαδικού τύπου ασπρόμαυρες εικόνες (binary images, Εικόνα 2.11). Οι δυαδικού τύπου εικόνες της κάθε ομάδας εισάχθηκαν στο πακέτο ‘ShapeR’ (Libungan and Pálsson 2015) όπου έγινε εξαγωγή των αρμονικών Fourier (12 harmonics) κανονικοποιημένες ως προς το τυπικό μήκος (SL) του ψαριού. Για την εξάλειψη των επιπτώσεων της θέσης του μεγέθους, του προσανατολισμού και του σημείου αναφοράς του κάθε δείγματος οι τρεις πρώτοι συντελεστές Fourier από την πρώτη αρμονική εξαλείφθηκαν. Το σύνολο των 12 αρμονικών περιγράφει το 98.5% των συνολικών χαρακτηριστικών του περιγράμματος της κάθε κοιλίας. Η κανονικοποίηση ως προς το τυπικό μήκος σώματος (SL) του ψαριού αφαίρεσε από την κάθε ανάλυση τους αντίστοιχους συντελεστές Fourier που επιδρούν στις διαφορές του σχήματος βάσει των αλλομετρικών διαφορών.



Εικόνα 2.11: (A) Δισδιάστατη τομή της καρδιάς του zebrafish. (B) Δυαδική ασπρόμαυρη εικόνα της τομής (A).

Οι συντελεστές Fourier της κάθε ανάλυσης εξετάστηκαν στατιστικά με βάση την εκάστοτε ομαδοποίηση στο PRIMER-E (v.6 software PERMANOVA add-on) (Clarke and Gorley 2006). Για την ανάλυση της διακύμανσης του σχήματος της κοιλίας με βάση τη θερμοκρασία ανάπτυξης και το στάδιο/φύλο, πραγματοποιήθηκε

κανονική ανάλυση κύριων συντεταγμένων (Canonical Analysis of Principal Coordinates CAP, (Anderson and Willis 2003, Anderson and Robinson 2003) στις ευκλείδειες αποστάσεις των συντελεστών Fourier. Για τον έλεγχο της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο κάθε στάδιο και της επίδρασης του σταδίου στην ίδια θερμοκρασία, κάναμε μη παραμετρική ανάλυση διακύμανσης (Permanova). Για τον κατά ζεύγη στατιστικό έλεγχο της κάθε ανάλυσης εφαρμόστηκε pair wise test (Permanova).

2.1.5 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη γονιδιακή έκφραση των γονιδίων ιχθυδίων zebrafish

Τα πειράματα είχαν ως στόχο τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην ποσοτική έκφραση πέντε γονιδίων εμπλεκόμενων στη διαμόρφωση της καρδιάς του zebrafish. Τα γονίδια που εξετάστηκαν ήταν: το *nppa* (natriuretic peptide precursor a), το *nfatc1*, (nuclear factor of activated T cells), το *myh7* (myosin heavy chain 7), το *mybpc3* (myosin binding protein C) και η *actb2* (*actin, beta 2*) (Schulz and Yutzey 2004, England and Loughna 2013, Sergeeva and Christoffels 2013, Yalcin *et al.* 2016). Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μελετήθηκαν στο τέλος της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών (στάδιο A) καθώς και 20 μέρες μετά από εγκλιματισμό των ψαριών στις κοινές συνθήκες των 28°C (στάδιο B). Οι τιμές έκφρασης των γονιδίων κανονικοποιήθηκαν με το γονίδιο αναφοράς *18S RNA*.

2.1.5.1 Λήψη και προετοιμασία των δειγμάτων

Η μέτρηση των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε στην καρδιά των ιχθυδίων. Μετά από θανάτωση των ιχθυδίων σε μείγμα νερού με πάγο (για την απενεργοποίηση των RNAασών), ακολούθησε μέτρηση του τυπικού μήκους σώματος με τη βοήθεια μιας κλίμακας, εκτομή της κοιλίας υπό μεγέθυνση του στερεοσκοπίου (σε λιγότερο από 1 min), και απομόνωση της. Μετά την εκτομή, οι ιστοί τοποθετήθηκαν σε 50μl του αντιδραστηρίου TRIzol (Invitrogen) μέσα σε κωδικοποιημένα φιαλίδια (cryovials). Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια στους -80°C προκειμένου να αποφευχθεί η δράση των ενδογενών RNA νουκλεασών.

Η ομαδοποίηση των κοιλίων σε δείγματα έγινε με αναλογία 1:1 και από τις δύο πειραματικές επαναλήψεις. Στον πίνακα 2.4 αναγράφονται αναλυτικά πόσες καρδιές συντέλεσαν το κάθε δείγμα, ο αριθμός των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και το μέσο τυπικό μήκος των ψαριών που επιλέχθηκαν για κάθε θερμοκρασία και για κάθε στάδιο (A και B).

Πίνακας 2.4: Το πλήθος (n) και το μέσο τυπικό μήκος σώματος (SL) των ιχθυδίων που ελήφθησαν για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης της καρδιάς του zebrafish στο στάδιο A (Stage A, τέλος επίδρασης συνθηκών) και 20 μέρες εργότερα στο στάδιο B (Stage B)

Stage A				
T _D	Dpf	n	pooled of (no of hearts)	SL±SD (mm)
24	35	4	4	13,9±0,3
28	28	4	3-8	12,0±0,2
32	28	3	2-8	12,4±0,5
Stage B				
24	65	5	2	17,1±0,3
28	48	5	2	17,4±0,2
32	48	5	2	17,2±0,3

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (Dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, (SL) τυπικό μήκος.

2.1.5.2 Εξαγωγή RNA, σύνθεση cDNA και Real-Time PCR

Για τη μελέτη της γονιδιακής έκφρασης στην καρδιά των ιχθυδίων, χρησιμοποιήθηκαν από τρία έως πέντε δείγματα για κάθε θερμοκρασιακή συνθήκη και στάδιο. Για την ενίσχυση των υπό μελέτη γονιδίων-στόχων σχεδιάστηκαν οι αντίστοιχοι εκκινητές (primers) με τη βοήθεια του Primer3 λογισμικού (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>). Οι εκκινητές (primers) είναι ολιγονουκλεοτίδια 18-30 βάσεων που οριοθετούν το τμήμα DNA που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί. Οι αλληλουχίες των εκκινητών (reverse και forward primers) καθώς και το μέγεθος τους (amplicon size) απεικονίζονται στον πίνακα 2.5.

Το ολικό RNA απομονώθηκε με τη χρήση του αντιδραστηρίου TRIzol και υποβλήθηκε σε περαιτέρω καταστροφή των εναπομεινάντων υπολειμμάτων DNA με το ένζυμο Turbo DNase (Ambion 2238G2). Την απομόνωση του ολικού RNA, ακολούθησε η σύνθεση cDNA με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (PrimeScript RT reagent kit, Takara). Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων εφαρμόστηκε Real Time PCR (Q-PCR) με αραιώση 1:8 του cDNA όλων των υπό εξέταση γονιδίων στόχων αλλά και του γονιδίου αναφοράς. Για την κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν 10μl του αντιδραστηρίου φθορισμού (KAPA SYBR Fast qPCR Kit, Kapa Biosystems), 300nM συγκέντρωσης των εκκινητών, και 5μl του cDNA. Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή (Light Cycler 96, Roche). Ως αρνητικοί μάρτυρες (negative control) χρησιμοποιήθηκαν οι αντιδράσεις που δεν περιείχαν υπόστρωμα. Το 18S RNA χρησιμοποιήθηκε ως γονίδιο αναφοράς. Οι αντιδράσεις έτρεξαν εις διπλούν για κάθε υπό εξέταση δείγμα. Ο αριθμός των κύκλων Ct (threshold cycle, η τιμή που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο η τιμή του φθορισμού προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο) υπολογίστηκε από τα επίπεδα έκφρασης του φθορισμού για την κάθε αντίδραση.

Πίνακας 2.5: Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν, το μέγεθός τους και ο κωδικός τους στο NCBI.

Primer	Forward primer (5' – 3')	Reverse primer (5' – 3')	Amplicon Size (bp)	NCBI
18SRNA	CACTTGTCCCTCTAAGAAGTTGCA	GGTTGATTCCGATAACGAACGA	91	BC155300.1c
<i>nfatc1</i>	ATGTCCAACCCAAGTCTCATCA	GTGCCTATGAACAGCTGTAGGG	147	NM_001045159.1
<i>nppa</i>	ACAGCTCTGACAGCAACATGG	GTCTCTGTCCCAGGATGTGG	154	NM_198800.3
<i>myh7</i>	CAGAACCCTCCAAAGTTTGATAA	TATAGGCTACAACCACCTCCTGA	192	NM_001112733
<i>mybpc3</i>	AACTGGAAGTTCGCCCTCAA	TCACACCATGGGGATGTGAG	210	NM_001044349.2
<i>actin b2</i>	CGAGCTGTCTTCCCATCCA	TCACCAACGTAGCTGTCTTTCTG	86	AF025305.1

Τα αποτελέσματα της Real Time PCR αναλύθηκαν με τη μέθοδο της σχετικής ποσοτικοποίησης (Relative Quantification). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη σύγκριση των Ct τιμών του γονιδίου στόχου (target gene) με τις Ct τιμές του γονιδίου αναφοράς (reference gene) (Μέθοδος $2^{-\Delta\Delta CT}$) (Livak and Schmittgen 2001). Αρχικά, υπολογίστηκε η διαφορά της Ct τιμής του γονιδίου στόχου από τη Ct τιμή του γονιδίου αναφοράς:

$$\Delta C_T = C_{T_{\text{γονιδίου στόχου}}} - C_{T_{\text{γονιδίου αναφοράς}}}$$

όπου, ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το *18S RNA*, και ως γονίδια στόχοι το *nfatc1*, το *nppa*, το *myh7*, το *mybpc3* και η *actin b2*.

Για τον υπολογισμό της διαφοράς της μέσης τιμής ΔC_T του προς εξέταση δείγματος με τη μέση τιμή ΔC_T ενός δείγματος αναφοράς (εσωτερικός μετρητής), υπολογίστηκε η τιμή $\Delta\Delta C_T$:

$$\Delta\Delta C_T = \text{average } \Delta C_T \text{ (δείγμα προς εξέταση)} - \text{average } \Delta C_T \text{ (δείγμα αναφοράς)}$$

όπου δείγμα προς εξέταση τα δείγματα από τους πληθυσμούς των 24 ή 32 °C, και δείγμα αναφοράς, το δείγμα από τον πληθυσμό των 28 °C

Τα αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων εκφράστηκαν ως μέση τιμή του $2^{-\Delta\Delta C_T} + 1\text{SEM}$.

2.1.6 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη γονιμότητα του zebrafish

Τα πειράματα είχαν ως στόχο τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη γονιμότητα των θηλυκών zebrafish μέσω μέτρησης πέντε παραμέτρων γονιμότητας: i) του αριθμού των ωοτοκίων (SpN), ii) του αριθμού των αβγών σε όλες τις ωοτοκίες (EggsT), iii) του αριθμού των αβγών ανά ωοτοκία (Eggs spawn), iv) του αριθμού των αβγών της καλύτερης ωοτοκίας (EggsB) και v) του λόγου του μέσου αριθμού αβγών καλύτερης ωοτοκίας προς το μέσο συνολικό αριθμό αβγών (Best sp/total). Οι χαρακτήρες μετρήθηκαν ως προς το σύνολο των αβγών. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν δύο φορές (1^η και 2^η πειραματική επανάληψη).

Η πρώτη πειραματική επανάληψη του πειράματος γονιμότητας πραγματοποιήθηκε σε μέσο τυπικό μήκος των ατόμων από 26 έως 30 mm SL, ενώ η δεύτερη, σε μέσο τυπικό μήκος από 30 έως 36 mm SL (οι τιμές του τυπικού μήκους των ατόμων καθώς και οι ημέρες πραγματοποίησης των πειραμάτων αναγράφονται αναλυτικά στον Πίνακα 2.6). Ο πειραματικός σχεδιασμός για την εκτίμηση της γονιμότητας ήταν ίδιος με αυτόν που περιγράφηκε στα προηγούμενα κεφάλαια (§2.1.1).

Πίνακας 2.6: Το μέσο τυπικό μήκος σώματος (SL) των ατόμων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα γονιμότητας της πρώτης (A) και της δεύτερης (B) πειραματικής επανάληψης.

T _D (°C)	A		B	
	Dpf	SL (mm) ± SD	Dpf	SL (mm) ± SD
24	210	28,45 ± 2,07	330	32,62 ± 2,56
28	210	27,98 ± 2,01	330	31,88 ± 2,85
32	210	28,39 ± 2,29	330	32,93 ± 3,13

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (Dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, (SL) τυπικό μήκος σώματος

Για τη μέτρηση του τυπικού μήκους σώματος τα άτομα φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή μηχανή (Canon PowerShot G9) μετά από αναισθητοποίηση με φαινοξαιθανόλη, C ≈ 0,15-0,25 ml/L). Για κάθε θηλυκό άτομο μετρήθηκε το βάρος σώματος ώστε να υπολογιστεί και η σχετική γονιμότητα. Το μέσο βάρος των θηλυκών ατόμων της πρώτης πειραματικής επανάληψης κυμάνθηκε από 0,47 έως 0,53 g ενώ της δεύτερης, από 0,67 έως 0,88 g (Πίνακας 2.7).

Πίνακας 2.7: Το πλήθος (n) και το μέσο βάρος (W) των θηλυκών ατόμων ανά πειραματική συνθήκη που ελήφθησαν για τη μελέτη της γονιμότητας του zebrafish στην πρώτη (A) και δεύτερη (B) πειραματική επανάληψη.

T _D (°C)	Dpf	A		B	
		n	W (g) ± SD	n	W (g) ± SD
24	210	9	0,53 ± 0,13	7	0,80 ± 0,21
28	210	7	0,47 ± 0,16	6	0,67 ± 0,08
32	210	10	0,51 ± 0,06	6	0,88 ± 0,19

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (Dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, (W) βάρος σώματος.

Για τη μελέτη της γονιμότητας στο εργαστήριο, το zebrafish προσφέρει μια σειρά από χαρακτηριστικά που το καθιστούν κατάλληλο και εύκολο για μελέτη οργανισμό μοντέλο. Τα zebrafish είναι μικρά σε μέγεθος, πολλαπλοί ωαποθέτες (batch-sprawners), τα οποία γεννούν αβγά κατά τη διάρκεια όλου του χρόνου κάτω από κατάλληλες εργαστηριακές συνθήκες (Spence and Smith 2006).

Για την εκτίμηση της γονιμότητας των θηλυκών zebrafish, η μεθοδολογία των πειραμάτων που ακολουθήθηκε βασίστηκε σε ανάλογο πείραμα των (Uusi-Heikkilä *et al.* 2012). Οι τελευταίοι, μέτρησαν μια σειρά από αναπαραγωγικές παραμέτρους (μέγεθος, διάμετρος και αριθμός αβγών) για διάστημα τεσσάρων ημερών (δεδομένου ότι τα zebrafish γεννάνε κάθε 1 έως 6 μέρες) (Spence and Smith 2006), με αναλογία φύλου 1:1 σε κάθε ενυδρείο, φωτοπερίοδο 14:10 L:D και θερμοκρασία $26,8 \pm 0,79$ °C (\pm SD).

Η μεθοδολογία του πειράματος που εφαρμόστηκε είναι η ακόλουθη: μια βδομάδα πριν από την έναρξη των πειραμάτων, επιλέχθηκαν και τοποθετήθηκαν για εγκλιματισμό σε ενυδρεία όγκου 3L (28 °C, στο σύστημα εκτροφής zebrafish ZebTEC) μέσα στους συλλέκτες αβγών, ένα θηλυκό και δύο αρσενικά zebrafish της ίδιας πειραματικής συνθήκης και περίπου του ίδιου μήκους σώματος. Η επιλογή των δύο αρσενικών ατόμων ανά ενυδρείο στόχευε στην καλύτερη αναπαραγωγική επιτυχία των θηλυκών ατόμων. Τα άτομα πριν τοποθετηθούν στα ενυδρεία φωτογραφήθηκαν μετά από αναισθητοποίηση με φαινοξαιθανόλη ώστε να είναι δυνατός ο υπολογισμός του τυπικού μήκους (SL). Συνολικά τοποθετήθηκαν 30 ενυδρεία (από 10 για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης). Ο ημερήσιος έλεγχος των αβγών για κάθε πειραματική επανάληψη διήρκεσε πέντε μέρες. Μια μέρα πριν την έναρξη των πειραμάτων, συλλέκτες αβγών τοποθετήθηκαν στα ενυδρεία ενώ το ίδιο απόγευμα, οι πειραματικοί πληθυσμοί έμειναν ατάιστοι ώστε να είναι πιο εύκολη η συλλογή των αβγών την επόμενη μέρα. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, οι πληθυσμοί ταΐζονταν δύο φορές την ημέρα (πρωί και βράδυ).

Κατά τη διάρκεια των πέντε ημερών του πειράματος, η συλλογή των αβγών λάμβανε χώρα κάθε πρωί (τα zebrafish γεννάνε τις πρώτες πρωινές ώρες (Hisaoaka and Firlit 1962), με τη μεταφορά του συλλέκτη αβγών και των ψαριών σε ένα άλλο ενυδρείο ίδιας θερμοκρασίας και τη συλλογή των αβγών από το κάτω μέρος του ενυδρείου. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας τα ενυδρεία καθαρίζονταν από υπολείμματα τροφής. Έπειτα, τα αβγά κάθε ενυδρείου φωτογραφίζονταν στο στερεοσκόπιο (Olympus). Για την εκτίμηση των παραμέτρων γονιμότητας, το σύνολο των αβγών μετρήθηκε με την καταμέτρηση των γονιμοποιημένων αβγών (διαφανή με την παρουσία του βλαστόδισκου) αλλά και των αγονιμοποιημένων (αδιαφάνεια λεκίθου, συσσωματώματα) (Εικόνα 2.12). Μόνο ωοτοκίες μεγαλύτερες από 10 αβγά υπολογίστηκαν στις μετρήσεις. Ενυδρεία τα οποία δεν τηρούσαν κριτήρια όπως αναλογία 1:1, ψάρια που δεν ήταν υγιή στη συμπεριφορά και την τροφοληψία όπως και θηλυκές οι οποίες δε γεννάγανε αβγά, αποκλείστηκαν από τις μετρήσεις. Μετά το τέλος της κάθε πειραματικής επανάληψης, τα άτομα θανατώθηκαν με επαρκή ποσότητα φαινοξαιθανόλης και ζυγίστηκαν σε ζυγαριά ακριβείας.



Εικόνα 2.12: Φωτογραφίες από αυγά zebrafish. Γονιμοποιημένο (αριστερά), και αγονιμοποιητό (δεξιά).

2.1.7 Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων του πρώτου πειράματος

Ο ρυθμός αύξησης κάθε πληθυσμού εκτιμήθηκε ύστερα από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο μοντέλο αύξησης $SL = a \cdot e^{SGR \cdot t}$, μετά από λογαρίθμηση των τιμών τυπικού μήκους. Η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό αύξησης ελέγχθηκε με ανάλυση συνδιασποράς ANCOVA (Statgraphics Plus v.5).

Ο έλεγχος της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχήμα και τον όγκο της καρδιάς, στο σχετικό όγκο μυοκαρδίου κοιλίας, στις γωνίες αρτηριακού βολβού και κοιλίας στην έκφραση των γονιδίων και στη γονιμότητα του zebrafish στους επιμέρους πειραματικούς πληθυσμούς πραγματοποιήθηκε με το μη παραμετρικό τεστ (Kruskal-Wallis) ξεχωριστά για κάθε οντογενετικό στάδιο και φύλο. Η επιλογή του Kruskal-Wallis έναντι της ANOVA έγινε λόγω της ανομοιογένειας των διακυμάνσεων των διαφορετικών πειραματικών ομάδων. Όπου η επίδραση αποδείχτηκε σημαντική ($p < 0,05$) εφαρμόστηκε το Mann-Whitney U test για τον έλεγχο της σημαντικότητας μεταξύ των πειραματικών ομάδων. Η επίδραση του φύλου και του οντογενετικού σταδίου για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης ξεχωριστά μελετήθηκε με τον κατά ζεύγη στατιστικό έλεγχο (Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων των γωνιών, προηγήθηκε μετασχηματισμός από μοίρες ($^{\circ}$) σε ακτίνια (rad) (συνάρτηση RADIANS) και μετέπειτα ακολούθησε ο υπολογισμός του συνημίτονου των προς μελέτη γωνιών (συνάρτηση COS) ώστε να είναι δυνατός ο στατιστικός έλεγχος των αποτελεσμάτων. Η μετατροπή έγινε με τον παρακάτω τύπο:

$$y = ABS(COS(RADIANS(x)))$$

όπου y , το συνημίτονο της υπό εξέταση γωνίας
 (ABS), η απόλυτη τιμή του συνημίτονου
 (COS), η φόρμουλα μετασχηματισμού γωνίας στο συνημίτονό της
 (RADIANS), η φόρμουλα μετασχηματισμού γωνίας από μοίρες ($^{\circ}$) σε ακτίνια
 (rad)
 x , η προς μελέτη γωνία εκφρασμένη σε μοίρες ($^{\circ}$)

Τα αποτελέσματα της έκφρασης των γονιδίων εκφράστηκαν ως μέση τιμή του $2^{\Delta CT} + 1SEM$. Ως προς τα αποτελέσματα της γονιμότητας, για να είναι όλα τα

αποτελέσματα στατιστικά συγκρίσιμα, η κάθε υπό εξέταση παράμετρος διαιρέθηκε με το αντίστοιχο βάρος σώματος του κάθε θηλυκού ατόμου. Τέλος, ως προς την μελέτη της αλλομετρίας του σχήματος της καρδιάς, η αλλομετρική σχέση κάθε χαρακτήρα σε σχέση με το τυπικό μήκος σώματος (SL) ή σε σχέση με ένα άλλο χαρακτήρα, μελετήθηκε μετά από λογαρίθμηση των τιμών του αλλομετρικού μοντέλου:

$$y = ax^b \text{ (Huxley 1976)}$$

όπου y , ο υπό μελέτη χαρακτήρας

x , το τυπικό μήκος σώματος του ψαριού (SL)

a, b : σταθερές που υπολογίζονται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων

Ο τύπος της αλλομετρίας -αρνητική, θετική, ισομετρία- προσδιορίστηκε εξετάζοντας τη κλίση (b) των εξισώσεων έναντι του 1 (για $b_0=1$, για αλλομετρία χαρακτήρων ίσων διαστάσεων έναντι του μήκους) ή έναντι του 3 (για $b_0=3$, για αλλομετρία όγκου έναντι του μήκους) με τη δοκιμή του Student's t-test (Sokal and Rohlf 1981). Οι συγκρίσεις των συντελεστών αλλομετρίας μεταξύ των θηλυκών και των αρσενικών ατόμων των διαφορετικών θερμοκρασιών πραγματοποιήθηκε με ανάλυση συνδιακύμανσης ANCOVA (STATGRAPHICS).

2.2. Δεύτερο πείραμα: Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην κολυμβητική ικανότητα του zebrafish

Τα πειράματα εκτίμησης της αερόβιας κολυμβητικής ικανότητας του zebrafish, είχαν ως στόχο τη διερεύνηση του κατά πόσο η πλαστικότητα της καρδιάς έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης μπορεί να σχετίζεται με τη λειτουργία της (καθώς η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης αποτελεί δείκτη καρδιακής παροχής, § 2.4.3). Οι μέχρι τώρα σχετικές εργασίες, έχουν συσχετίσει το συγκριτικά πιο κυκλικό σχήμα κοιλίας των ψαριών με μειωμένη κολυμβητική ικανότητα και συνεπώς με μειωμένη καρδιακή παροχή (Claireaux *et al.* 2005, Hicken *et al.* 2011). Για την διερεύνηση της συσχέτισης της πλαστικότητας της κολύμβησης με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την πλαστικότητα της καρδιάς, υπολογίστηκε η σχετική κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (RU_{crit}) σε ιχθύδια, αρσενικά και θηλυκά zebrafish.

2.2.1 Βασικός πειραματικός σχεδιασμός και σύσταση πειραματικών πληθυσμών

Για τα πειράματα κολύμβησης επαναλήφθηκε ο βασικός πειραματικός σχεδιασμός των πειραμάτων που περιγράφηκαν στην προηγούμενη ενότητα.

Γονιμοποιημένα αβγά από κοινό απόθεμα γεννητόρων διαμοιράστηκαν στο στάδιο του βλαστιδίου (2.25 - 5.25 hpf, ώρες μετά τη γονιμοποίηση) σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης (22.8 ± 0.2 , 27.9 ± 0.4 , ή 31.8 ± 0.7 °C, \pm SD). Οι διαφορετικές θερμοκρασίες εφαρμόστηκαν μέχρι το στάδιο της μεταμόρφωσης, περίπου στα 10,2 – 13,0 mm SL (Πίνακας 2.8). Μετά την λήξη της εφαρμογής των

διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών, η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε κοινές συνθήκες (με τους πληθυσμούς να παραμένουν φυσικά διαχωρισμένοι) και σε θερμοκρασία $28 \pm 0,2 \text{ }^\circ\text{C}$ ($\pm \text{SD}$).

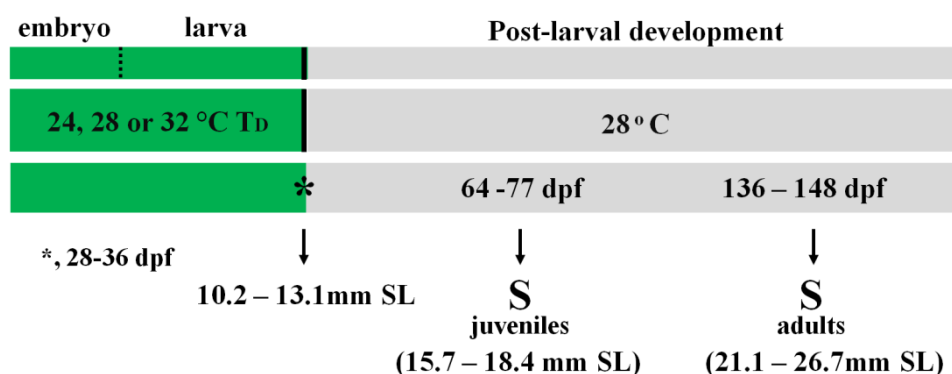
Πίνακας 2.8 Ηλικία και μέσο τυπικό μήκος σώματος των ιχθυδίων zebrafish στο τέλος της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών για τις δύο πειραματικές επαναλήψεις (A και B).

T_D ($^\circ\text{C}$)	Dpf	A		B	
		n	SL (mm) \pm SD	n	SL (mm) \pm SD
24	43	29	12,4 \pm 2,3	22	13,1 \pm 2,5
28	38	30	10,2 \pm 1,8	26	11,4 \pm 2,4
32	34	51	12,3 \pm 2,1	24	11,9 \pm 2,3

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (Dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, (SL) τυπικό μήκος σώματος.

Τα πειράματα κολύμβησης πραγματοποιήθηκαν για τα ιχθύδια στα 16,0 έως 18,5 mm SL (20 μέρες μετά το τέλος της εφαρμογής των κοινών συνθηκών), και στα 21 έως 27 mm SL για τα ενήλικα (100 μέρες μετά το τέλος της εφαρμογής των κοινών συνθηκών) (Εικόνα 2.13). Η μέτρηση της κρίσιμης ταχύτητας των ιχθυδίων έγινε μετά από ένα συγκεκριμένο διάστημα παραμονής στις κοινές συνθήκες (20 μέρες) το οποίο έχει στο παρελθόν προταθεί ως κατάλληλο για την εξάλειψη των θερμοκρασιακών επιδράσεων του εγκλιματισμού στο zebrafish (Scott and Johnston 2012).

Η σύσταση και διατήρηση των γεννητόρων και των πειραματικών πληθυσμών ήταν ίδια με αυτήν των πειραμάτων που περιγράφηκαν στα προηγούμενα κεφάλαια όσον αφορά στις συνθήκες (φωτοπερίοδος, pH, αγωγιμότητα, κορεσμός σε O_2 , πρωτόκολλο ταϊσμάτων και ανανέωση νερού, § 2.1.2, Υλικά και Μέθοδοι). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο πειραματικές επαναλήψεις A και B. Οι πληθυσμοί της κάθε πειραματικής επανάληψης χωρίστηκαν σε 2 ενυδρεία. Όλα τα ενυδρεία από τα οποία πάρθηκαν τα δείγματα του πειράματος είχαν τον ίδιο βαθμό ιχθυοφόρτισης. Στο παρόν πείραμα, το ποσοστό επιβίωσης για τους $24 \text{ }^\circ\text{C}$ κυμάνθηκε από 48 έως 62%, για τους $28 \text{ }^\circ\text{C}$ από 61 έως 74 % και για τους $32 \text{ }^\circ\text{C}$, από 30 έως 45%.



Εικόνα 2.13: Σχηματική αναπαράσταση του γενικού πειραματικού σχεδιασμού των πειραμάτων κολύμβησης. Τρεις πληθυσμοί zebrafish υποβλήθηκαν σε τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες ανάπτυξης (24 , 28 ή $32 \text{ }^\circ\text{C}$) από τη γονιμοποίηση μέχρι τη μεταμόρφωση (*). Μετά την λήξη της εφαρμογής των διαφορετικών θερμοκρασιών, η ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε σε κοινές συνθήκες ($28 \text{ }^\circ\text{C}$). Το πείραμα περιέλαβε 2 πειραματικές επαναλήψεις για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης. Περιλαμβάνονται οι

δειγματοληψίες των ιχθυδίων και ενήλικων zebrafish που ελήφθησαν για τα πειράματα κολύμβησης. (T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (Dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, (SL) τυπικό μήκος, (S) πειράματα κολύμβησης.

2.2.2 Μέτρηση κολυμβητικής ικανότητας

Για τον υπολογισμό της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης συνολικά εξετάστηκαν από 14 έως 17 ιχθυδία ανά πειραματική συνθήκη (από 15,7 έως 18,4 mm SL) και από 6 έως 7 άτομα (από 21,1 έως 26,7 mm SL) ανά φύλο και πειραματική συνθήκη για τα ενήλικα (Πίνακας 2.9).

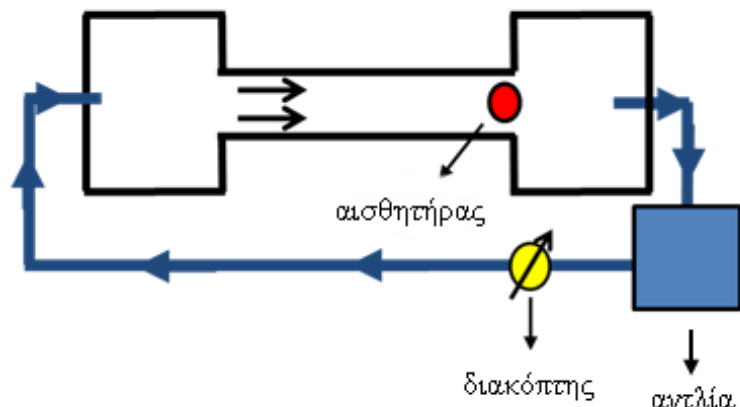
Πίνακας 2.9: Το πλήθος (n) και το μέσο τυπικό μήκος σώματος (SL) των ιχθυδίων και ενήλικων zebrafish που ελέχθησαν για την κολυμβητική τους ικανότητα στις δύο πειραματικές επαναλήψεις (A και B).

		A		B	
T_D (°C)	Dpf	n	SL (mm)	n	SL (mm)
Juveniles					
24	77	9	16,9 ± 0,9	8	18,4 ± 1,1
28	70	7	16,7 ± 0,8	7	16,4 ± 2,0
32	64	7	15,7 ± 1,2	8	16,5 ± 0,9
Females					
24	148	5	23,9 ± 1,2	2	23,6 ± 0,8
28	141	5	24,1 ± 1,5	2	21,1 ± 0,3
32	136	3	26,7 ± 3,0	4	26,6 ± 1,6
Males					
24	148	4	22,7 ± 0,3	2	22,7 ± 0,4
28	141	3	23,7 ± 0,3	3	22,6 ± 0,9
32	136	3	23,5 ± 0,3	3	24,2 ± 1,1

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (Dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, (SL) τυπικό μήκος

Η μέτρηση της κολυμβητικής ικανότητας πραγματοποιήθηκε με υπολογισμό της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης (critical swimming speed, U_{crit}) σύμφωνα με τους (Koumoundouros *et al.* 2002) σε κατάλληλα σχεδιασμένη συσκευή κολύμβησης. Η συσκευή κολύμβησης αποτελείται από ένα κανάλι κολύμβησης μήκους 70 cm, πλάτους 5 cm και ύψους 10 cm συνδεδεμένο με δύο κλειστές δεξαμενές χωρητικότητας 30 L (Εικόνα 2.14).

Στη συσκευή αυτή, το νερό μεταφέρεται από το ένα δοχείο στο άλλο μέσω του καναλιού κολύμβησης, με τη χρήση αντλιών (EHEIM, μοντέλο 2217) ελεγχόμενης ροής (Εικόνα 2.14). Η ταχύτητα του νερού στο κανάλι κολύμβησης μετρείται με τη βοήθεια ηλεκτρομαγνητικού ρευματογράφου (Valeport, Model 801), ενώ η θερμοκρασία ρυθμίζεται με τη βοήθεια αντιστάσεων (FLUVAL tronic, 300W) και με ψυκτικό μηχανήμα (SFILIGOI, 200W). Πλαστικά καλαμάκια τοποθετημένα στην άκρη του καναλιού συνέβαλαν στη διατήρηση ελασματικής ροής μέσα στο κανάλι και στην αποτροπή της διαφυγής των ψαριών από αυτό. Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων το βάθος του νερού στο κανάλι διατηρούνταν στα 4,5 cm.



Εικόνα 2.14: Κάτοψη της συσκευής κολύμβησης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Το νερό αφαιρείται από τη μία δεξαμενή και προστίθεται στην άλλη, με τέτοιο τρόπο ώστε να δημιουργείται το απαραίτητο ρεύμα νερού εντός του καναλιού κολύμβησης. Η ένταση του ρεύματος νερού τροποποιείται με τη χρήση αντλιών και διακοπών ροής. Η ταχύτητα του νερού στο κανάλι ρυθμίστηκε με τη χρήση ηλεκτρομαγνητικού ρευματογράφου (αισθητήρας).

Η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης μετρήθηκε ατομικά για κάθε ψάρι. Δεκαοχτώ με είκοσι ώρες πριν την έναρξη των πειραμάτων, τα ψάρια αναισθητοποιούνταν, και μετά από μέτρηση του τυπικού μήκους σώματος, μεταφέροντουσαν σε μια δεξαμενή ίδιας θερμοκρασίας με τη θερμοκρασία διατήρησης των πληθυσμών (28 °C) και παρέμεναν εκεί σε συνθήκες νηστείας.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, τα ψάρια αρχικά τοποθετούνταν μέσα στο κανάλι κολύμβησης για 10 min με ταχύτητα νερού ίση με 2 SL s⁻¹ (μήκη σώματος ανά δευτερόλεπτο). Η ταχύτητα έπειτα του νερού αυξανόταν κάθε 10 min κατά 1 SL s⁻¹. Το ψάρι θεωρούνταν πως εξουθενώθηκε όταν παρασύρονταν εκτός του καναλιού χωρίς να μπορεί να ανταποκριθεί πλέον σε κανένα οπτικοακουστικό ερέθισμα.

Η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (U_{crit}) υπολογίστηκε με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$U_{crit} = U_i + (U_{ii} \times t_i/t_{ii}) \text{ (Brett 1964)}$$

όπου U_i η υψηλότερη ταχύτητα κολύμβησης (mm s⁻¹) που κατάφερε να διατηρήσει το εκάστοτε άτομο για ολόκληρο το διάστημα των 10 λεπτών, U_{ii} το βήμα αύξησης της ταχύτητας (20, 25, 30, 35 ή 40 mm s⁻¹, αναλόγως το μήκος του κάθε ατόμου), t_i ο χρόνος (min) για τον οποίο το κάθε ψάρι κολύμπησε στην ταχύτητα στην οποία εξαντλήθηκε, και t_{ii} το βήμα (min) του χρόνου που μεσολαβούσε σε κάθε ταχύτητα κολύμβησης (10 min, σταθερό). Κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, η θερμοκρασία του νερού ήταν 28 °C και ο κορεσμός σε οξυγόνο 100%.

Μετά τη λήξη του πειράματος, τα εξαντλημένα ψάρια συλλαμβάνονταν, αναισθητοποιούνταν με MS222 (100mg/L⁻¹) και φωτογραφίζονταν στο στερεοσκόπιο (OLYMPUS) για να μπορεί να γίνει ο ακριβής υπολογισμός του τυπικού μήκους τους και ανάλυση του σχήματός τους. Τέλος, τα άτομα εξετάζονταν για παρουσία μορφοανατομικών ανωμαλιών. Μόνο άτομα με φυσιολογικό σχήμα σώματος συμπεριλήφθηκαν στα αποτελέσματα.

Υπολογίστηκε η σχετική κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (RU_{crit}) μετά από κανονικοποίηση των τιμών με το ακριβές μήκος σώματος των ψαριών, όπως αυτή δίνεται από τον τύπο

$$RU_{crit} = U_{crit} SL^{-1} \text{ (Beamish 1979)}$$

Η ανεξαρτησία της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης (U_{crit}) από το μήκος σώματος των ιχθύων (SL), υπολογίστηκε μετά από λογαρίθμηση των τιμών U_{crit} και SL. Οι συντελεστές αλλομετρίας του λογαριθμοποιημένου γραμμικού αλλομετρικού μοντέλου ($Y = \log a + b \log X$) συγκρίθηκαν με τη μονάδα ($b_0=1$, ισομετρία) με την εφαρμογή t-test ($p < 0,05$) (Sokal and Rohlf 1981). Οι συγκρίσεις των συντελεστών αλλομετρίας μεταξύ διαφορετικών θερμοκρασιών πραγματοποιήθηκαν με ανάλυση συνδιασποράς (ANCOVA, STATISTICA).

Η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης των ιχθυδίων και ενήλικων zebrafish μελετήθηκε με το μη παραμετρικό τεστ (Kruskal-Wallis). Για τις περαιτέρω ανά ζεύγη συγκρίσεις των πληθυσμών με βαθμό σημαντικότητας $p < 0,05$, εφαρμόστηκε το Mann-Whitney U test. Η επίδραση του φύλου και του οντογενετικού σταδίου για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης, μελετήθηκε με τον κατά ζεύγη στατιστικό έλεγχο Mann-Whitney U test.

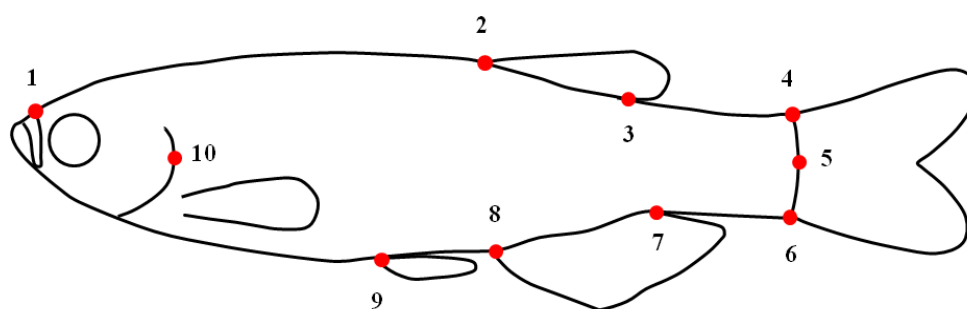
2.2.3 Ανάλυση του σχήματος σώματος των ιχθυδίων και ενήλικων zebrafish

Για τη μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην εξωτερική μορφολογία του σώματος του zebrafish, συνολικά εξετάστηκαν από 14 έως 17 άτομα ανά πειραματική συνθήκη για τα ιχθύδια, και από 6 έως 7 άτομα ανά φύλο και πειραματική συνθήκη για τα ενήλικα (§ Πίνακας 2.10).

Ο έλεγχος των διαφορών σχήματος μεταξύ των πληθυσμών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της γεωμετρικής μορφομετρίας. Με τη βοήθεια εξειδικευμένου λογισμικού (tpsDig) (Rohlf 2015), τοποθετήθηκαν 10 ομόλογα μορφομετρικά σημεία σε ευδιάκριτες ανατομικές περιοχές στα ιχθύδια και στα ενήλικα άτομα (Εικόνα 2.15). Τα ορόσημα (landmarks) για την μορφομετρική ανάλυση επιλέχθηκαν ώστε να καθορίζουν διακριτές ανατομικές περιοχές.

Τα μορφομετρικά σημεία των δειγμάτων των υπό εξέταση πληθυσμών, επεξεργάστηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα IMP (CoordGen6d), (Rohlf and Slice 1990) οπότε και καθορίστηκε η μέση διαμόρφωση σχήματος και το κεντροειδές μέγεθος. Στη συνέχεια υπολογίστηκε ο πίνακας βαρύτητας (weight matrix) των τιμών στρέβλωσης (partial warp scores), αφού εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος “thin-plate spline” στο σύνολο των μορφομετρικών σημείων κάθε δείγματος (TpsRelw, έκδοση 1.07) (Rohlf 1996) και αφαιρέθηκε οποιαδήποτε επίδραση του μεγέθους και της αλλομετρίας (Parsons *et al.* 2003) με το λογισμικό IMP-Standard6. Στον πίνακα βαρύτητας εφαρμόστηκε η τροποποιημένη (RWA, Relative Warp Analysis) (Rohlf

and Marcus 1993) ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA, Principal Component Analysis), η ανάλυση κανονικών συνιστωσών (CVA, Canonical Variate Analysis) (STATISTICA) ή η ανάλυση διαχωρισμού (Discriminant Analysis) για την εκτίμηση της σημαντικότητας των διαφορών σχήματος μεταξύ των υπό εξέταση πληθυσμών (Georgakopoulou *et al.* 2007). Στις αποστάσεις Mahalanobis (Ευκλείδειες αποστάσεις) κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε ανάλυση ιεραρχικής ομαδοποίησης (Cluster Analysis) για να διαπιστωθούν οι ομαδοποιήσεις με βάση το σχήμα σώματος. Για τον προσδιορισμό των πλεγμάτων παραμόρφωσης, έγινε ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης των ομοιόμορφων και των μη ομοιόμορφων συνιστωσών του σχήματος, με τις μεταβλητές της ανάλυσης κανονικών συνιστωσών (tpsRegr) (Rohlf 1996, Georgakopoulou *et al.* 2007).



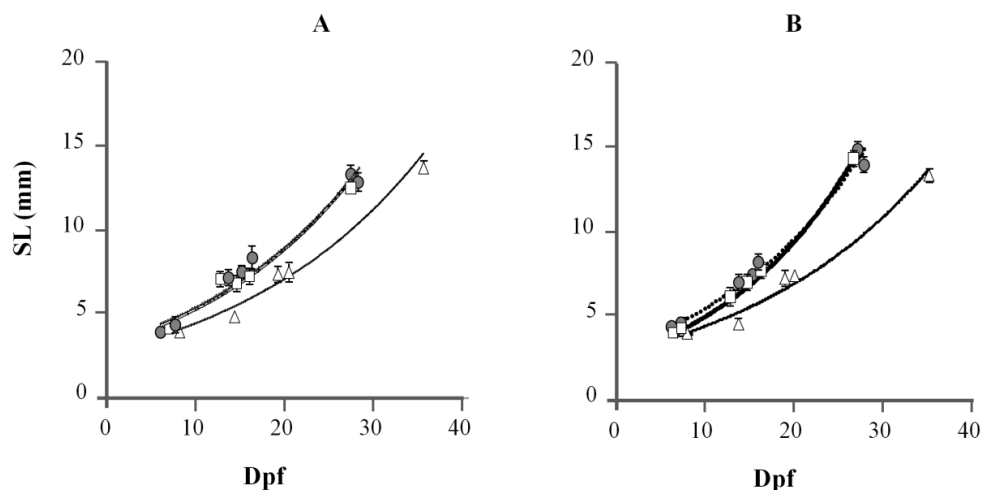
Εικόνα 2.15: Θέση των 10 μορφομετρικών σημείων που τοποθετήθηκαν στα ιχθύδια και ενήλικα zebrafish για τη μελέτη του σχήματος σώματος. (1) Άκρο του ρύγχους (2) Βάση της πρώτης ακτίνας του ραχιαίου πτερυγίου (3) Βάση της τελευταίας ακτίνας του ραχιαίου πτερυγίου (4) Άνω άκρο της βάσης των ουραίων λεπιδοτριχιών (5) Μέσο της βάσης των ουραίων λεπιδοτριχιών (6) Κάτω άκρο της βάσης των ουραίων λεπιδοτριχιών (7) Οπίσθιο άκρο της βάσης του εδρικού πτερυγίου (8) Πρόσθιο άκρο της βάσης του εδρικού πτερυγίου (9) Πρόσθιο άκρο βάσης του κοιλιακού πτερυγίου (10) Οπίσθιο άκρο βραγχιακού επικαλύμματος.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην αύξηση του zebrafish

Στο παρόν κεφάλαιο εξετάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας στο ρυθμό αύξησης των πληθυσμών κατά τη διάρκεια της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών. Οι καμπύλες αύξησης του τυπικού μήκους σώματος (SL) για τις δύο πειραματικές επαναλήψεις του πρώτου πειράματος απεικονίζονται στην Εικόνα 3.1.

Τα πειραματικά δεδομένα είχαν καλή προσαρμογή στο θεωρητικό μοντέλο αύξησης που εφαρμόστηκε (Πίνακας 3.1). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης συνδιασποράς έδειξαν ότι στην πρώτη πειραματική επανάληψη η θερμοκρασία δεν είχε σημαντική επίδραση στο ρυθμό αύξησης της νύμφης μέχρι τη μεταμόρφωση. Αντίθετα, στη δεύτερη πειραματική επανάληψη, η θερμοκρασία επέδρασε σημαντικά στο ρυθμό αύξησης (SGR) με τις διαφορές να εντοπίζονται μεταξύ του πληθυσμού των 24 °C και του πληθυσμού των 32 °C (Πίνακας 3.1).



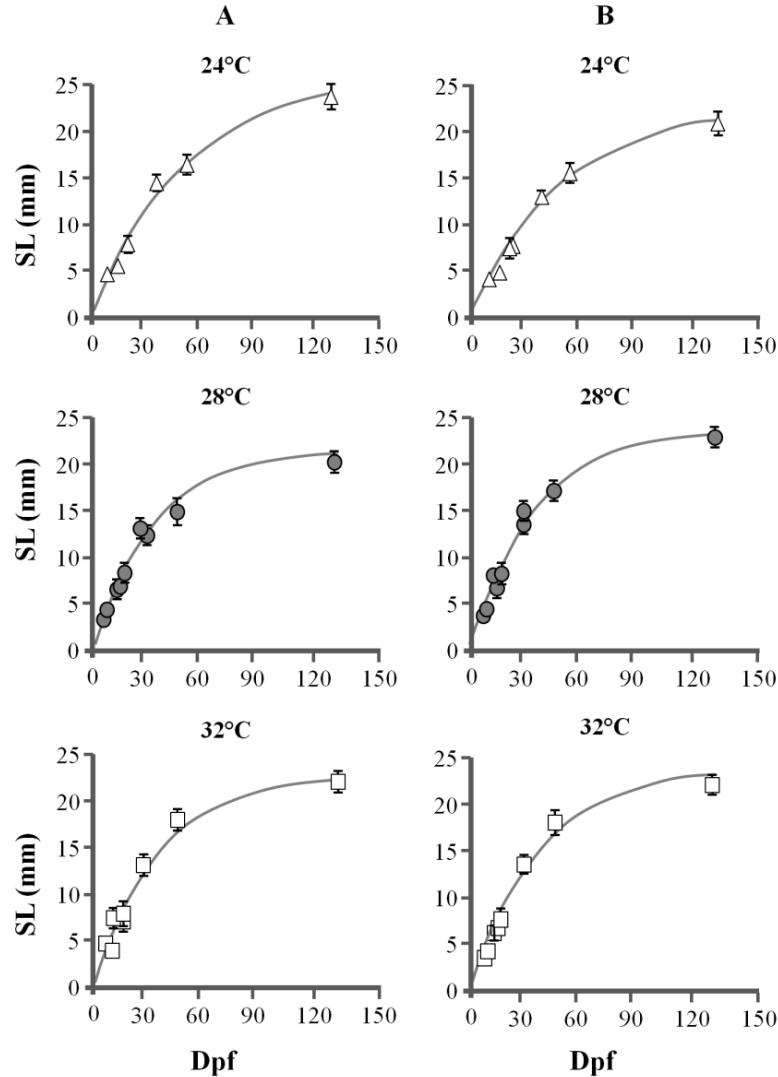
Εικόνα 3.1: Καμπύλες αύξησης του τυπικού μήκους σώματος (SL) των νυμφών zebrafish στις τρεις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας (24, 28, 32°C) για τις δύο πειραματικές επαναλήψεις (A και B). Το άσπρο τετράγωνο αντιστοιχεί στους 32°C, ο γκρι κύκλος στους 28°C και το λευκό τρίγωνο στους 24°C. (Dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με $\pm 2SE$.

Πίνακας 3.1: Οι παράμετροι της σχέσης $SL = a \cdot e^{SGR \cdot t}$ για κάθε πειραματική συνθήκη και επανάληψη (A και B).

T_D	Επανάληψη	A	SGR	SE(SGR)	R^2	n	p (24-28)	p (28-32)	p (24-32)
24	A	1,052	0,047	0,005	0,969	5	0,461	0,901	0,511
28	A	1,197	0,051	0,004	0,975	7			
32	A	1,167	0,052	0,006	0,948	6			
24	B	1,041	0,045 ^a	0,006	0,953	5	0,122	0,204	0,032
28	B	1,41	0,056	0,04	0,979	7			
32	B	0,973	0,063 ^a	0,004	0,986	6			

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (A) το τυπικό μήκος σώματος για $t_0=0$, (SGR) ο ειδικός ρυθμός αύξησης του τυπικού μήκους σώματος των γχθύνων, (R^2) ο συντελεστής συσχέτισης που αποδεικνύει την καλή προσαρμογή των δεδομένων στο θεωρητικό μοντέλο αύξησης, (n) ο αριθμός των δειγματοληψιών, (p) το μικρότερο παρατηρούμενο επίπεδο σημαντικότητας για τις στατιστικά σημαντικές διαφορές των τιμών SGR μεταξύ των διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών εντός κάθε πειραματικής επανάληψης. Οι κοινοί εκθέτες των τιμών SGR υποδεικνύουν διαφορετικούς ρυθμούς αύξησης, εντός κάθε επανάληψης.

Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο πρότυπο αύξησης του zebrafish καθόλη τη διάρκεια της ζωής του (Εικόνα 3.2), εκτιμήθηκαν οι σταθερές της εξίσωσης von Bertalanffy (VBGF) από την αρχή του νυμφικού σταδίου μέχρι την ενηλικίωση (Πίνακας 3.2). Ο υπολογισμός των παραμέτρων αύξησης της εξίσωσης VBGF έγινε δεδομένου ότι $t_0=0$ μετά από έλεγχο του εύρους των τιμών του $t_0 \pm SE$.



Εικόνα 3.2: Καμπύλες αύξησης του τυπικού μήκους σώματος (SL) των πληθυσμών zebrafish σύμφωνα με την εξίσωση VBGF. Απεικονίζονται οι πληθυσμοί στις τρεις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας ανάπτυξης (24, 28, 32°C) για τις δύο πειραματικές επαναλήψεις (A και B). Το άσπρο τετράγωνο αντιστοιχεί στους 32°C, ο γκρι κύκλος στους 28°C και το λευκό τρίγωνο στους 24°C. (Dpf) ημέρες μετά τη γονιμοποίηση. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με $\pm 2SE$.

Από τον Πίνακα 3.2 προκύπτει πως το μέγιστο μήκος σώματος των ψαριών (L_{∞}) φαίνεται να μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στα άτομα της πρώτης πειραματικής επανάληψης (A) ενώ δεν συμβαίνει το ίδιο στα άτομα της δεύτερης πειραματικής επανάληψης (B). Αντίθετα, και στις δύο πειραματικές επαναλήψεις, ο συντελεστής K (ρυθμός με τον οποίο το ψάρι πλησιάζει το ασυμπτωτικό μήκος) δείχνει να διαφοροποιείται στους 24 °C σε σχέση με τους 28

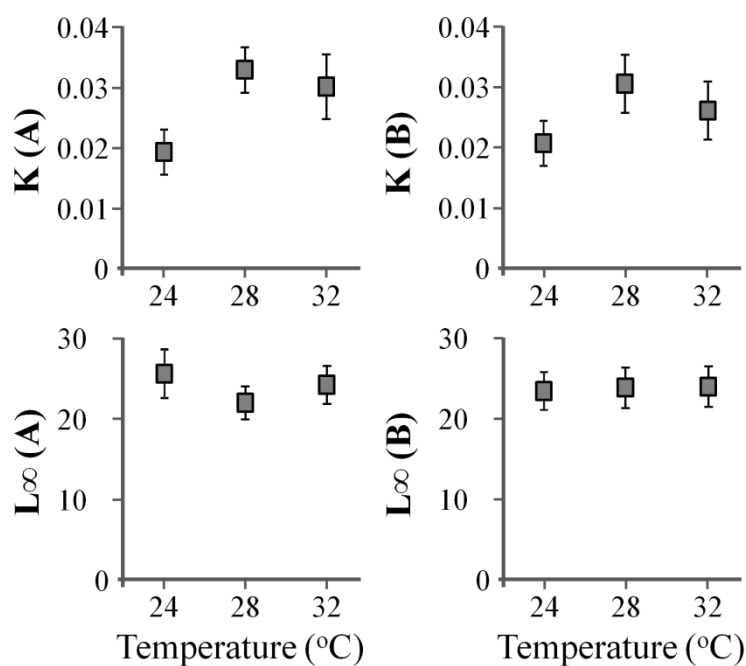
Αποτελέσματα

και 32 °C. Η μεταβολή του ασυμπτωτικού μήκους (L_{∞}) και του συντελεστή K αναπαρίστανται γραφικά στην Εικόνα 3.3.

Πίνακας 3.2: Παράμετροι της σχέσης $L_t = L_{\infty} [1 - e^{-K(t-t_0)}]$ για κάθε πειραματική συνθήκη και επανάληψη (A και B).

T_D	Επανάληψη	L_{∞}	K	SE L_{∞}	SE K	n
24	A	25,900	0,020	1,357	0,002	7
28	A	20,864	0,033	0,681	0,002	10
32	A	22,246	0,030	0,976	0,003	9
24	B	23,010	0,021	0,953	0,002	7
28	B	23,414	0,030	0,996	0,002	10
32	B	24,060	0,028	1,266	0,003	9

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (L_t) το μήκος του ψαριού στην ηλικία t , (L_{∞}) το ασυμπτωτικό μήκος του ψαριού, (K) ο ρυθμός με τον οποίο το ψάρι πλησιάζει το ασυμπτωτικό του μήκος, (t) η ηλικία, (n) ο αριθμός των δειγματοληψιών, (t_0) η υποθετική ηλικία (σε έτη) στην οποία το ψάρι έχει μηδενικό μήκος (για $t_0=0$).



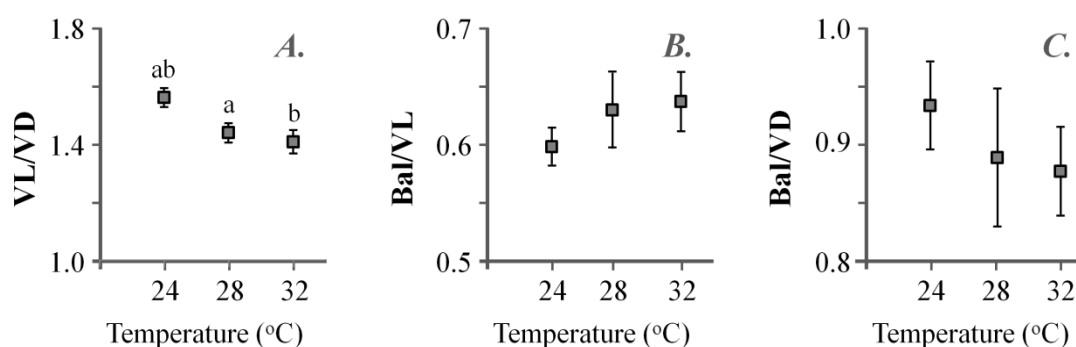
Εικόνα 3.3: Μεταβολή του συντελεστή von Bertalanffy (K) και του ασυμπτωτικού μήκους σώματος (L_{∞}) στις πειραματικές επαναλήψεις (A και B) των πληθυσμών των τριών θερμοκρασιακών συνθηκών (24°C, 28°C και 32°C). Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με $\pm 2SE$.

3.2. Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην πλαστικότητα της καρδιάς του zebrafish

Η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην καρδιά του zebrafish εξετάστηκε στο τέλος της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών για τα ιχθύδια και οχτώ μήνες μετά από ανάπτυξη σε κοινές συνθήκες για τα ενήλικα.

3.2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχήμα της καρδιάς του zebrafish

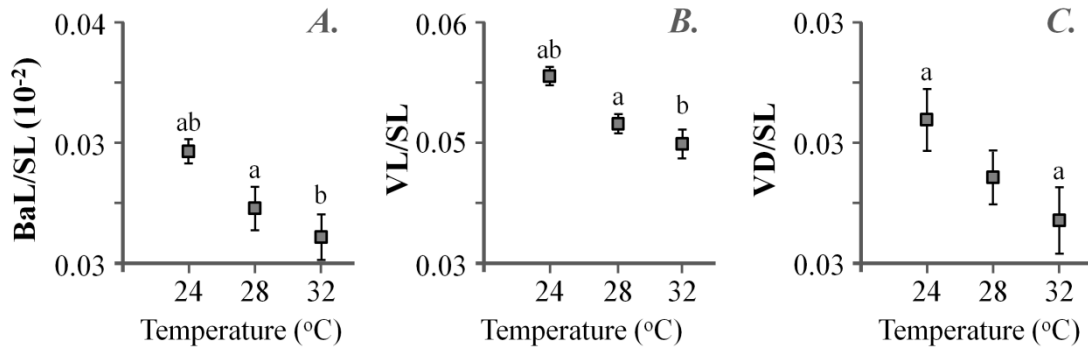
Στα ιχθύδια, η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στο λόγο του μήκους προς το ύψος της κοιλίας (VL/VD). Οι περαιτέρω κατά ζεύγη συγκρίσεις έδειξαν τα άτομα των 24 °C να επιδεικνύουν σημαντικά υψηλότερες τιμές ($1,56 \pm 0,03$, \pm SE) από τα άτομα που είχαν αρχικά αναπτυχθεί στους 28°C ($1,43 \pm 0,03$) αλλά και στους 32 °C ($1,40 \pm 0,04$) αντίστοιχα (Εικόνα 3.4A). Η θερμοκρασία δεν επέδρασε σημαντικά στο λόγο του μήκους του αρτηριακού βολβού προς το ύψος κοιλίας (BaL/VD) και στο λόγο του μήκους του αρτηριακού βολβού προς το μήκος κοιλίας (BaL/VL) (Εικόνα 3.4B,C).



Εικόνα 3.4: Μέσοι όροι των μορφομετρικών αναλογιών της καρδιάς στα ιχθύδια των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών. **A.** Λόγος του μήκους προς το ύψος κοιλίας), **B.** Λόγος του μήκους του αρτηριακού βολβού προς το μήκος κοιλίας, **C.** Λόγος του μήκους του αρτηριακού βολβού προς το ύψος κοιλίας. Όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ιχθυδίων διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0.05$, Mann Whitney U test). (BaL) μήκος αρτηριακού βολβού, (VD) ύψος κοιλίας, (VL) μήκος κοιλίας. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με ± 1 SE.

Στην Εικόνα 3.5, παρατίθεται η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης σε τρεις προς μελέτη διαστάσεις της καρδιάς, μετά από κανονικοποίηση τους ως προς το τυπικό μήκος σώματος (Standard Length, SL) των ιχθυδίων. Οι σχετικές διαστάσεις του μήκους του αρτηριακού βολβού (BaL) και του μήκους κοιλίας (VL), μειώνονται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis test), Οι κατά ζεύγη συγκρίσεις έδειξαν πως το σχετικό μήκος του αρτηριακού βολβού εμφανίζεται σημαντικά αυξημένο στους 24 °C ($0,029 \pm 0,001$, \pm SE) σε σχέση με τους 32 °C ($0,026 \pm 0,001$) και τους 28 °C ($0,027 \pm 0,001$), αντίστοιχα. Όμοια, ιχθύδια που αρχικά είχαν αναπτυχθεί σε χαμηλές θερμοκρασίες (24 °C) παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερο σχετικό μήκος κοιλίας ($0,049 \pm 0,001$) σε σχέση με τα ιχθύδια των 28°C ($0,043 \pm 0,001$) και των 32 °C ($0,040 \pm 0,001$), αντίστοιχα ($p < 0,05$, Mann-

Whitney U test). Το σχετικό ύψος κοιλίας (VD/SL) παρουσίασε και αυτό σημαντική μείωση από $0,031 \pm 0,001$ στους $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε $0,029 \pm 0,001$ στους $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test). Από τη μεταβολή των σχετικών διαστάσεων της καρδιάς γίνεται εμφανές πως στα ιχθύδια, η μείωση του λόγου VL/VD με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης οφείλεται στην ταυτόχρονη μείωση και του μήκους (VL) αλλά και του ύψους (VD) της κοιλίας

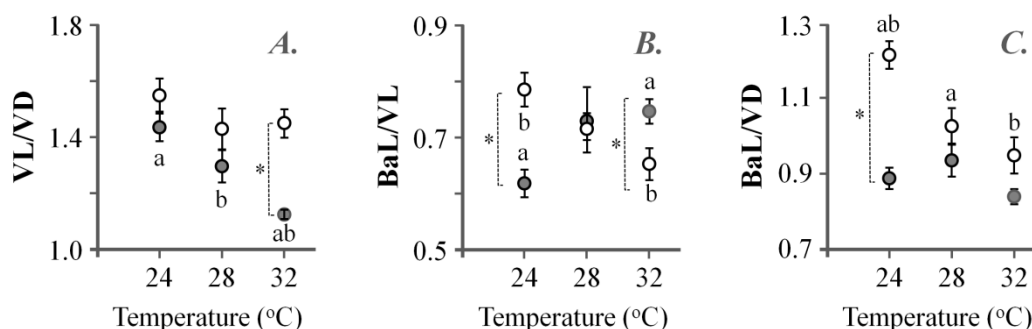


Εικόνα 3.5: Μέσοι όροι διαστάσεων της καρδιάς κανονικοποιημένες ως προς το τυπικό μήκος σώματος των ιχθυδίων **A.** Μήκος αρτηριακού βολβού κανονικοποιημένο ως προς το τυπικό μήκος σώματος, **B.** Μήκος κοιλίας κανονικοποιημένο ως προς το τυπικό μήκος σώματος, **C.** Ύψος κοιλίας κανονικοποιημένο ως προς το τυπικό μήκος σώματος, σε ιχθύδια των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών. Όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ιχθυδίων διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis test). (BaL) μήκος αρτηριακού βολβού, (VL) μήκος κοιλίας, (VD) ύψος κοιλίας, (SL) τυπικό μήκος σώματος. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με $\pm 1\text{SE}$.

Στα ενήλικα άτομα, η ανάλυση του σχήματος απέδειξε πως και η θερμοκρασία ανάπτυξης και το φύλο, επέδρασαν σημαντικά στο σχήμα της καρδιάς (Εικόνες 3.6 και 3.7). Όπως και στα ιχθύδια, ο λόγος VL/VD στα αρσενικά άτομα, έδειξε να μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης (από $1,43 \pm 0,05$ στους $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε $1,12 \pm 0,02$ στους $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p < 0,05$, Mann-Whitney U test) ενώ στα θηλυκά άτομα, ο λόγος VL/VD δε μεταβλήθηκε σημαντικά (Εικόνα 3.6A). Η μεταβολή του λόγου BaL/VL ακολούθησε διαφορετικό πρότυπο στα άτομα των δύο φύλων. Τα αρσενικά παρουσίασαν σημαντική αύξηση του λόγου με την αύξηση της θερμοκρασίας (από $0,62 \pm 0,025$ στους $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε $0,75 \pm 0,02$ στους $32\text{ }^{\circ}\text{C}$), ενώ τα θηλυκά, σημαντική μείωση του λόγου (από $0,79 \pm 0,03$ στους $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, σε $0,66 \pm 0,03$ στους $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p < 0,05$, Mann-Whitney U test, Εικόνα 3.6B). Η μελέτη μεταβολής του λόγου BaL/VD απέδειξε πως η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά μόνο στα θηλυκά άτομα, με το λόγο να μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας από $1,21 \pm 0,04$ στους $24\text{ }^{\circ}\text{C}$, σε $1,07 \pm 0,05$ στους $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ και σε $0,95 \pm 0,05$ στους $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Εικόνα 3.6C).

Στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων αναπαρίστανται στην Εικόνα 3.6 με αστερίσκους (*). Το φύλο επέδρασε σημαντικά στη διαφοροποίηση του λόγου VL/VD των αρσενικών και θηλυκών ατόμων που αναπτύχθηκαν στους $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($1,12 \pm 0,02$ έναντι του $1,44 \pm 0,05$ των θηλυκών ατόμων, $p < 0,05$, Mann-Whitney U test). Ο λόγος BaL/VL παρουσίασε επίσης σημαντική φυλετική διαφοροποίηση στους $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ (με τα αρσενικά να παρουσιάζουν $0,62 \pm 0,2$ και τα θηλυκά, $0,79 \pm 0,03$) και στους $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ αντίστοιχα ($0,75 \pm 0,02$ των αρσενικών έναντι

του $0,66 \pm 0,03$ των θηλυκών). Τέλος, το φύλο επέδρασε σημαντικά στον τρίτο υπό μελέτη λόγο BaL/VD , όπου στους $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ τα θηλυκά άτομα παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερες τιμές ($1,21 \pm 0,04$) από τα αρσενικά άτομα ($0,89 \pm 0,03$).

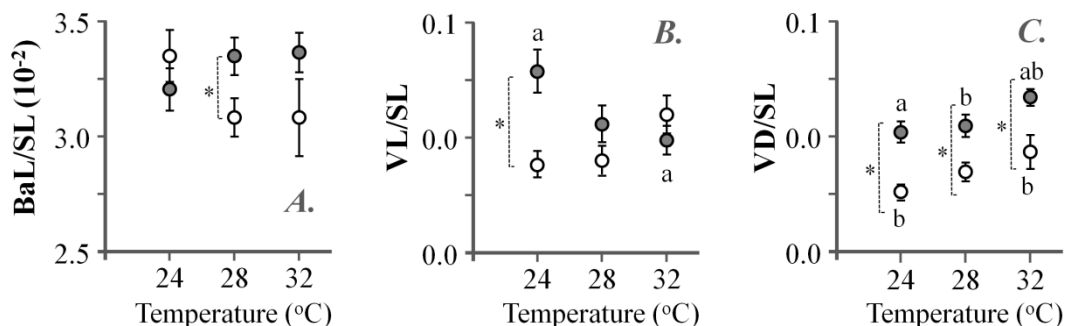


Εικόνα 3.6: Μέσοι όροι των μορφομετρικών αναλογιών της καρδιάς στα ενήλικα άτομα των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών. **A.** Λόγος του μήκους προς το ύψος κοιλίας, **B.** Λόγος του μήκους του αρτηριακού βολβού προς το μήκος κοιλίας, **C.** Λόγος του μήκους του αρτηριακού βολβού προς το ύψος κοιλίας. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αρσενικών (γεμάτοι κύκλοι) και θηλυκών ατόμων (άδειοι κύκλοι) της ίδιας συνθήκης ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). Όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). (BaL) μήκος αρτηριακού βολβού, (VD) ύψος κοιλίας, (VL) μήκος κοιλίας. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με $\pm 1SE$.

Στην Εικόνα 3.7 παρουσιάζεται η επίδραση της θερμοκρασίας και του φύλου, στις σχετικές αποστάσεις τριών διαστάσεων της καρδιάς των ενήλικων zebrafish. Το σχετικό μήκος του αρτηριακού βολβού (BaL/SL) δε μεταβλήθηκε σημαντικά σε κανένα από τα δύο φύλα στις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες (Εικόνα 3.7A). Το σχετικό μήκος της κοιλίας (VL/SL) μειώθηκε σημαντικά στα αρσενικά άτομα με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης (από $0,05 \pm 0,01$ στους $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε $0,04 \pm 0,01$ στους $32\text{ }^{\circ}\text{C}$, $p < 0.05$, Mann-Whitney U test) ενώ δε μεταβλήθηκε σημαντικά στα θηλυκά άτομα (Εικόνα 3.7B). Το σχετικό ύψος κοιλίας (VD/SL) αυξήθηκε σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης και στα δύο φύλα (από $0,03 \pm 0,01$ στους $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ στα αρσενικά, σε $0,04 \pm 0,01$ στους $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ και από $0,03 \pm 0,01$ στους $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ στα θηλυκά, σε $0,04 \pm 0,01$ στους $32\text{ }^{\circ}\text{C}$). Το φύλο επέδρασε σημαντικά σε όλες τις υπό μελέτη σχετικές διαστάσεις. Το σχετικό μήκος αρτηριακού βολβού διαφοροποιήθηκε σημαντικά στα δύο φύλα στους $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ όπου τα αρσενικά παρουσίασαν υψηλότερες τιμές από τα θηλυκά ($0,03 \pm 0,01$ στα αρσενικά και $0,03 \pm 0,01$ στα θηλυκά άτομα). Το σχετικό μήκος κοιλίας των αρσενικών ατόμων της συνθήκης των $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ ήταν μεγαλύτερο των θηλυκών της ίδιας θερμοκρασιακής συνθήκης ($0,05 \pm 0,01$ στα αρσενικά και $0,042 \pm 0,01$ στα θηλυκά άτομα). Ως προς το σχετικό ύψος της κοιλίας, τα αρσενικά άτομα εμφάνισαν υψηλότερες τιμές από τα θηλυκά σε όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test).

Από τη μελέτη της μεταβολής των σχετικών διαστάσεων της καρδιάς, προκύπτει πως οι διαφορές του λόγου VL/VD των αρσενικών ατόμων με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης οφείλονται στη μεταβολή και των δύο επιμέρους διαστάσεων της κοιλίας (μείωση του μήκους, VL και αύξηση ύψους, VD με την

αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης). Αντίθετα, η μεταβολή των λόγων BaL/VL και BaL/VD στα αρσενικά και θηλυκά άτομα οφείλεται αποκλειστικά στη μεταβολή της μιας από τις δύο διαστάσεις της κοιλίας (VD ή VL) και όχι στη μεταβολή του μήκους του αρτηριακού βολβού (BaL).



Εικόνα 3.7: Μέσοι όροι διαστάσεων της καρδιάς κανονικοποιημένες ως προς το τυπικό μήκος σώματος των ενήλικων ατόμων **A**. Μήκος αρτηριακού βολβού κανονικοποιημένο ως προς το τυπικό μήκος σώματος, **B**. Μήκος κοιλίας κανονικοποιημένο ως προς το τυπικό μήκος σώματος, **C**. Ύψος κοιλίας κανονικοποιημένο ως προς το τυπικό μήκος σώματος, σε ιχθυδία των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών. Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αρσενικών (γεμάτοι κύκλοι) και θηλυκών ατόμων (άδειοι κύκλοι) της ίδιας συνθήκης ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). Όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών ατόμων των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). (BaL) μήκος αρτηριακού βολβού, (VL) μήκος κοιλίας, (VD) ύψος κοιλίας, (SL) τυπικό μήκος σώματος. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με ± 1 SE.

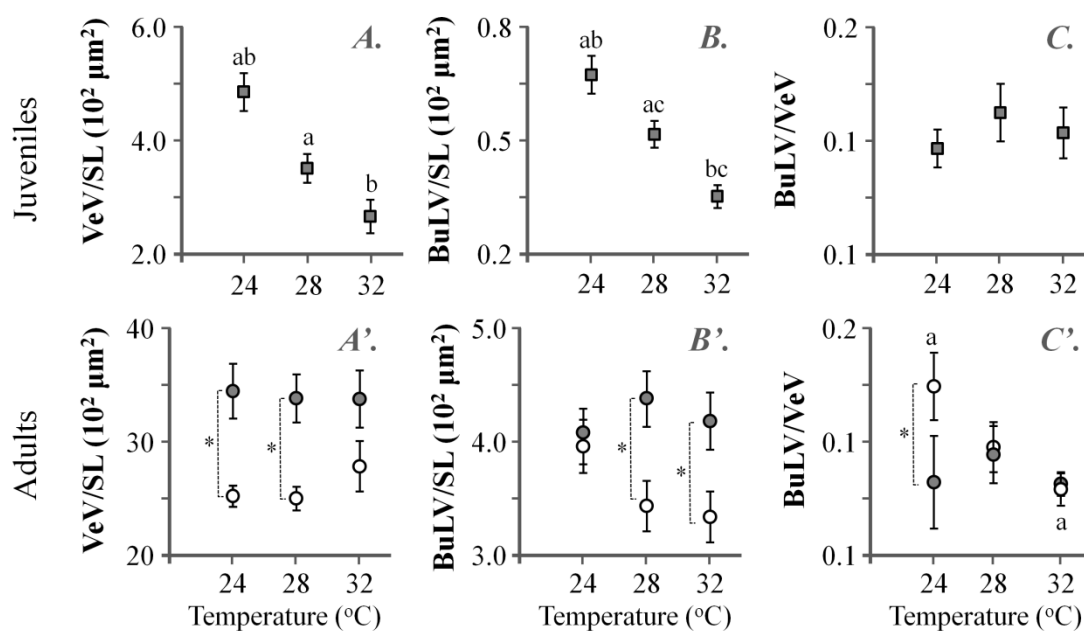
3.2.2 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στον όγκο της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού

Η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στον όγκο της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού (κανονικοποιημένα ως προς το τυπικό μήκος σώματος, SL) των ιχθυδίων προκαλώντας μείωση όγκου των δύο χώρων κατά 45-46%. Πιο συγκεκριμένα, ο σχετικός όγκος της κοιλίας (VeV/SL) μειώθηκε σημαντικά από $4,83 \pm 0,33 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στους 24°C , σε $3,49 \pm 0,25 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στους 28°C , και σε $2,65 \pm 0,30 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στους 32°C ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test, Εικόνα 48A). Ο σχετικός όγκος του αρτηριακού βολβού (BaL/SL) μειώθηκε σημαντικά από $0,67 \pm 0,043 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στους 24°C , σε $0,36 \pm 0,017 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στους 32°C (Εικόνα 3.8B). Ο λόγος του όγκου του αρτηριακού βολβού ως προς τον όγκο κοιλίας (BuLV/VeV) δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τη θερμοκρασία ανάπτυξης (Εικόνα 3.8C)

Η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στο λόγο του όγκου του αρτηριακού βολβού ως προς τον όγκο κοιλίας (BuLV/VeV) στα θηλυκά άτομα (από $0,16 \pm 0,01$ στους 24°C , σε $0,12 \pm 0,01$ στους 32°C). Στα αρσενικά άτομα δεν παρατηρήθηκε σημαντική αλλαγή του λόγου (εικόνα 3.8C'). Ως προς τους υπόλοιπους ογκομετρικούς δείκτες (VeV/SL και BuLV/SL), η θερμοκρασία ανάπτυξης δεν προκάλεσε σημαντικές μεταβολές. Το φύλο αποδείχτηκε καθοριστικός παράγοντας επίδρασης σε όλους τους ογκομετρικούς δείκτες. Ο σχετικός όγκος της κοιλίας (VeV/SL) των αρσενικών ατόμων ήταν σημαντικά υψηλότερος από των

Αποτελέσματα

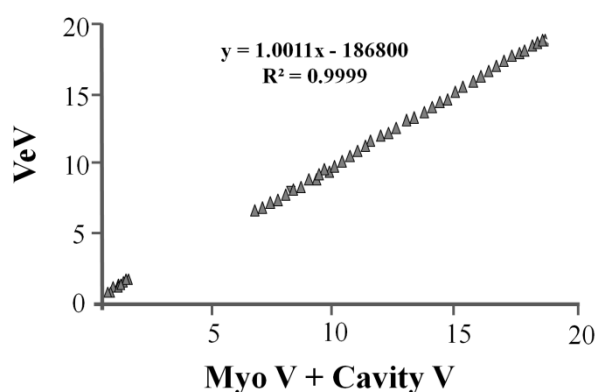
θηλυκών ατόμων για τις συνθήκες των 24 °C ($34,5 \pm 2,3 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στα αρσενικά και $25,2 \pm 0,9 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στα θηλυκά άτομα) και των 28°C ($33,8 \pm 2,1 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στα αρσενικά και $25,0 \pm 1,0 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στα θηλυκά άτομα). Τα αρσενικά άτομα παρουσίασαν υψηλότερες τιμές σε σχέση με τα θηλυκά άτομα ως προς το σχετικό όγκο του αρτηριακού βολβού (BuLV/SL) για τις συνθήκες των 28 °C ($4,43 \pm 0,29 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στα αρσενικά και $3,41 \pm 0,22 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στα θηλυκά άτομα) και των 32°C ($4,17 \pm 0,30 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στα αρσενικά και $3,38 \pm 0,24 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στα θηλυκά άτομα). Ως προς το λόγο του όγκου του αρτηριακού βολβού προς τον όγκο κοιλίας (BuL/VenVol), τα θηλυκά της συνθήκης των 24 °C παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερες τιμές από τα αρσενικά άτομα ($0,16 \pm 0,01$ έναντι της τιμής $0,12 \pm 0,016$ των αρσενικών).



Εικόνα 3.8: Μέσοι όροι των μορφομετρικών δεικτών του όγκου της καρδιάς σε ιχθυΐδια (**A, B, C**) και ενήλικα (**A', B', C'**) άτομα. (**A, A'**). Όγκος κοιλίας κανονικοποιημένος ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (**B, B'**). Όγκος αρτηριακού βολβού κανονικοποιημένος ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (**C, C'**). Λόγος του όγκου του αρτηριακού βολβού προς τον όγκο της κοιλίας. Τα όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ιχθυιδίων (τετράγωνα), των αρσενικών (γεμάτοι κύκλοι) και των θηλυκών ατόμων (άδειοι κύκλοι) των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ίδιας συνθήκης ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). (VeV) όγκος κοιλίας, (BuL) όγκος αρτηριακού βολβού, (SL) τυπικό μήκος σώματος BuL/VeV. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με $\pm 1SE$.

3.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχετικό όγκο του μυοκαρδίου κοιλίας

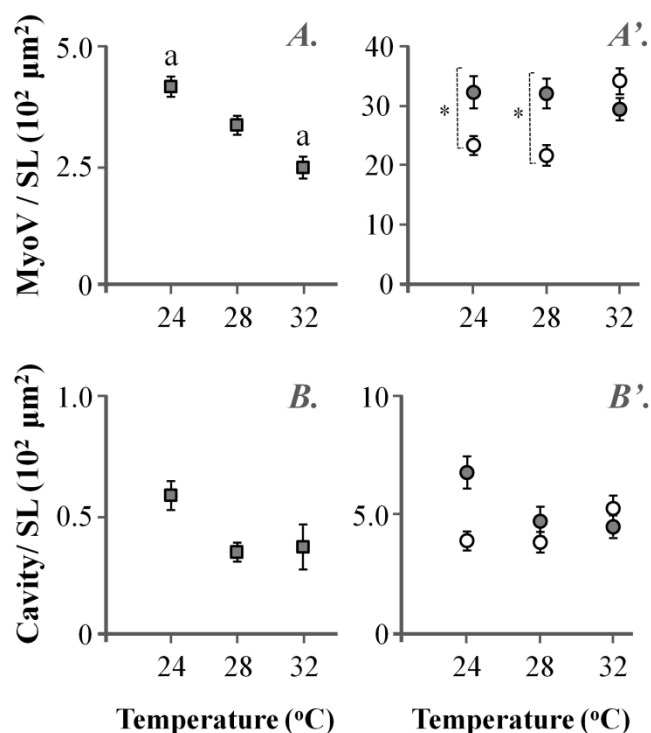
Το διάγραμμα της Εικόνας 3.9 αποδεικνύει την ανάλογη σχέση ($y = 1.0011x - 186800$, $R^2=0,9999$) που υπάρχει ανάμεσα στις τιμές του όγκου κοιλίας (VeV) και του αθροίσματος του όγκου του μυοκαρδίου κοιλίας και του όγκου της κοιλότητας (Myo V + Cavity V). Στην Εικόνα 3.9 επιβεβαιώνεται η υπόθεση πως ανεξάρτητα του φύλου, του οντογενετικού σταδίου και της θερμοκρασίας, οι μετρήσεις υπολογισμού του όγκου της καρδιάς είναι επαναλήψιμες και ακριβείς.



Εικόνα 3.9: Η ανάλογη σχέση ανάμεσα στις τιμές του όγκου κοιλίας και τις τιμές του αθροίσματος του όγκου του μυοκαρδίου κοιλίας και του όγκου της κοιλότητας. (VeV) όγκος κοιλίας, (Myo V) όγκος μυοκαρδίου, (Cavity V) όγκος κοιλότητας. Οι τιμές είναι εκφρασμένες σε ογκοστοιχεία (10^8 voxels).

Η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχετικό όγκο μυοκαρδίου κοιλίας (Myo V/SL) και στο σχετικό όγκο κοιλότητας (Cavity V/SL) σε ιχθύδια και ενήλικα άτομα αναπαρίσταται στην Εικόνα 3.10. Στα ιχθύδια, η θερμοκρασία επέδρασε σημαντικά στο σχετικό όγκο μυοκαρδίου κοιλίας, όπου με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης μειώθηκε ο σχετικός όγκος του μυοκαρδίου σε ποσοστό $\sim 50\%$ (από $4,2 \pm 0,3 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στους 24°C , σε $2,2 \pm 0,1 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ στους 28°C). Ο σχετικός όγκος της κοιλότητας παρέμεινε αμετάβλητος στις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες (Εικόνα 3.10 A, B).

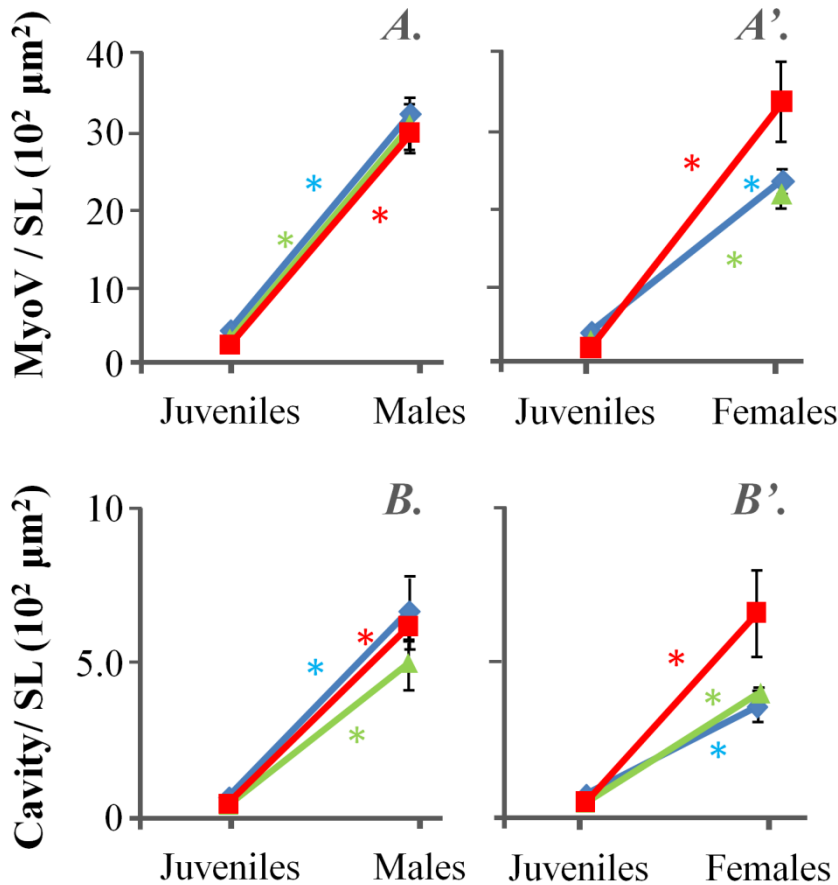
Στα ενήλικα, η θερμοκρασία ανάπτυξης δεν επέδρασε σημαντικά στους δύο προς εξέταση σχετικούς όγκους, σε κανένα από τα δύο φύλα (Εικόνα 3.10 A', B'). Το φύλο απέδρασε σημαντικά στο σχετικό όγκο του μυοκαρδίου κοιλίας, με την κοιλία των αρσενικών να αποτελείται από σημαντικά περισσότερη ποσότητα μυοκαρδίου έναντι των θηλυκών ατόμων για τις συνθήκες των 24°C ($32,5 \pm 2,0 \cdot 10^2 \mu\text{m}^2$ των αρσενικών έναντι της τιμής του $22,7 \pm 1,5$ των θηλυκών ατόμων) και των 28°C ($31,0 \pm 2,9$ στα αρσενικά και $21,1 \pm 1,7$ στα θηλυκά άτομα) (Εικόνα 3.10 A').



Εικόνα 3.10: Μέσοι όροι των τιμών του σχετικού όγκου μυοκαρδίου κοιλίας και του σχετικού όγκου κοιλότητας στα (A, B) ιχθυΐδια, και (A', B') στα ενήλικα άτομα. Τα όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ιχθυιδίων (τετράγωνα), των αρσενικών (γεμάτοι κύκλοι) και των θηλυκών ατόμων (άδειοι κύκλοι) των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ίδιας συνθήκης ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). (Cavity V) όγκος κοιλότητας, (Myo V) όγκος μυοκαρδίου κοιλίας, (SL) τυπικό μήκος σώματος. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με $\pm 1SE$.

Από τα αποτελέσματα αυτά προκύπτει πως η μεταβολή του σχετικού όγκου των ιχθυιδίων (§ 3.2.2) με την αύξηση της θερμοκρασίας οφείλεται στη μείωση του σχετικού όγκου του μυοκαρδίου. Η μη μεταβολή του σχετικού όγκου της κοιλότητας, σε ιχθυΐδια και ενήλικα υποδεικνύει την ακρίβεια της μεθόδου που ακολουθήθηκε ως προς το βαθμό διαστολής των καρδιών που εξετάστηκαν.

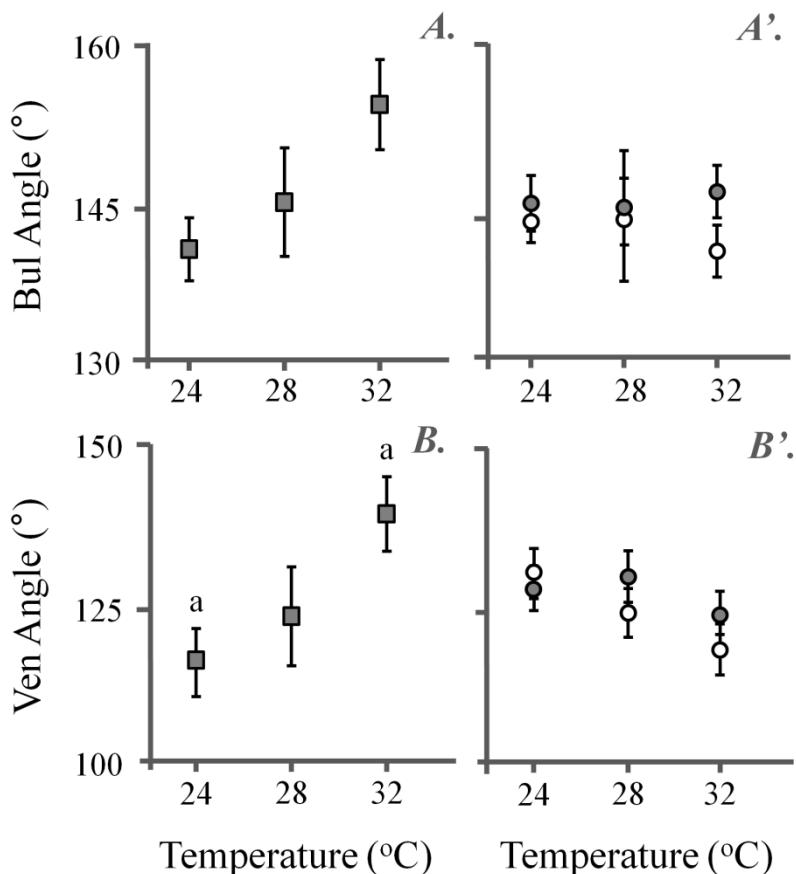
Στην Εικόνα 3.11 αναπαρίσταται το πρότυπο μεταβολής των δύο υπό εξέταση χαρακτήρων (του σχετικού όγκου του μυοκαρδίου κοιλίας και της κοιλότητας της κοιλίας) στα αρσενικά (Εικόνα 3.10A, B) και στα θηλυκά (Εικόνα 3.10A', B') άτομα. Το στάδιο επέδρασε σημαντικά και στους δύο υπό εξέταση χαρακτήρες σε όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες. Από τα διαγράμματα προκύπτει πως το πρότυπο ανάπτυξης του σχετικού όγκου μυοκαρδίου κοιλίας και κοιλότητας των αρσενικών ατόμων έχει το ίδιο ανοδικό πρότυπο σε όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες (Εικόνα 3.11A, B). Στα θηλυκά άτομα, το πρότυπο ανάπτυξης είναι πάλι ανοδικό με παρόμοια απόκριση για όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες με τη διαφορά ότι σε σχέση με τα αρσενικά άτομα, τα θηλυκά των 24 και 28 °C είχαν σημαντικά χαμηλότερες τιμές.



Εικόνα 3.11: Πρότυπο μεταβολής του σχετικού όγκου μυοκαρδίου κοιλίας και του σχετικού όγκου κοιλότητας κατά την ανάπτυξη του zebrafish ανάλογα με το φύλο και τη θερμοκρασία. **(A)** Πρότυπο μεταβολής του σχετικού όγκου μυοκαρδίου κοιλίας σε αρσενικά και **(A')** σε θηλυκά άτομα των τριών θερμοκρασιών ανάπτυξης. **(B)** Πρότυπο μεταβολής του σχετικού όγκου κοιλότητας στα αρσενικά και **(B')** στα θηλυκά άτομα των τριών θερμοκρασιών ανάπτυξης. Οι συνεχείς γραμμές με αστερίσκους υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ιχθυδίων και των ενηλίκων της ίδιας θερμοκρασιακής συνθήκης ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). (μπλε) 24°C, (πράσινο) 28°C, (κόκκινο) 32°C, (Bul Angle) γωνία αρτηριακού βολβού, (Ven Angle) γωνία κοιλίας, (juveniles) ιχθύδια, (males) αρσενικά, (females) θηλυκά. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με ± 1 SE.

3.2.4 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη μεταβολή της γωνίας του αρτηριακού βολβού και στη γωνία της κοιλίας

Ιχθύδια που αρχικά αναπτύχθηκαν στους 24 °C παρουσίασαν μικρότερη γωνία αρτηριακού βολβού (Bul Angle) (με βαθμό σημαντικότητας $p=0,075$, Kruskal-Wallis test) συγκριτικά με τα ιχθύδια των 32°C. Ως προς τη γωνία κοιλίας, ιχθύδια που μεγάλωσαν στους 24 °C είχαν σημαντικά μικρότερη γωνία σε σχέση με τους 32 °C (μείωση από τις 137° στις 120°). Στα ενήλικα, η θερμοκρασία και το φύλο δεν αποδείχθηκαν σημαντικοί παράγοντες επίδρασης στις υπό μελέτη γωνίες ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test), αν και ο βαθμός σημαντικότητας της διαφυλετικής διαφοράς των ατόμων που μεγάλωσαν στους 32 °C για τη γωνία του αρτηριακού βολβού (Bul Angle, Εικόνα 3.12A') ήταν στο όριο του στατιστικού τεστ ($p=0.054$, Mann-Whitney U test).



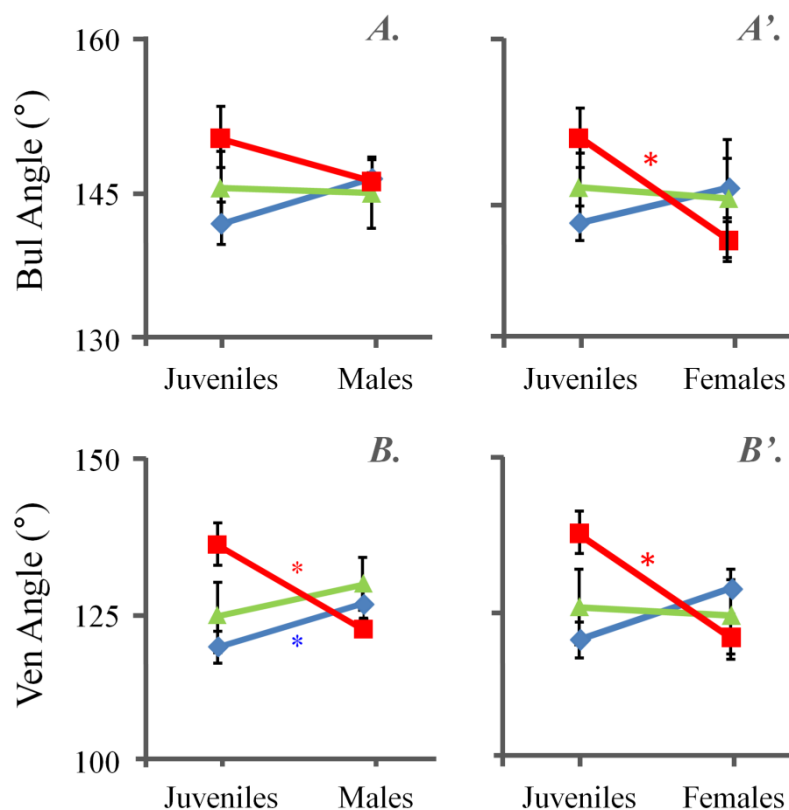
Εικόνα 3.12: Μέσες τιμές της γωνίας του αρτηριακού βολβού και της γωνίας κοιλίας σε ιχθύδια (**A, B**) και ενήλικα (**A', B'**) άτομα. Τα όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ιχθυδίων (τετράγωνα), των αρσενικών (γεμάτοι κύκλοι) και των θηλυκών ατόμων (άδειοι κύκλοι) των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). (Bul Angle) γωνία αρτηριακού βολβού, (Ven Angle) γωνία κοιλίας. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με $\pm 1SE$.

Στην Εικόνα 3.13 αναπαρίσταται το πρότυπο μεταβολής των δύο υπό εξέταση χαρακτήρων (γωνίας αρτηριακού βολβού και γωνίας κοιλίας στα αρσενικά (Εικόνα 3.13A,B) και στα θηλυκά άτομα (Εικόνα 3.13A',B')). Ως προς τη γωνία του αρτηριακού βολβού στα αρσενικά άτομα φαίνεται πως η αρχική ποικιλομορφία των ιχθυδίων εξαλείφεται με τις τιμές στα αρσενικά να παρουσιάζουν πλατό και να είναι σταθερές ~ στις 145° . Στα θηλυκά άτομα, το πρότυπο αυτό επαναλαμβάνεται για τους 24 και τους 28 $^\circ C$, ενώ στους 32 $^\circ C$ το πρότυπο μεταβολής της γωνίας αρτηριακού βολβού διαφοροποιείται από τις υπόλοιπες θερμοκρασίες με την σημαντική μείωση της από τις $150,4^\circ$ στις 140° ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test).

Στα αρσενικά των 24 $^\circ C$ η γωνία κοιλίας αυξήθηκε σημαντικά λόγω οντογενετικού σταδίου (από 120° στα ιχθύδια, σε 127° στα αρσενικά άτομα). Στους 28 $^\circ C$ η γωνία κοιλίας παρέμεινε αμετάβλητη, ενώ στους 32 $^\circ C$ το πρότυπο ήταν αντίθετο από τους 24 $^\circ C$, με τη γωνία κοιλίας να μειώνεται σημαντικά από τα ιχθύδια στα αρσενικά (από 137° στα ιχθύδια, σε 123° στα αρσενικά). Τα θηλυκά άτομα είχαν παρόμοιο πρότυπο μεταβολής της γωνίας κοιλίας σε σχέση με τα αρσενικά για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης. Στους 24 και 28 $^\circ C$ η γωνία κοιλίας παρέμεινε σταθερή από τα ιχθύδια στα θηλυκά ενώ στους 32 $^\circ C$, η γωνία κοιλίας μειώθηκε σημαντικά (από 137° στα

Αποτελέσματα

ιχθύδια σε 120° στα θηλυκά). Τα αποτελέσματα της επίδρασης του οντογενετικού σταδίου στις δύο υπό μελέτη γωνίες (Bul Angle και Ven Angle) παρατίθενται και στον Πίνακα 3.3.



Εικόνα 3.13: Πρότυπο μεταβολής της γωνίας του αρτηριακού βολβού και της γωνίας κοιλίας κατά την ανάπτυξη του zebrafish, ανάλογα με το φύλο και τη θερμοκρασία. **(A)** Πρότυπο μεταβολής της γωνίας αρτηριακού βολβού σε αρσενικά και **(A')** σε θηλυκά άτομα των τριών θερμοκρασιών ανάπτυξης. **(B)** Πρότυπο μεταβολής της γωνίας κοιλίας σε αρσενικά και **(B')** θηλυκά άτομα των τριών θερμοκρασιών ανάπτυξης. Οι συνεχείς γραμμές με αστερίσκους υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ιχθυδίων και των ενηλίκων της ίδιας θερμοκρασιακής συνθήκης ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). **(κόκκινο)** συνθήκη των 32°C, **(πράσινο)** συνθήκη των 28°C, **(μπλε)** συνθήκη των 32°C. (Bul Angle) γωνία αρτηριακού βολβού, (Ven Angle) γωνία κοιλίας, (juveniles) ιχθύδια, (males) αρσενικά, (females) θηλυκά. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με ± 1 SE.

Πίνακας 3.3: Επίδραση οντογενετικού σταδίου στη γωνία αρτηριακού βολβού και στη γωνία κοιλίας της καρδιάς του zebrafish.

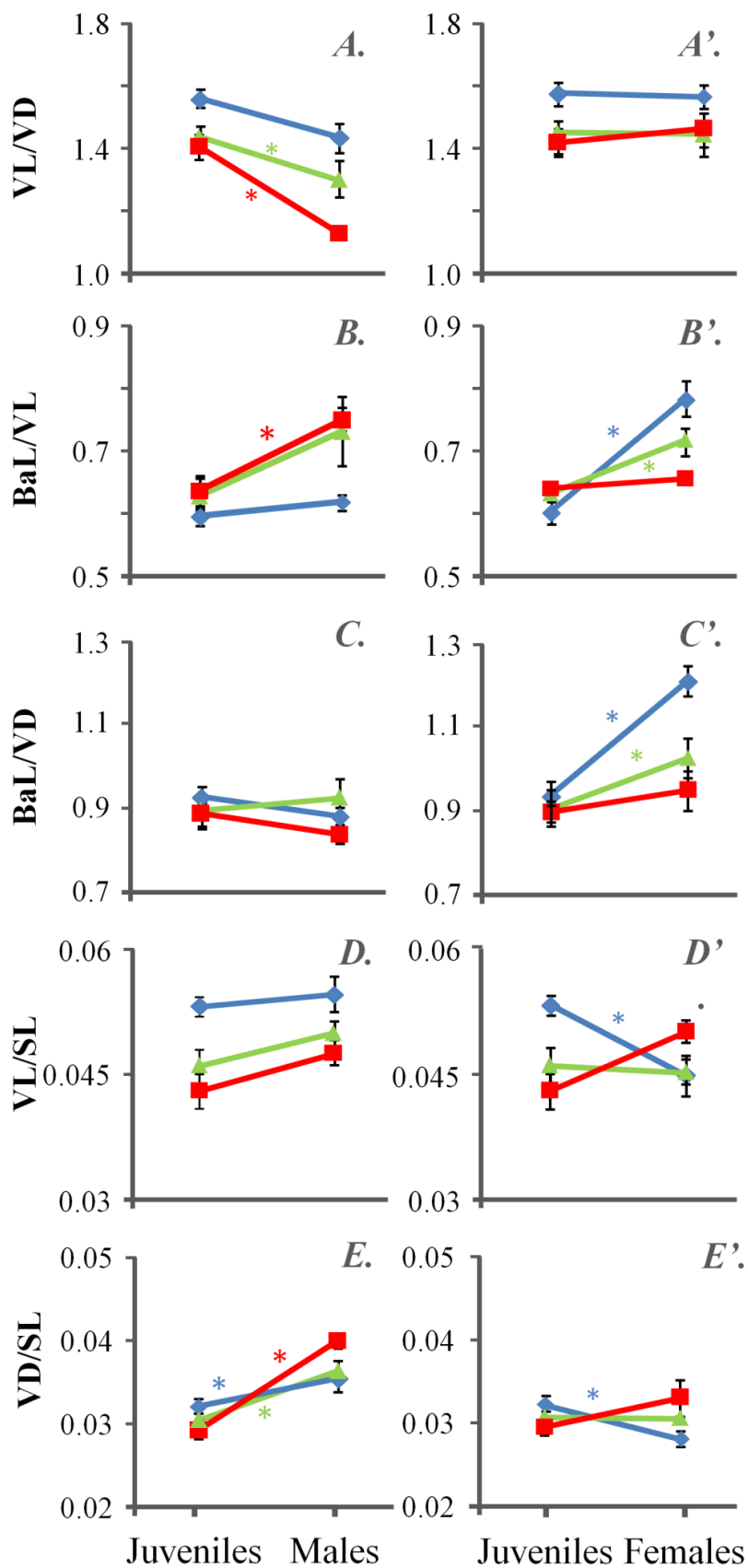
T_D (°C)	Juveniles	Males	Females	p J-m	p J-f
Bul Angle					
24	141,8 \pm 1,9 (15)	146,3 \pm 2,2 (8)	145,4 \pm 3,1 (9)	0,150	0,263
28	145,34 \pm 3,8 (10)	144,8 \pm 2,6 (9)	144,2 \pm 5,9 (7)	0,719	1,000
32	150,4 \pm 3,1(10) †	146,0 \pm 2,0 (9)	139,9 \pm 2,0 (8) †	0,315	0,020
Ven Angle					
24	120 \pm 3,0 (15) *	127,46 \pm 2,4 (8) *	128,6 \pm 4,0 (9)	0,047	0,095
28	125,4 \pm 6,6 (10)	131,0 \pm 4,8 (9)	124,9 \pm 6,5 (7)	0,497	0,887
32	137,85 \pm 3.9 (10) *†	122,3 \pm 1,8 (9) *	120,2 \pm 3,4 (8) †	0,005	0,011

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (Bul Angle) γωνία αρτηριακού βολβού, (Ven Angle) γωνία κοιλίας. Οι τιμές είναι M.O. \pm SE (N). Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ιχθυδίων και αρσενικών ατόμων της ίδιας πειραματικής συνθήκης (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$). Οι σταυροί (†) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ιχθυδίων και θηλυκών ατόμων της ίδιας πειραματικής συνθήκης (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$).

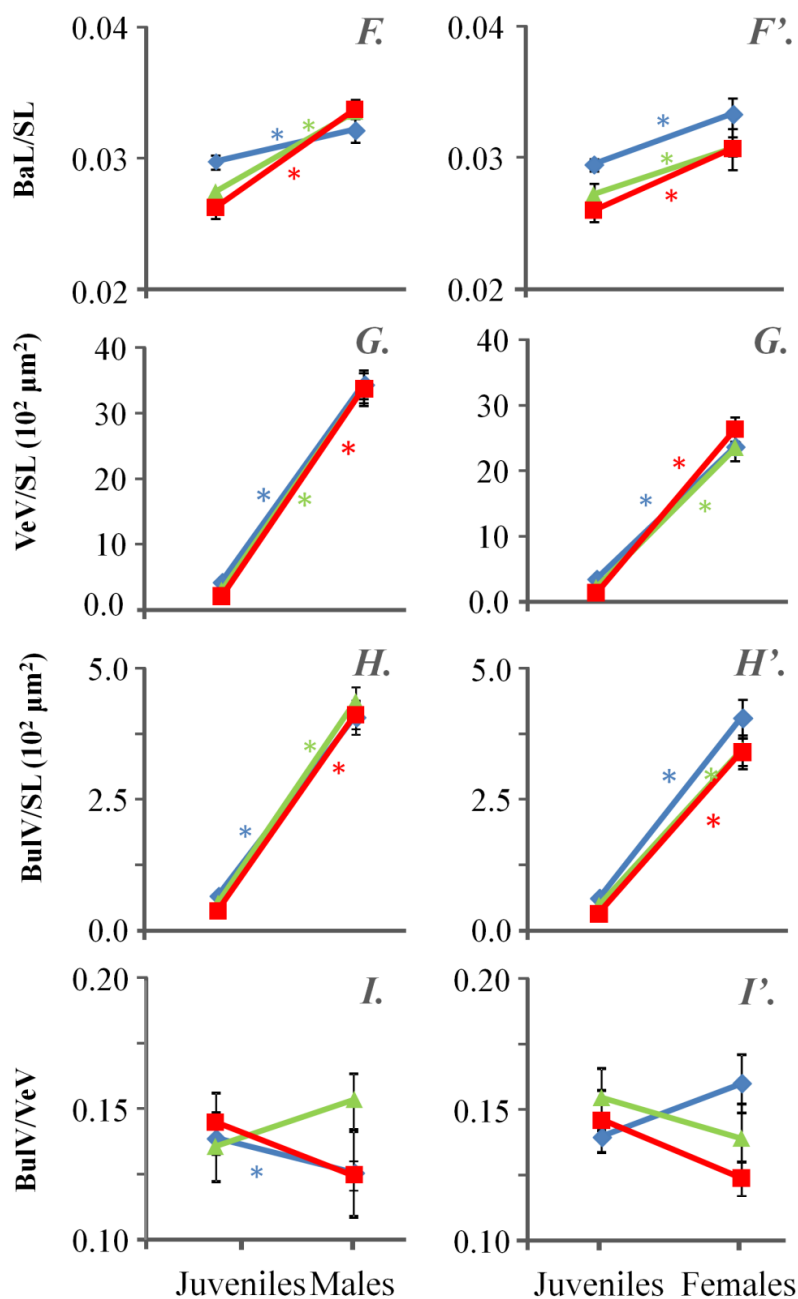
3.2.5 Πρότυπα ανάπτυξης των μορφομετρικών δεικτών της καρδιάς και σχέσεις αλλομετρίας μεταξύ τους

3.2.5.1 Διαφοροποίηση του προτύπου ανάπτυξης των μορφομετρικών δεικτών ανάλογα με τη θερμοκρασία και το φύλο

Τα πρότυπα μεταβολής των μορφομετρικών δεικτών της καρδιάς του zebrafish ανάλογα με τη θερμοκρασία ανάπτυξης και το φύλο, απεικονίζονται στην Εικόνα 3.13. Το πρότυπο μεταβολής του λόγου του μήκους προς το ύψος κοιλίας (VL/VD) έδειξε να διαφοροποιείται σημαντικά μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων. Τα αρσενικά των 24 °C δεν παρουσίασαν σημαντική μεταβολή ως προς τα ιχθύδια, ενώ τα αρσενικά των 28 και 32 °C παρουσίασαν σημαντικά μικρότερες τιμές (πιο στρογγυλή κοιλία) σε σχέση με τα ιχθύδια των αντίστοιχων θερμοκρασιακών συνθηκών ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). Αντίθετα, στα θηλυκά άτομα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή στον υπό εξέταση δείκτη σε σχέση με τα ιχθύδια (Εικόνα 3.14A, A'). Ο λόγος του μήκους του αρτηριακού βολβού προς το μήκος κοιλίας (BaL/VL) αυξήθηκε σημαντικά μόνο στα αρσενικά των 32 °C, ενώ στα θηλυκά άτομα αυξήθηκε σημαντικά στις συνθήκες των 24 και 28 °C (Εικόνα 3.14B, B'). Ο λόγος του μήκους του αρτηριακού βολβού προς το ύψος κοιλίας (BaL/VD) δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή στα αρσενικά άτομα σε σχέση με τα ιχθύδια σε καμία από τις θερμοκρασίες ανάπτυξης. Αντίθετα στα θηλυκά άτομα, ο λόγος αυξήθηκε σημαντικά στους 24 και 28 °C σε σχέση με τα ιχθύδια των αντίστοιχων θερμοκρασιών (Εικόνα 3.14C, C'). Το σχετικό μήκος κοιλίας (VL/SL) δεν παρουσίασε σημαντική μεταβολή στα αρσενικά, ενώ στα θηλυκά άτομα των 24°C, μειώθηκε σε σχέση με τα ιχθύδια της αντίστοιχης θερμοκρασίας ανάπτυξης (Εικόνα 3.14D, D'). Το σχετικό ύψος κοιλίας (VD/SL) αυξήθηκε σημαντικά σε όλες τις θερμοκρασίες στα αρσενικά σε σχέση με τα ιχθύδια, ενώ στα θηλυκά αυξήθηκε μόνο στη συνθήκη των 32 °C (Εικόνα 3.14E, E'). Το σχετικό μήκος αρτηριακού βολβού αυξήθηκε σημαντικά στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα σε όλες τις υπό εξέταση συνθήκες (Εικόνα 3.14, F, F'). Οι σχετικοί όγκοι κοιλίας και αρτηριακού βολβού αυξήθηκαν και αυτοί σημαντικά στα αρσενικά και στα θηλυκά άτομα σε όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες (Εικόνα 3.14G, G', H, H'). Ο λόγος του όγκου του αρτηριακού βολβού προς τον όγκο κοιλίας μειώθηκε σε σχέση με τα ιχθύδια για τα αρσενικά των 28 °C, ενώ στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή του λόγου. Οι τιμές των μέσων για τους υπό εξέταση μορφομετρικούς δείκτες για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης και στάδιο παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.3.



Εικόνα 3.14: Διαφοροποίηση του προτύπου ανάπτυξης των μορφομετρικών δεικτών της καρδιάς του zebrafish, ανάλογα με τη θερμοκρασία και το φύλο σε αρσενικά (A, B, C, D, E, F, G, H, I) και σε θηλυκά (A', B', C', D', E', F', G', I') άτομα (συνέχεια δίπλα).



Εικόνα 3.14: Διαφοροποίηση του προτύπου ανάπτυξης των μορφομετρικών δεικτών της καρδιάς του zebrafish, ανάλογα με τη θερμοκρασία και το φύλο σε αρσενικά (A, B, C, D, E, F, G, H, I) και σε θηλυκά (A', B', C', D', E', F', G', I') άτομα. Οι συνεχείς γραμμές με αστερίσκους υποδεικνύουν τις στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ιχθυιδίων και των ενηλίκων της ίδιας θερμοκρασιακής συνθήκης ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). (κόκκινο) συνθήκη των 32°C, (πράσινο) συνθήκη των 28°C, (μπλε) συνθήκη των 32°C. (VL/VD) μήκος προς ύψος κοιλίας, (BaL/VL) μήκος αρτηριακού βολβού προς ύψος κοιλίας, (VL/SL) μήκος κοιλίας ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (VD/SL) ύψος κοιλίας ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (VL/VD) μήκος προς ύψος κοιλίας, (BaL/VL) μήκος αρτηριακού βολβού προς μήκος κοιλίας, (BaL/VD) μήκος αρτηριακού βολβού προς ύψος κοιλίας, (VL/SL) μήκος κοιλίας ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (VD/SL) ύψος κοιλίας ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (BaL/SL) μήκος αρτηριακού βολβού ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (VeV/SL) σχετικός όγκος κοιλίας, (BuIV/SL) σχετικός όγκος αρτηριακού βολβού, (BuIV/VeV) λόγος του όγκου του αρτηριακού βολβού προς τον όγκο κοιλίας, (juveniles) ιχθύδια, (males) αρσενικά, (females) θηλυκά. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με $\pm 1SE$.

Αποτελέσματα

Πίνακας 3.4: Επίδραση οντογενετικού σταδίου στους υπό εξέταση μορφομετρικούς δείκτες της καρδιάς ιχθυδίων και ενήλικων zebrafish.

T _D (°C)	Juveniles	Males	Females	p J-m	p J-f
VL/VD					
24	1.557±0.033 (15)	1.433±0.050 (9)	1.547±0.059 (9)	0.055	0.815
28	1.435±0.033 (10) *	1.296±0.058 (9) *	1.428±0.071 (8)	0.034	0.896
32	1.404±0.041 (8) *	1.123±0.017 (8) *	1.448±0.051 (7)	0.000	0.535
BaL/VL					
24	0.601±0.016 (15) †	0.623±0.025 (9)	0.790±0.029 (9) †	0.411	0.000
28	0.632±0.033 (10) †	0.735±0.055 (9)	0.722±0.021 (8) †	0.277	0.020
32	0.641±0.025 (8) *	0.753±0.022 (8) *	0.657±0.028 (7)	0.007	0.694
BaL/VD					
24	0.934±0.027 (15) †	0.888±0.028 (9)	1.213±0.037 (9) †	0.263	0.000
28	0.903±0.042 (10) †	0.934±0.043 (9)	1.027±0.047 (8) †	0.548	0.043
32	0.895±0.027 (8)	0.844±0.018 (8)	0.950±0.048 (7)	0.161	0.463
BaL/SL					
24	0.029±0.001 (15) †*	0.032±0.001 (9) *	0.033±0.001 (9) †	0.040	0.003
28	0.027±0.001 (10) †*	0.033±0.001 (9) *	0.030±0.001 (8) †	0.000	0.016
32	0.026±0.001 (8) †*	0.033±0.001 (8) *	0.030±0.002 (7) †	0.000	0.040
VL/SL					
24	0.050±0.001 (15) †	0.051±0.002 (9)	0.043±0.001 (9) †	0.263	0.000
28	0.044±0.001 (10)	0.047±0.002 (9)	0.043±0.001 (8)	0.211	0.315
32	0.041±0.002 (8)	0.045±0.001 (8)	0.047±0.002 (7)	0.160	0.072
VD/SL					
24	0.032±0.001 (15) †*	0.035±0.001 (9) *	0.028±0.001 (9) †	0.034	0.001
28	0.030±0.001 (10) *	0.036±0.001 (9) *	0.030±0.001 (8)	0.000	0.965
32	0.029±0.001 (8) *	0.040±0.001 (8) *	0.033±0.002 (7)	0.000	0.281
VeV/SL, 10² μm²					
24	3.827±0.328 (15) †*	33.467±2.373 (9) *	25.175±0.920 (9) †	0.000	0.000
28	3.487±0.252 (10) †*	33.808±2.143 (9) *	25.001±1.016 (8) †	0.000	0.000
32	2.652±0.294 (8) †*	33.787±2.518 (8) *	27.825±2.204 (7) †	0.000	0.000
BulV/SL					
24	0.662±0.043 (15) †*	3.139±0.337 (9) *	3.029±0.354 (9) †	0.000	0.000
28	0.515±0.024 (10) †*	3.434±0.291 (9) *	3.418 ±0.221 (8) †	0.000	0.000
32	0.362±0.017 (8) †*	3.176±0.271 (8) *	3.384 ±0.242 (7) †	0.000	0.000
BulV/VeV					
24	0.139±0.006 (15) *	0.126±0.017 (9) *	0.160±0.013 (9)	0.047	0.138
28	0.154±0.012 (10)	0.136±0.013 (9)	0.139±0.011 (8)	0.277	0.408
32	0.145±0.012 (8)	0.125±0.005 (8)	0.123±0.007 (7)	0.442	0.231

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (VL/VD) λόγος μήκους προς ύψος κοιλίας, (BaL/VL) μήκος αρτηριακού βολβού προς μήκος κοιλίας, (BaL/VD) μήκος αρτηριακού βολβού προς ύψος κοιλίας, (BaL/SL) μήκος αρτηριακού βολβού κανονικοποιημένος ως προς το τυπικό μήκος σώματος SL, (VL/SL) μήκος κοιλίας κανονικοποιημένος ως προς το τυπικό μήκος σώματος SL, (VD/SL) ύψος κοιλίας κανονικοποιημένο ως προς το τυπικό μήκος σώματος SL, (VeV/SL) όγκος κοιλίας κανονικοποιημένος ως προς το τυπικό μήκος σώματος SL, (BulV/SL) όγκος αρτηριακού βολβού κανονικοποιημένος ως προς το τυπικό μήκος σώματος SL, (BulV/VeV) λόγος του όγκου του αρτηριακού βολβού προς όγκο κοιλίας. Οι τιμές είναι M.O. ± SE (N). Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ιχθυδίων και αρσενικών ατόμων της ίδιας πειραματικής συνθήκης (Mann-Whitney U test, p<0,05.) Οι σταυροί (†) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ιχθυδίων και θηλυκών ατόμων της ίδιας πειραματικής συνθήκης (Mann-Whitney U test, p<0,05.)

3.2.5.2 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην αλλομετρική αύξηση της καρδιάς του zebrafish

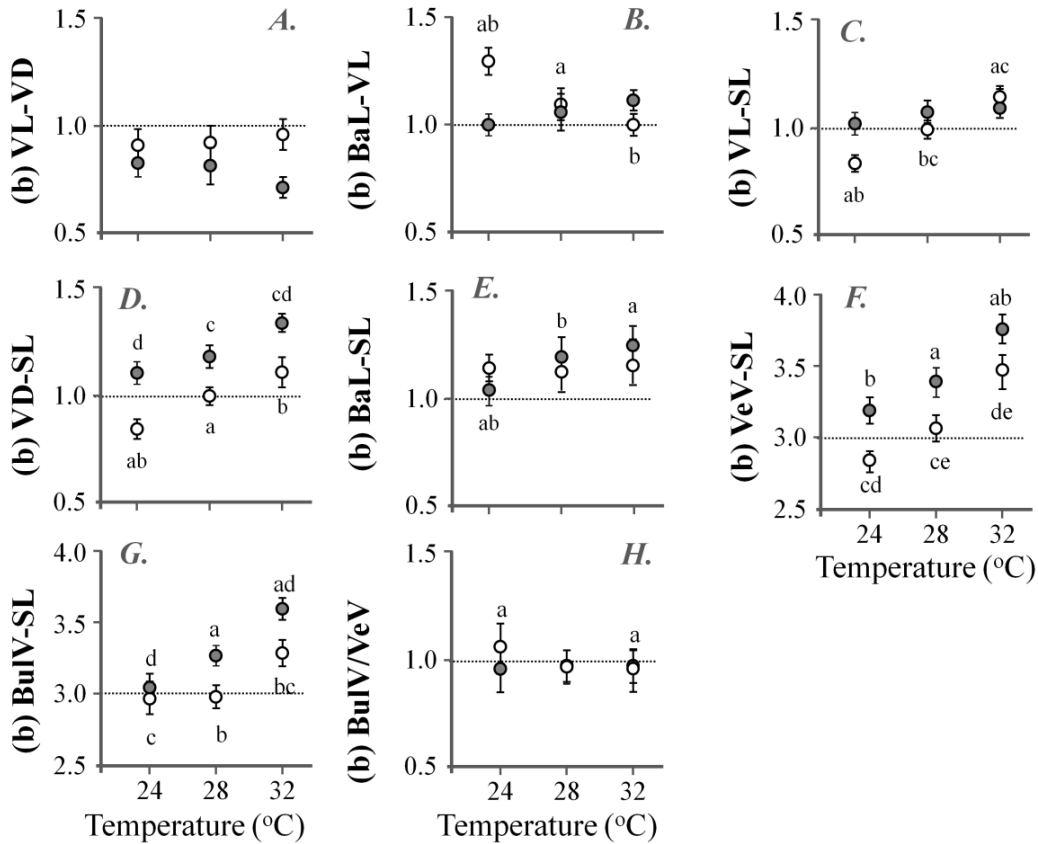
Η εκτίμηση των σχέσεων αλλομετρίας μεταξύ δύο χαρακτήρων ή μεταξύ του κάθε χαρακτήρα σε σχέση με το τυπικό μήκος σώματος (SL) έγινε με τον υπολογισμό των συντελεστών αλλομετρίας (b). Η μεταβολή των συντελεστών αλλομετρίας για κάθε προς μελέτη χαρακτήρα στις τρεις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες απεικονίζεται στην Εικόνα 3.15.

Ως προς την αύξηση του μήκους της κοιλίας σε σχέση με το ύψος της (b , VL-VD), η θερμοκρασία δεν επέδρασε σημαντικά σε κανένα από τα δύο φύλα. Σε όλες τις θερμοκρασίες στα θηλυκά, η αύξηση του μήκους κοιλίας ήταν ίδια με την αύξηση του ύψους της κοιλίας (ισομετρική αύξηση, $b=1$), ενώ στα αρσενικά σε όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες το μήκος της κοιλίας μεγάλωνε με μικρότερο βαθμό από το ύψος της ($b<1$) (Εικόνα 3.15A). Ως προς τη μεταβολή του μήκους του αρτηριακού βολβού σε σχέση με το μήκος κοιλίας ($BaL-VL$), η θερμοκρασία επέδρασε σημαντικά στα θηλυκά άτομα, όπου με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης έδειξε να μειώνεται σημαντικά ο ρυθμός αύξησης του μήκους του αρτηριακού βολβού σε σχέση με το μήκος κοιλίας. Στα θηλυκά των 24 και 28 °C και στα αρσενικά των 32°C παρατηρήθηκε θετική αλλομετρία ($b>1$) με το μήκος του αρτηριακού βολβού να αυξάνει γρηγορότερα από το μήκος κοιλίας, ενώ στις υπόλοιπες συνθήκες εφαρμόστηκε ισομετρική αύξηση μεταξύ των δύο χαρακτήρων ($b=1$) (Εικόνα 3.15B).

Ως προς την αλλομετρική αύξηση του μήκους της κοιλίας σε σχέση με το τυπικό μήκος σώματος (VL-SL), η θερμοκρασία επέδρασε σημαντικά στους συντελεστές αλλομετρίας των θηλυκών ατόμων όλων των θερμοκρασιακών συνθηκών. Ο ρυθμός αύξησης του μήκους της κοιλίας σε σχέση με το τυπικό μήκος σώματος αυξήθηκε σημαντικά από τους 24 στους 28 και στους 32°C ($p<0.05$, ANCOVA), με τα θηλυκά των 24°C να παρουσιάζουν αρνητικό πρότυπο αλλομετρίας, τα θηλυκά των 28 °C, ισομετρικό πρότυπο ($b=1$), και τα θηλυκά των 32°C, θετικό πρότυπο αλλομετρίας ($b>1$). Τα αρσενικά των 24 και 28 °C παρουσίασαν ισομετρική αλλομετρική αύξηση του μήκους κοιλίας σε σχέση με το τυπικό μήκος ($b=1$), ενώ στα αρσενικά των 32°C, το μήκος κοιλίας αυξανόταν με μεγαλύτερο ρυθμό από το μήκος σώματος ($b>1$) (Εικόνα 3.15C). Ως προς την αύξηση του ύψους της κοιλίας σε σχέση με το τυπικό μήκος σώματος των ψαριών (VD-SL), τα δύο φύλα παρουσίασαν όμοιο πρότυπο ανάπτυξης, με το συντελεστή αλλομετρίας (b) να αυξάνει σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης. Στους 24 °C, τα θηλυκά παρουσίασαν αρνητική αλλομετρική σχέση του ύψους κοιλίας σε σχέση με το τυπικό μήκος σώματος, ενώ στις υπόλοιπες θερμοκρασίες η αύξηση ήταν ισομετρική ($b=1$). Στα αρσενικά, σε όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες η αύξηση του ύψους κοιλίας ήταν μεγαλύτερη από την αύξηση του μήκους σώματος ($b>1$) (Εικόνα 3.15D). Ως προς την αύξηση του μήκους του αρτηριακού βολβού ως προς το μήκος σώματος ($BaL-SL$) σε όλες τις θερμοκρασίες και στα δύο φύλα παρατηρήθηκε θετική αλλομετρία ($b>1$), ενώ η

Αποτελέσματα

θερμοκρασία επέδρασε σημαντικά μόνο στα αρσενικά άτομα (αύξηση συντελεστή αλλομετρίας με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης, $p < 0.05$, ANCOVA) (Εικόνα 3.15E).



Εικόνα 3.15: Μεταβολή των συντελεστών αλλομετρίας (b) ως προς την αλλομετρική αύξηση (A) του μήκους κοιλίας ως προς το ύψος της, (B) του μήκους αρτηριακού βολβού ως προς το ύψος κοιλίας, και (C) του μήκους του αρτηριακού βολβού ως προς το μήκος κοιλίας, (D) του μήκους κοιλίας ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (E) του ύψους κοιλίας ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (F) του μήκους του αρτηριακού βολβού ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (G) του όγκου κοιλίας ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (H) του όγκου του αρτηριακού βολβού ως προς το τυπικό μήκος σώματος και (I) του όγκου του αρτηριακού βολβού ως προς τον όγκο κοιλίας, σε αρσενικά (γεμάτοι κύκλοι) και θηλυκά άτομα (άδειοι κύκλοι) των τριών θερμοκρασιακών συνθηκών (24°C, 28°C και 32°C). Τα όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0.05$, ANCOVA). (VL) μήκος κοιλίας, (VD) ύψος κοιλίας, (BaL) μήκος αρτηριακού βολβού, (VeV) όγκος κοιλίας, (BuIV) όγκος αρτηριακού βολβού, (SL) τυπικό μήκος σώματος. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με ± 1 SE.

Ως προς την αλλομετρική αύξηση του όγκου της κοιλίας σε σχέση με το τυπικό μήκος σώματος (VeV-SL), τα δύο φύλα είχαν κοινό πρότυπο μεταβολής των συντελεστών αλλομετρίας (σημαντική αύξησή τους με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης, $p < 0.05$, ANCOVA). Στα θηλυκά των 24 °C η αύξηση του όγκου κοιλίας ήταν μικρότερη της αύξησης του μήκους σώματος ($b < 3$), στους 28 °C η αλλομετρική σχέση ήταν ίση ($b = 1$) και στους 32 °C, η σχέση αλλομετρίας ήταν θετική ($b > 3$). Στα αρσενικά όλων των θερμοκρασιών ο όγκος κοιλίας μεγάλωνε με μεγαλύτερο ρυθμό από το τυπικό μήκος σώματος ($b > 3$) (Εικόνα 3.15F). Με τον ίδιο τρόπο, τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα παρουσίασαν ίδιο πρότυπο αλλομετρικής αύξησης του όγκου του αρτηριακού βολβού σε σχέση με το τυπικό μήκος σώματος (BuIV-SL), όπου με

την αύξηση της θερμοκρασίας αυξήθηκαν σημαντικά οι συντελεστές αλλομετρίας. Στα θηλυκά, η ισομετρική αλλομετρική αύξηση στους 24 και 28 °C ($b=3$) μετατράπηκε σε σχέση θετικής αλλομετρίας στους 32 °C ($b>3$). Στα αρσενικά των 24°C η σχέση του όγκου του αρτηριακού βολβού με τον τυπικό μήκος σώματος ήταν σχέση ισομετρίας ($b=3$), ενώ στους 28 και 32 °C ο όγκος του αρτηριακού βολβού αυξάνει με μεγαλύτερο ρυθμό από το μήκος σώματος ($b>3$) (Εικόνα 3.15G). Τέλος, ως προς την αύξηση του όγκου του αρτηριακού βολβού σε σχέση με τον όγκο της κοιλίας (BuIV-VeV) η θερμοκρασία επέδρασε σημαντικά στα θηλυκά άτομα, όπου με την αύξηση της θερμοκρασίας μειώθηκε ο συντελεστής αλλομετρίας (από ισομετρία στους 24 °C σε αρνητική αλλομετρική σχέση στους 32 °C, $b<1$), ενώ στα αρσενικά άτομα όλων των θερμοκρασιών, η σχέση ήταν ισομετρική ($b=1$) (Εικόνα 3.15H).

Στον Πίνακα 3.5 αναγράφονται αναλυτικά οι τιμές των p values (ανάλυση συνδιακύμανσης ANCOVA) που προέκυψαν από τη σύγκριση των συντελεστών αλλομετρίας μεταξύ των θηλυκών και μεταξύ των αρσενικών ατόμων των τριών πειραματικών πληθυσμών αντίστοιχα.

Αποτελέσματα

Πίνακας 3.5: Παράμετροι της αλλομετρικής σχέσης ($Y = a x^b$) των μορφομετρικών δεικτών που μελετήθηκαν

Y-X	T _D	Φύλο	a	b	a SE	b SE	r	n	b ₀	t _p	ρ ισομετρίας	ρ (24-28)	ρ (28-32)	ρ (24-32)
VL-SL	24	fe males	-1,119	0,832	0,044	0,034	0,982	24	1	2,074	0,001	0,008	0,035	0,001
	28	fe males	-1,337	0,978	0,051	0,039	0,987	18	1	2,120	0,288			
	32	fe males	-1,534	1,133	0,080	0,061	0,982	15	1	2,160	0,024			
	24	males	-1,321	1,015	0,059	0,047	0,978	24	1	2,074	0,378			
	28	males	-1,429	1,062	0,074	0,056	0,977	19	1	2,110	0,143			
	32	males	-1,497	1,098	0,072	0,055	0,983	16	1	2,145	0,040			
VD-SL	24	fe males	-1,316	0,838	0,055	0,043	0,972	24	1	2,074	0,001	0,016	0,179	0,002
	28	fe males	-1,508	0,991	0,053	0,041	0,986	18	1	2,120	0,419			
	32	fe males	-1,646	1,102	0,095	0,073	0,973	15	1	2,160	0,092			
	24	males	-1,608	1,102	0,060	0,047	0,981	24	1	2,074	0,021			
	28	males	-1,710	1,177	0,061	0,046	0,987	19	1	2,110	0,001			
	32	males	-1,903	1,335	0,052	0,040	0,994	16	1	2,145	0,001			
BaL-SL	24	fe males	-1,675	1,131	0,047	0,037	0,989	24	1	2,074	0,001	0,808	0,603	0,692
	28	fe males	-1,691	1,116	0,062	0,048	0,985	18	1	2,120	0,014			
	32	fe males	-1,758	1,159	0,089	0,068	0,978	15	1	2,160	0,018			
	24	males	-1,603	1,066	0,037	0,029	0,992	24	1	2,074	0,016			
	28	males	-1,795	1,210	0,060	0,046	0,988	19	1	2,110	0,001			
	32	males	-1,884	1,273	0,062	0,047	0,991	16	1	2,145	0,001			
VeV-SL	24	fe males	4,616	2,840	0,093	0,073	0,993	24	3	2,074	0,020	0,001	0,013	0,001
	28	fe males	4,262	3,078	0,123	0,095	0,992	18	3	2,120	0,211			
	32	fe males	3,695	3,474	0,156	0,119	0,992	15	3	2,160	0,001			
	24	males	4,215	3,202	0,118	0,092	0,991	24	3	2,074	0,019			
	28	males	3,908	3,401	0,132	0,101	0,993	19	3	2,110	0,001			
	32	males	3,368	3,771	0,134	0,102	0,995	16	3	2,145	0,001			
BVol-SL	24	fe males	3,621	2,963	0,134	0,105	0,986	24	3	2,074	0,364	0,901	0,020	0,036
	28	fe males	3,542	2,980	0,105	0,082	0,994	18	3	2,120	0,407			
	32	fe males	3,051	3,292	0,128	0,098	0,994	15	3	2,160	0,005			
	24	males	3,538	3,037	0,134	0,105	0,987	24	3	2,074	0,364			
	28	males	3,227	3,269	0,099	0,076	0,995	19	3	2,110	0,001			
	32	males	2,710	3,602	0,107	0,082	0,996	16	3	2,145	0,001			

Αποτελέσματα

VL-VD	24	fe males	0,178	0,955	0,015	0,049	0,972	24	1	2,074	0,186	0,933	0,502	0,421
	28	fe males	0,144	0,961	0,017	0,054	0,976	18	1	2,120	0,242			
	32	fe males	0,154	1,008	0,014	0,042	0,989	15	1	2,160	0,426			
	24	males	0,157	0,908	0,011	0,037	0,983	24	1	2,074	0,010	0,832	0,167	0,083
	28	males	0,114	0,896	0,013	0,042	0,982	19	1	2,110	0,011			
	32	males	0,068	0,826	0,008	0,026	0,993	16	1	2,145	0,001			
BVoL-VeV	24	fe males	-1,176	1,041	0,241	0,029	0,991	24	1	2,074	0,089	0,077	0,781	0,019
	28	fe males	-0,467	0,954	0,323	0,039	0,987	18	1	2,120	0,129			
	32	fe males	-0,389	0,940	0,235	0,029	0,994	15	1	2,160	0,028			
	24	males	-0,386	0,940	0,274	0,033	0,987	24	1	2,074	0,041	0,906	0,928	0,813
	28	males	-0,400	0,945	0,315	0,038	0,987	19	1	2,110	0,084			
	32	males	-0,460	0,950	0,200	0,024	0,996	16	1	2,145	0,028			
BaL-VL	24	fe males	-0,158	1,315	0,012	0,065	0,974	24	1	2,074	0,001	0,037	0,271	0,001
	28	fe males	-0,167	1,108	0,016	0,071	0,969	18	1	2,120	0,074			
	32	fe males	-0,190	1,009	0,013	0,052	0,983	15	1	2,160	0,437			
	24	males	-0,217	1,010	0,010	0,048	0,976	24	1	2,074	0,419	0,358	0,456	0,757
	28	males	-0,171	1,066	0,020	0,088	0,946	19	1	2,110	0,232			
	32	males	-0,150	1,135	0,012	0,051	0,986	16	1	2,145	0,010			
BVoL-VeV	24	fe males	-1,176	1,041	0,241	0,029	0,991	24	1	2,074	0,089	0,077	0,781	0,019
	28	fe males	-0,467	0,954	0,323	0,039	0,987	18	1	2,120	0,129			
	32	fe males	-0,389	0,940	0,235	0,029	0,994	15	1	2,160	0,028			
	24	males	-0,386	0,940	0,274	0,033	0,987	24	1	2,074	0,041	0,906	0,928	0,813
	28	males	-0,400	0,945	0,315	0,038	0,987	19	1	2,110	0,084			
	32	males	-0,460	0,950	0,200	0,024	0,996	16	1	2,145	0,028			

(T_D) Θερμοκρασία ανάπτυξης, (b) συντελεστής αλλομετρίας, (a) σταθερά της σχέσης αλλομετρίας, (r) συντελεστής προσδιορισμού, (tr) στατιστική συνάρτηση ελέγχου ισομετρίας (H₀: b =3 για VeV-SL και BvoL-SL, b=1 για BaL-SL, VL-SL, VD-SL, VL-VD, BaL-VL, BaL-VD), (p) στατιστική συνάρτηση ελέγχου ισότητας μεταξύ των b των τριών ομάδων με ANCOVA. (VeV) όγκος κοιλίας, (BvoL) όγκος αρτηριακού βολβού, (BaL) μήκος αρτηριακού βολβού, (VL) μήκος κοιλίας, (VD) ύψος κοιλίας, (SL) τυπικό μήκος σώματος.

3.2.6 Fourier ανάλυση του σχήματος της κοιλίας

Η κανονική ανάλυση κυρίων συντεταγμένων (CAP) έδειξε σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχήμα της καρδιάς τόσο των ενηλίκων όσο και των ιχθυδίων. Στην Εικόνα 3.16 απεικονίζεται η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχήμα της κοιλίας των ιχθυδίων, των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων. Στα ιχθύδια, η θερμοκρασία επέδρασε σημαντικά στο σχήμα της κοιλίας ($p < 0,001$, Permanova). Σύμφωνα με την κανονική ανάλυση κυρίων συντεταγμένων (CAP) η CAP1 επεξηγεί το 85,0% της διαφοροποίησης του σχήματος ενώ η CAP2 το 53,6%. Οι κατά ζεύγη συγκρίσεις έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των ιχθυδίων των 24 και 32 °C και μεταξύ των ιχθυδίων των 28 και 32 °C αντίστοιχα ($p < 0,05$, pair wise test). Οι διαφορές στο σχήμα της κοιλίας των διαφορετικών συνθηκών υποδεικνύουν μια πιο μυτερή κοιλία στα ιχθύδια των 24 και 28 °C σε σχέση με τα ιχθύδια των 32 °C τα οποία χαρακτηρίζονται από πιο στρογγυλεμένη κοιλία.

Στα αρσενικά άτομα, η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχήμα της κοιλίας ήταν σημαντική. Σύμφωνα με την κανονική ανάλυση κυρίων συντεταγμένων, η CAP1 επεξηγεί το 94,2% του διαχωρισμού, και η CAP2 το 64%. Οι κατά ζεύγη συγκρίσεις έδειξαν στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αρσενικών των 24 και 32 °C. Από τα περιγράμματα των κοιλιών προκύπτει πως η διαφοροποίηση των ομάδων βασίζεται στην αισθητά πιο στρογγυλή κοιλία των αρσενικών των 32 °C σε σχέση με τα αρσενικά των 24 °C.

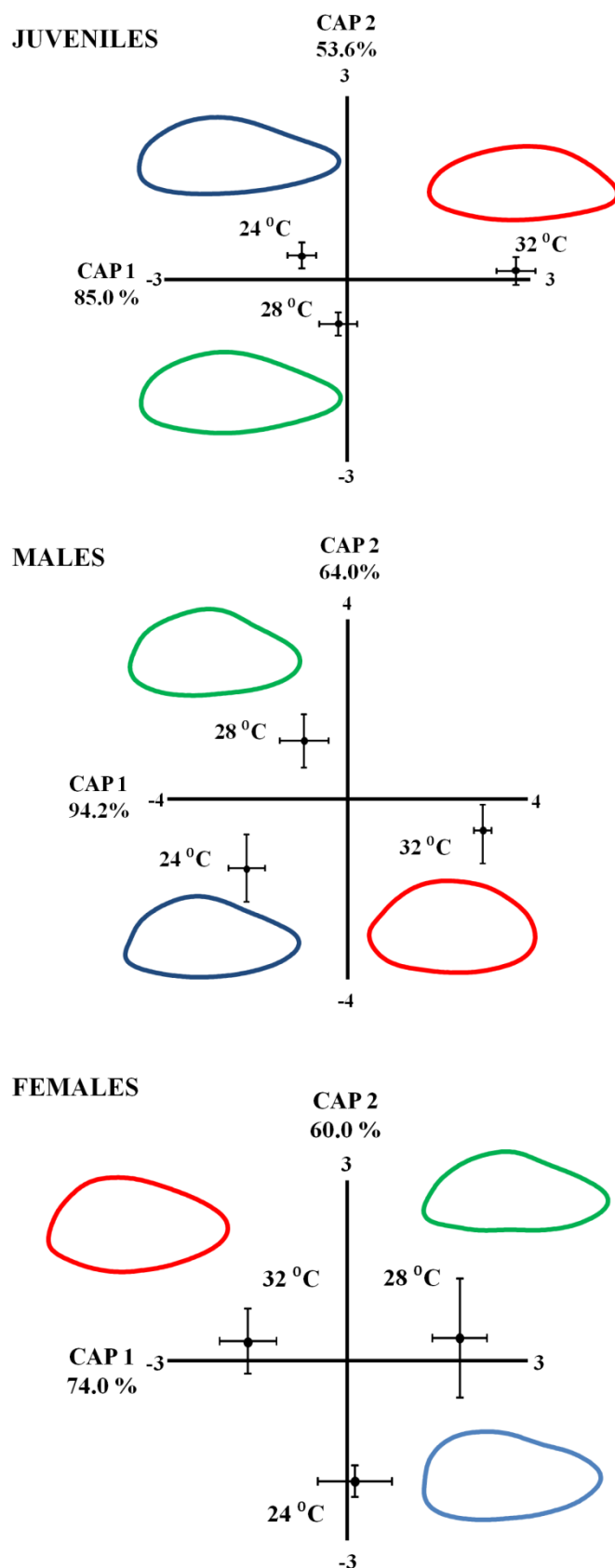
Στα θηλυκά άτομα, η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στο σχήμα της κοιλίας. Σύμφωνα με την κανονική ανάλυση κυρίων συντεταγμένων, η CAP1 επεξηγεί το 74% της διαφοροποίησης, ενώ η CAP2 το 60%. Οι κατά ζεύγη συγκρίσεις έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των θηλυκών των 28 και 32 °C, με τις διαφορές του σχήματος να επικεντρώνονται στην πιο επιμηκυμένη κοιλία της συνθήκης των 28 °C συγκριτικά με την πιο βαθειά κοιλία των 32 °C.

Παράλληλα, εξετάστηκε η επίδραση του φύλου και του οντογενετικού σταδίου στο σχήμα της κοιλίας για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης (Εικόνα 3.17). Στους 24 °C, το φύλο και το οντογενετικό στάδιο επέδρασαν σημαντικά στο σχήμα της κοιλίας των ιχθυδίων, των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων ($p < 0,001$, Permanova). Η CAP1 επεξηγεί το 97,2% της διαφοροποίησης ενώ η CAP2 το 86%. Οι κατά ζεύγη συγκρίσεις έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ όλων των υπό εξέταση ομάδων. Τα ιχθύδια διαφοροποιήθηκαν από τα αρσενικά και τα θηλυκά αντίστοιχα, ενώ τα αρσενικά διαφοροποιήθηκαν και από τα θηλυκά. Σε σχέση με τα ιχθύδια, τα αρσενικά άτομα παρουσίασαν μεγαλύτερο ύψος κοιλίας, ενώ τα θηλυκά πιο μυτερή κοιλία. Μεταξύ των φύλων, το σχήμα της κοιλίας των θηλυκών ατόμων ήταν πιο ωοειδές σε σχέση με τα αρσενικά άτομα.

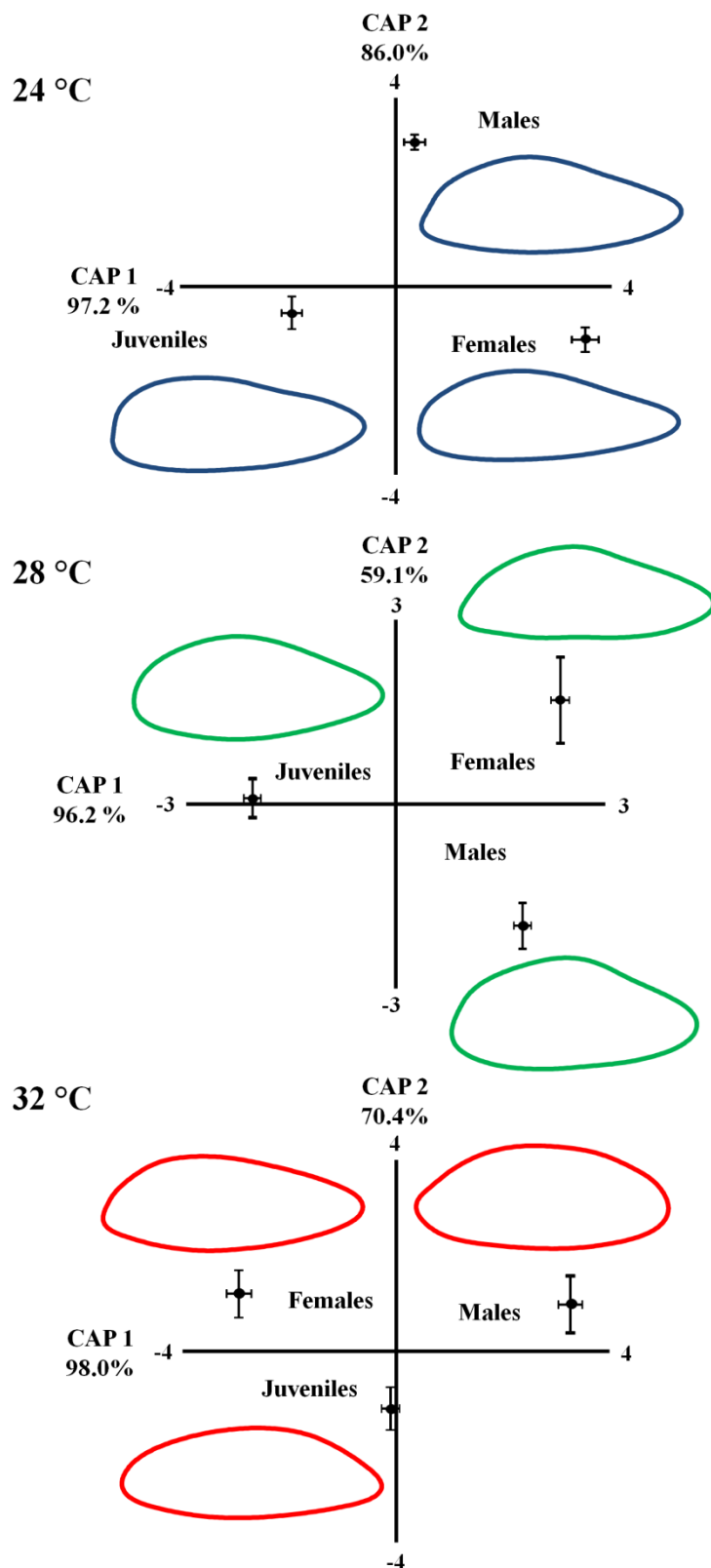
Στους 28 °C, το οντογενετικό στάδιο και το φύλο επέδρασαν σημαντικά στο σχήμα της κοιλίας των ιχθυδίων, των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων. Η CAP1

επεξηγεί το 96,2% της διαφοροποίησης ενώ η CAP2 το 59,1%. Οι κατά ζεύγη συγκρίσεις έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ όλων των υπό εξέταση ομάδων. Στους 28 °C τα ιχθύδια διαφοροποιήθηκαν από τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα αντίστοιχα, ενώ τα αρσενικά διαφοροποιήθηκαν και από τα θηλυκά. Σε σχέση με τα ιχθύδια, τα αρσενικά άτομα παρουσίασαν μεγαλύτερο ύψος κοιλίας, ενώ τα θηλυκά πιο μυτερή και επιμηκυμένη κοιλία. Οι διαφορές του σχήματος μεταξύ των θηλυκών και αρσενικών ατόμων ήταν η πιο ψηλή κοιλία των αρσενικών και η πιο μυτερή κοιλία των θηλυκών.

Τέλος στους 24 °C, το οντογενετικό στάδιο και το φύλο επέδρασαν σημαντικά σε όλες τις προς μελέτη ομάδες ($p < 0,001$, PerMANOVA). Η CAP1 επεξήγησε το 98% της διαφοροποίησης ενώ η CAP2 το 70,4%. Οι κατά ζεύγη συγκρίσεις έδειξαν σημαντική διαφοροποίηση του σχήματος κοιλίας μεταξύ των ιχθυδίων και των αρσενικών ατόμων, των ιχθυδίων και των θηλυκών ατόμων, καθώς και μεταξύ των δύο φύλων στα ενήλικα. Σε σχέση με τα θηλυκά, τα ιχθύδια παρουσίασαν πιο βαθειά κοιλία και επιμηκυμένη κοιλία. Σε σύγκριση με τα αρσενικά, τα ιχθύδια είχαν λιγότερο στρογγυλεμένη και βαθειά κοιλία. Σε σύγκριση με τα θηλυκά άτομα, τα αρσενικά παρουσίασαν περισσότερο στρογγυλεμένη κοιλία ενώ τα θηλυκά πιο μακρόστενη.



Εικόνα 3.16: Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στις τιμές (mean \pm SE) της ανάλυσης κύριων συντεταγμένων της κοιλίας των ιχθυδίων, των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων. Στις παρενθέσεις δίνονται τα ποσοστά της συνολικής διακύμανσης του σχήματος κοιλίας που εξηγούνται από τον εκάστοτε άξονα. (Juveniles) ιχθύδια, (Males) αρσενικά, (Females) θηλυκά. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με ± 1 SE.



Εικόνα 3.17: Επίδραση του οντογενετικού σταδίου και του φύλου στις τιμές (mean±SE) της ανάλυσης κύριων συντεταγμένων της κοιλίας των ατόμων για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης. Στις παρενθέσεις δίνονται τα ποσοστά της συνολικής διακύμανσης του σχήματος κοιλίας που εξηγούνται από τον εκάστοτε άξονα. (Juveniles) ιχθύδια, (Males) αρσενικά, (Females) θηλυκά. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με ±1SE.

3.3 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη γονιδιακή έκφραση των ιχθυδίων zebrafish

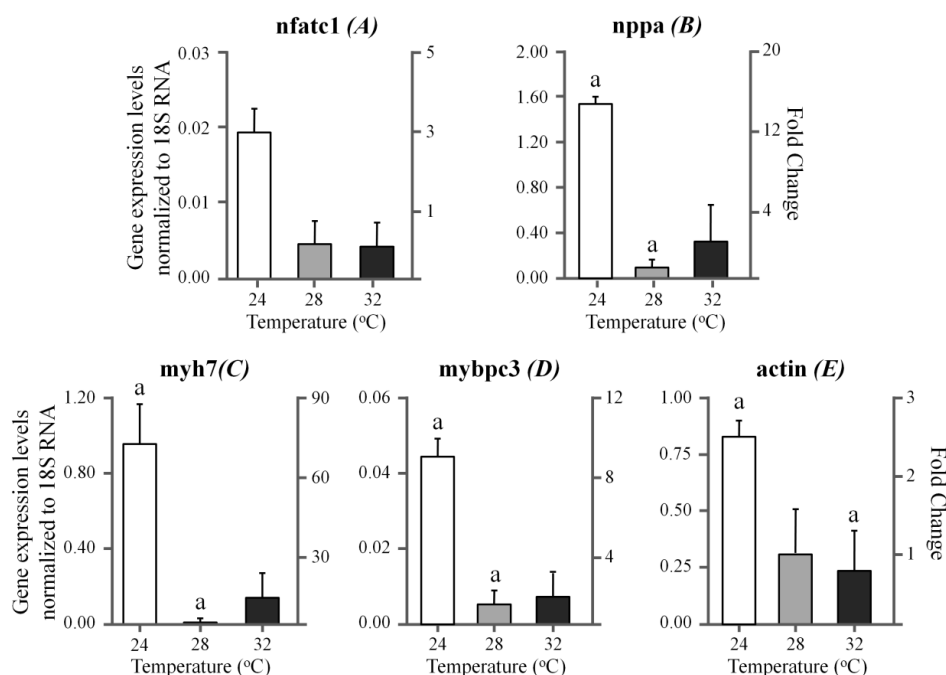
Η έκφραση των πέντε υπό εξέταση γονιδίων μελετήθηκε σε δύο οντογενετικά στάδια, στο τέλος της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών (στάδιο A) και μετά από 20 μέρες εγκλιματισμού στις κοινές συνθήκες (στάδιο B). Στις Εικόνες 3.18 και 3.19 απεικονίζεται η γονιδιακή έκφραση των υπό εξέταση γονιδίων για τα στάδια A και B αντίστοιχα, κανονικοποιημένη ως προς την έκφραση του 18S RNA (γονίδιο αναφοράς).

Στο στάδιο A (τέλος διαφορετικών συνθηκών), η θερμοκρασία ανάπτυξης είχε σημαντική επίδραση στη σχετική έκφραση του *hrra*, του *myh7*, του *mybpc3* και της *actb2* ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis test, Εικόνα 3.18B-E). Οι κατά ζεύγη συγκρίσεις έδειξαν σημαντική αύξηση της έκφρασης του *hrra*, του *myh7* και του *mybpc3* στους 24 °C σε σχέση με τους 28 °C (κατά 16, 74 και 9 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με τους 28 °C), και σημαντική αύξηση της έκφρασης της *actb2* στους 24°C σε σχέση με τους 32 °C (αυξημένη έκφραση κατά ~ 2,5 φορές).

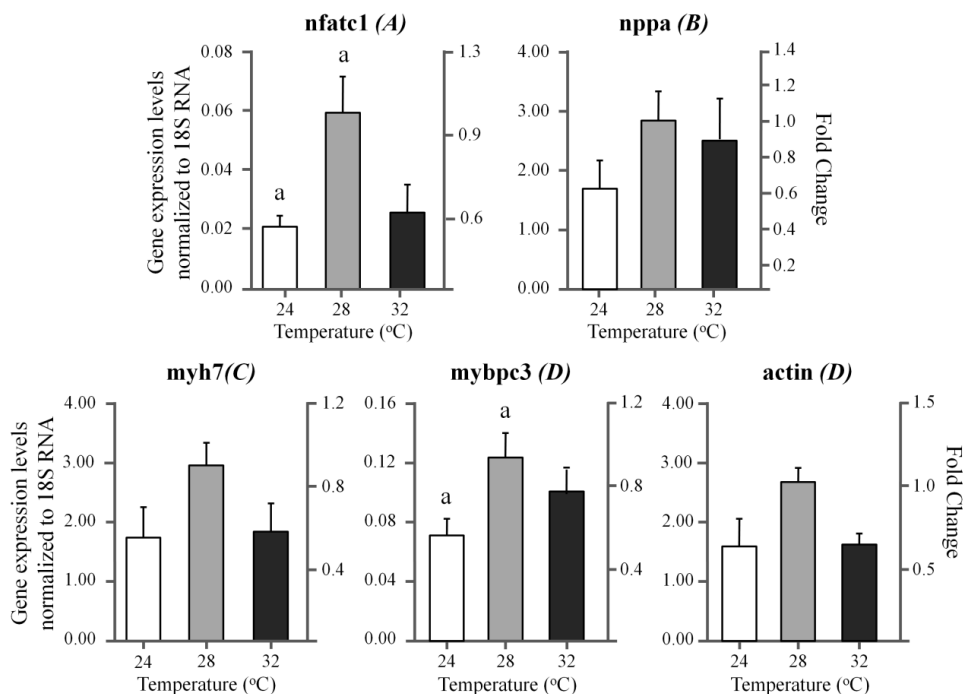
Στο δεύτερο υπό εξέταση στάδιο (στάδιο B), όπου τα ιχθύδια είχαν εγκλιματιστεί στους 28°C, οι θερμο-εξαρτώμενες διαφορές παρατηρήθηκαν στην έκφραση του *nfatc1* και του *mybpc3* με υψηλότερες τιμές στους 28 °C αυτή τη φορά από τους 24°C. Η έκφραση και των δύο γονιδίων βρέθηκε σημαντικά υψηλότερη στους 28 °C σε σχέση με τους 24 °C κατά ~3 και ~2 φορές αντίστοιχα για τα γονίδια *nfatc1* και *mybpc3* ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). Στα υπόλοιπα υπό εξέταση γονίδια δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στο στάδιο B.

Συνολικά, ως προς την επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην έκφραση των γονιδίων στόχων, παρατηρείται πως στο πρώτο υπό εξέταση στάδιο (A) ακολουθείται το ίδιο πρότυπο απόκρισης στην πλειονότητα των γονιδίων με τα επίπεδα έκφρασης στους 24°C να υπερβαίνουν σημαντικά τις άλλες δύο συνθήκες. Αντίθετα, στο δεύτερο υπό εξέταση στάδιο (B) δεν υπάρχει ένα κοινό πρότυπο απόκρισης, ενώ οι διαφορές στη γονιδιακή έκφραση είναι πολύ μικρότερες μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών.

Αποτελέσματα



Εικόνα 3.18: Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη σχετική έκφραση των γονιδίων *nfatc1* (A), *nrpa* (B), *myh7* (C), *mybpc3* (D) και *actb2* (E) σε ιχθύδια zebrafish στο τέλος των διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών (στάδιο A). Ως γονίδιο αναφοράς, χρησιμοποιήθηκε το *18S RNA*. Τα όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ιχθυδίων των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). $n = 4$ (στους 24 και 28°C) και $n = 3$ (στους 32°C). (Fold change), γονιδιακή έκφραση κανονικοποιημένη ως προς τις τιμές των επιπέδων έκφρασης στους 28°C. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με ± 1 SE.



Εικόνα 3.19: Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη σχετική έκφραση των γονιδίων *nfatc1* (A), *nrpa* (B), *myh7* (C), *mybpc3* (D) και *actb2* (E) σε ιχθύδια zebrafish μετά από 20 μέρες εγκληματισμού σε κοινές συνθήκες (στάδιο B). Ως γονίδιο αναφοράς, χρησιμοποιήθηκε το *18S RNA*. Τα όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ιχθυδίων των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). $n = 5$ (σε όλες τις συνθήκες). (Fold change), γονιδιακή έκφραση κανονικοποιημένη ως προς τις τιμές των επιπέδων έκφρασης στους 28°C. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με ± 1 SE.

3.4 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην κολυμβητική ικανότητα του zebrafish

3.4.1 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην ταχύτητα κολύμβησης

Η σχέση του τυπικού μήκους σώματος (SL) και της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης (U_{crit}) ελέγχθηκε για ισομετρία με ανάλυση παλινδρόμησης μετά από λογαρίθμηση των μεταβλητών. Τόσο για τα ιχθύδια όσο και για τα ενήλικα (Πίνακας 3.6), φάνηκε πως η κλίση της σχέσης του $\log(U_{crit})$ με το $\log(SL)$ δεν διέφερε σημαντικά από τη μονάδα, για καμία από τις τρεις θερμοκρασίες που εξετάστηκαν ($p > 0,05$, Student's t-test για $b=1$). Δείχνεται έτσι, πως η σχετική κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (RU_{crit}) είναι ανεξάρτητη του μήκους των ψαριών.

Πίνακας 3.6: Αποτελέσματα της αλλομετρικής συσχέτισης και του ελέγχου μέσω του t-test για την εξέταση της σχέσης $\log(U_{crit}) = \log(a) + b \cdot \log(SL)$ για τα ιχθύδια κάθε θερμοκρασίας ανάπτυξης.

	T_D (°C)	a	b	a SE	b SE	r	n	b_0	tp	p
Juveniles	24	1.291	0.970	0.484	0.389	0.419	17	1	0.076	0.470
	28	1.501	0.788	0.322	0.264	0.652	14	1	0.804	0.219
	32	1.094	1.109	0.401	0.332	0.679	15	1	0.328	0.374
Males	24	3.797	-0.893	1.568	1.156	0.360	6	1	1.638	0.088
	28	2.131	0.327	0.796	0.583	0.270	6	1	1.154	0.156
	32	2.436	0.066	3.135	2.275	0.015	6	1	0.410	0.351
Females	24	-0.375	2.106	1.662	1.207	0.615	7	1	0.916	0.201
	28	1.633	0.666	0.427	0.313	0.690	7	1	1.069	0.167
	32	1.134	0.920	1.280	0.898	0.416	7	1	0.090	0.466

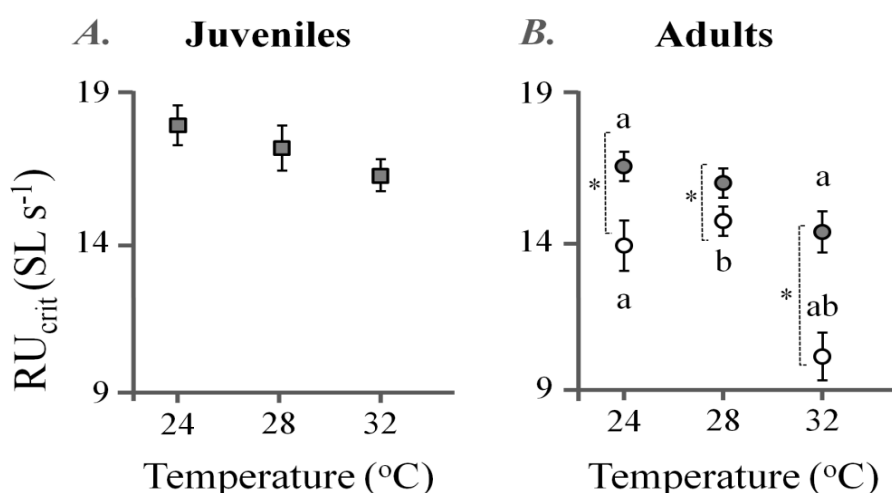
(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (a) σταθερά της εξίσωσης αλλομετρίας, (b) συντελεστής αλλομετρίας; SE, τυπικό λάθος για τις παραμέτρους a και b αντίστοιχα; r, συντελεστής συσχέτισης; n, αριθμός ατόμων; b_0 , τιμή ελέγχου για ισομετρική αύξηση; (tp) στατιστική συνάρτηση ελέγχου ισομετρίας, (p) στατιστική συνάρτηση ελέγχου ισότητας μεταξύ των b

Στα ιχθύδια, η θερμοκρασία ανάπτυξης δεν επέδρασε σημαντικά ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis test, Εικόνα 3.20A). Η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης κυμάνθηκε από $16,9 \pm 0,4$ ($\pm SE$) μήκη σώματος ανά δευτερόλεπτο ($SL s^{-1}$) στους $32^\circ C$, μέχρι $18,0 \pm 0,5$ $SL s^{-1}$ στους $24^\circ C$.

Στα ενήλικα, η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στην ταχύτητα κολύμβησης όπου το πρότυπο απόκρισης διαφοροποιήθηκε βάση φύλου (Εικόνα 3.20B). Στα αρσενικά, τα άτομα που αρχικά αναπτύχθηκαν στους $24^\circ C$ παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερες τιμές RU_{crit} σε σχέση με τα αρσενικά που αναπτύχθηκαν στους $32^\circ C$ ($16,9 \pm 0,7$ $SL s^{-1}$ έναντι της τιμής του $14,2 \pm 0,9$ $SL s^{-1}$ των

32 °C, $p < 0,05$, Mann-Whitney U test). Τα θηλυκά, παρουσίασαν και αυτά καθοδικό πρότυπο απόκρισης με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης με τη διαφορά ότι η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης για τη συνθήκη των 32 °C ($10,6 \pm 0,6 \text{ SL s}^{-1}$) ήταν σημαντικά χαμηλότερη από τους 24 °C (με $14,1 \pm 0,7 \text{ SL s}^{-1}$) αλλά και από τους 28 °C (με $15,0 \pm 0,4 \text{ SL s}^{-1}$).

Σε όλες τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν τα αρσενικά παρουσίασαν σημαντικά υψηλότερες τιμές RU_{crit} από τα θηλυκά άτομα ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test, Εικόνα 3.20B).



Εικόνα 3.20: Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης (24 °C, 28 °C και 32 °C) στην κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (RU_{crit}) των ιχθυδίων (A) και ενήλικων (B) zebrafish. Τα όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ θηλυκών (άδειοι κύκλοι) και των αρσενικών ατόμων (γεμάτοι κύκλοι) των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων της ίδιας πειραματικής συνθήκης ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test). Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με $\pm 1SE$.

Η επίδραση του οντογενετικού σταδίου στη σχετική κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης απεικονίζεται στον Πίνακα 3.7. Σε όλες τις πειραματικές συνθήκες που εξετάστηκαν, τα ιχθύδια παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές κρίσιμης ταχύτητας (14-37% υψηλότερες τιμές) σε σχέση με τα θηλυκά των αντίστοιχων θερμοκρασιών ($p < 0,05$, Mann-Whitney U test). Σε σχέση με τα αρσενικά άτομα, οι τιμές της κρίσιμης ταχύτητας των ιχθυδίων ήταν σημαντικά υψηλότερες για τη συνθήκη των 32 °C ($16,9 \pm 1,4$ για τα ιχθύδια και $14,5 \pm 2,1 \text{ SL s}^{-1}$ για τα αρσενικά, $p < 0,05$, Mann-Whitney U test).

Πίνακας 3.7: Επίδραση του οντογενετικού σταδίου στην κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης του zebrafish

T_D (°C)	RU_{crit} Juveniles	RU_{crit} Males	RU_{crit} Females	p J-m	p J-f
24	18,04±0,48 (17) †	16,92±0,29 (6)	14,16±0,67 (7) †	0,135	0,001
28	17,54±0,43(14) †	16,31±0,35 (6)	15,03±0,37 (7) †	0,109	0,001
32	16,87±0,36 (15) * †	14,25±0,86 (6) *	10,572±0,62 (7) †	0,029	0,001

(T_D) θερμοκρασία ανάπτυξης, (RU_{crit}) σχετική κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης. Οι τιμές είναι M.O. ± SE (n). Οι αστερίσκοι (*) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των ιχθυδίων και των αρσενικών ατόμων της ίδιας πειραματικής συνθήκης (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$.) Οι σταυροί (†) υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ ιχθυδίων και θηλυκών ατόμων της ίδιας πειραματικής συνθήκης (Mann-Whitney U test, $p < 0,05$.) (p J-m) στατιστική συνάρτηση ελέγχου ισότητας μεταξύ των τιμών της RU_{crit} των ιχθυδίων και των αρσενικών ατόμων, (p J-f) στατιστική συνάρτηση ελέγχου ισότητας μεταξύ των τιμών της RU_{crit} των ιχθυδίων και των θηλυκών ατόμων,

3.4.2 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχήμα σώματος του zebrafish

Η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο σχήμα σώματος των ιχθυδίων, των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων των πειραμάτων κολύμβησης απεικονίζεται στην Εικόνα 3.21.

Στα ιχθύδια, η ανάλυση γεωμετρικής μορφομετρίας έδειξε ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στο σχήμα σώματος (Wilks' $\lambda = 0,1380$, $p < 0,001$). Η πρώτη κανονική μεταβλητή (CV1) διαχώρισε πλήρως τα άτομα που αναπτύσσονταν στους 32 °C από αυτά των 24 και 28 °C, ερμηνεύοντας το 82,8% της συνολικής ποικιλομορφίας του σχήματος του σώματος. Η δεύτερη κανονική μεταβλητή (CV2) ερμήνευσε το 17,2% της συνολικής ποικιλομορφίας, και διαχώρισε τα άτομα των 24 και 32 °C από αυτά των 28 °C (Εικόνα 3.21A).

Κατά μήκος της CV1, τα άτομα των 24 και 28 °C συγκριτικά με τα άτομα των 32 °C, χαρακτηρίστηκαν από:

1. Νωτιαία μετατόπιση του ρύγχους
2. Οπίσθια και κοιλιακή μετατόπιση του ραχιαίου πτερυγίου
3. Πρόσθια και κοιλιακή μετατόπιση της ουράς
3. Μεγέθυνση του εδρικού πτερυγίου
5. Διογκωμένη κοιλιακή περιοχή

Κατά μήκος της CV2, τα άτομα των 24 °C και 32 °C συγκριτικά με τα άτομα των 28 °C χαρακτηρίστηκαν από:

1. Διογκωμένη κοιλιακή περιοχή
2. Σμίκρυνση της ουράς
3. Νωτιαία μετατόπιση του πρόσθιου άκρου του κοιλιακού πτερυγίου
3. Νωτιαία μετατόπιση του οπίσθιου άκρου του βραγχιακού επικαλύμματος

Από τα πλέγματα παραμόρφωσης προκύπτει ότι η κύρια διαφοροποίηση του σώματος των ιχθυδίων που μεγάλωσαν στους 32 °C σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες ήταν η λιγότερο διογκωμένη κοιλία και το πιο υδροδυναμικό τους σχήμα.

Στα ενήλικα άτομα, προκειμένου να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο τροποποιήθηκαν οι σωματικές δομές των ενήλικων θηλυκών και αρσενικών zebrafish που είχαν υποβληθεί στις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες, ακολούθησε κατά φύλο ανάλυση γεωμετρικής μορφομετρίας και παραγωγή των αντίστοιχων πλεγμάτων παραμόρφωσης (Εικόνα 3.21-B, Εικόνα 3.21-C).

Στα αρσενικά, η ανάλυση της γεωμετρικής μορφομετρίας έδειξε ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στο σχήμα σώματος (Wilks' $\lambda=0,0211812$, $p<0,003$). Η πρώτη κανονική μεταβλητή (CV1) διαχώρισε πλήρως τα άτομα που αναπτύσσονταν στους 24 °C από αυτά των 28 °C και των 32 °C, ερμηνεύοντας το 89,9% της συνολικής ποικιλομορφίας του σχήματος του σώματος. Η δεύτερη κανονική μεταβλητή (CV2) ερμήνευσε το 10,1% της συνολικής ποικιλομορφίας, και διαχώρισε τα άτομα των 24 και 28 °C από αυτά των 32 °C.

Κατά μήκος της CV1, τα άτομα των 28 °C και 32 °C συγκριτικά με τα άτομα των 24 °C, χαρακτηρίστηκαν από:

1. Οπίσθιο-νωτιαία μετατόπιση του ρύγχους
2. Νωτιαία μετατόπιση του ραχιαίου πτερυγίου
3. Ραχιαία μετατόπιση της ουράς
3. Οπίσθιο-νωτιαία μετατόπιση του εδρικού πτερυγίου
5. Επιμήκυνση του κοιλιακού πτερυγίου
6. Ραχιαία μετατόπιση του βραγχιακού επικαλύμματος

Κατά μήκος της CV2, τα άτομα των 24 °C και 28 °C συγκριτικά με τα άτομα των 32°C, χαρακτηρίστηκαν από::

1. Πρόσθιο-νωτιαία μετατόπιση του ρύγχους
2. Πρόσθιο-νωτιαία μετατόπιση του ραχιαίου πτερυγίου
3. Οπίσθια μετατόπιση της ουράς
3. Σμίκρυνση εδρικού πτερυγίου
5. Σμίκρυνση κοιλιακής περιοχής
6. Οπίσθια μετατόπιση του βραγχιακού επικαλύμματος

Από τα πλέγματα παραμόρφωσης των αρσενικών ατόμων προκύπτει πως κύρια διαφοροποίηση της ομάδας των 24 °C σε σχέση με τις ομάδες των 28 και των 32 °C είναι η πιο διευρυμένη περιοχή της κοιλίας και η νωτιαία μετατόπιση της ουράς, δίνοντας διαφορετικό υδροδυναμικό σχήμα στα άτομα της συγκεκριμένης συνθήκης.

Στα θηλυκά άτομα, η ανάλυση της γεωμετρικής μορφομετρίας έδειξε ότι η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στο σχήμα σώματος των ατόμων (Wilks' $\lambda=0,0005162$, $p<0,001$). Η πρώτη κανονική μεταβλητή (CV1) διαχώρισε πλήρως τα άτομα που αναπτύσσονταν στους 24 °C και 28 °C από αυτά των 32 °C και

Αποτελέσματα

ερμηνεύοντας το 93,8% της συνολικής ποικιλομορφίας του σχήματος του σώματος. Η δεύτερη κανονική μεταβλητή (CV2) ερμήνευσε το 6,1% της συνολικής ποικιλομορφίας, και διαχώρισε τα άτομα των 24 από αυτά των 28 °C και 32 °C.

Κατά μήκος της CV1, τα άτομα των 32 °C συγκριτικά με τα άτομα των 24 °C και 28 °C, χαρακτηρίστηκαν από:

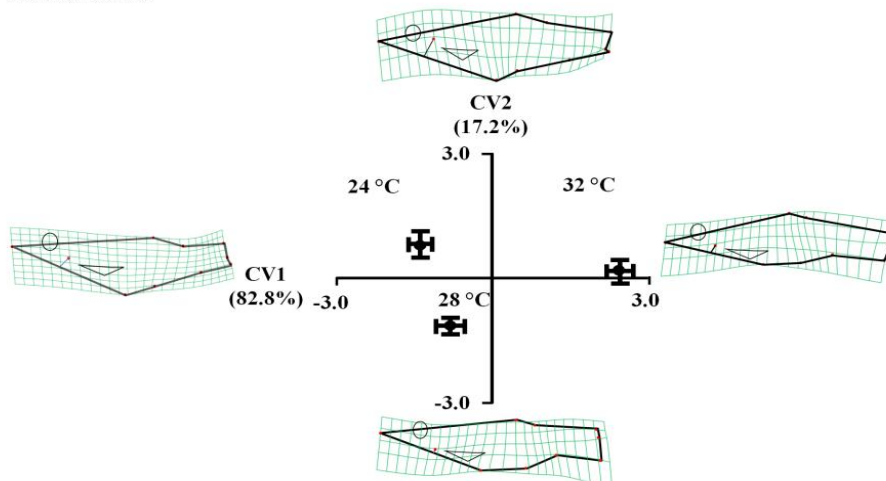
1. Νωτιαία μετατόπιση του ρύγχους
2. Οπίσθια μετατόπιση του ραχιαίου πτερυγίου
3. Νωτιαία μετατόπιση της ουράς
3. Σμίκρυνση εδρικού πτερυγίου
5. Σμίκρυνση κοιλιακού πτερυγίου
6. Ραχιαία μετατόπιση του οπίσθιου άκρου του βραγχιακού επικαλύμματος

Κατά μήκος της CV2, τα άτομα των 24 °C συγκριτικά με τα άτομα των 28 °C και 32 °C, χαρακτηρίστηκαν από:

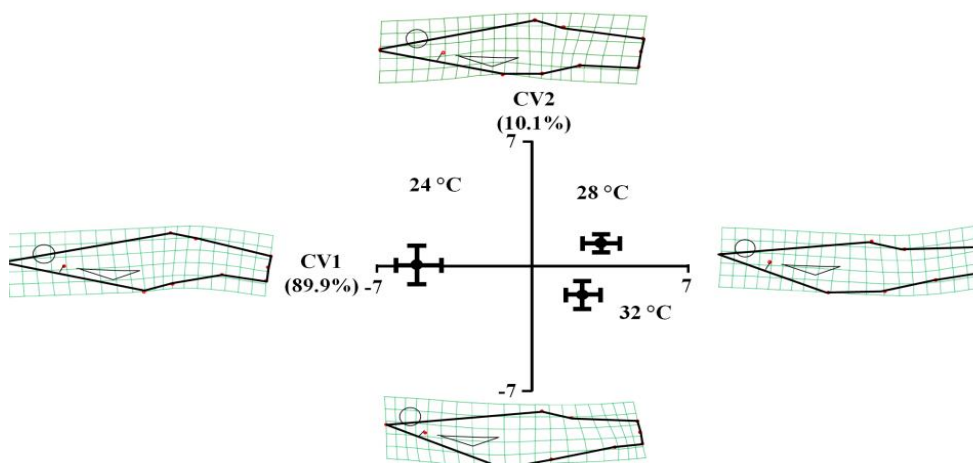
1. Οπισθιο-νωτιαία μετατόπιση του ρύγχους
2. Επιμήκυνση ραχιαίου πτερυγίου
3. Σμίκρυνση εδρικού πτερυγίου
3. Πρόσθια μετατόπιση κοιλιακού πτερυγίου

Όπως προκύπτει από τα πλέγματα παραμόρφωσης του σώματος των θηλυκών ατόμων, ο κύριος χαρακτήρας που διαχώρισε την ομάδα των 32 °C από τις ομάδες των 24 και των 28 °C, ήταν η νωτιαία μετατόπιση του ραχιαίου πτερυγίου, συμβάλλοντας στη διαμόρφωση ενός πιο υδροδυναμικού σχήματος για τη συνθήκη των 32 °C.

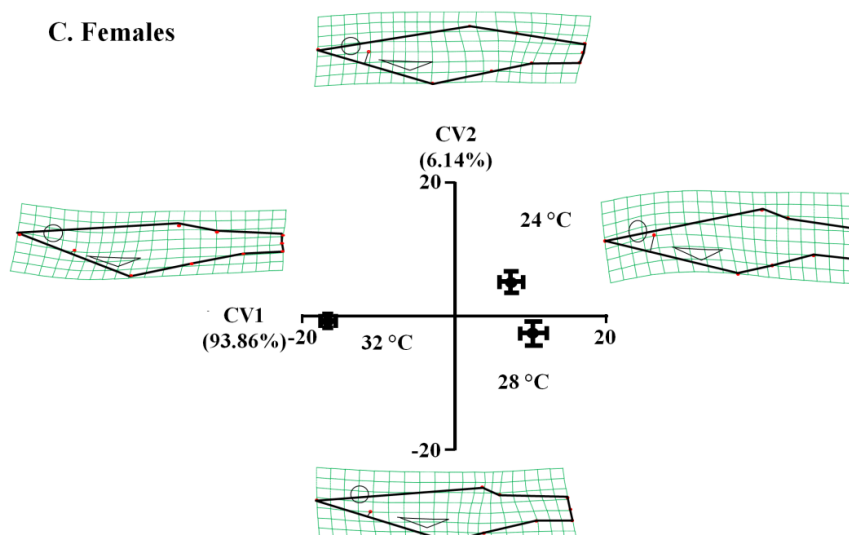
A. Juveniles



B. Males



C. Females



Εικόνα 3.21: Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης (24 °C, 28 °C και 32 °C) στο σχήμα σώματος των (A) ιχθυδίων, (B) αρσενικών και (C). θηλυκών zebrafish κατά μήκος των δύο κανονικών μεταβλητών (CV1 και CV2). Δίνονται οι μέσες τιμές των κανονικών μεταβλητών. Στις παρενθέσεις αναγράφεται το ποσοστό της συνολικής ποικιλομορφίας του σχήματος του σώματος που ερμηνεύει η κάθε κανονική μεταβλητή. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με $\pm 2SE$.

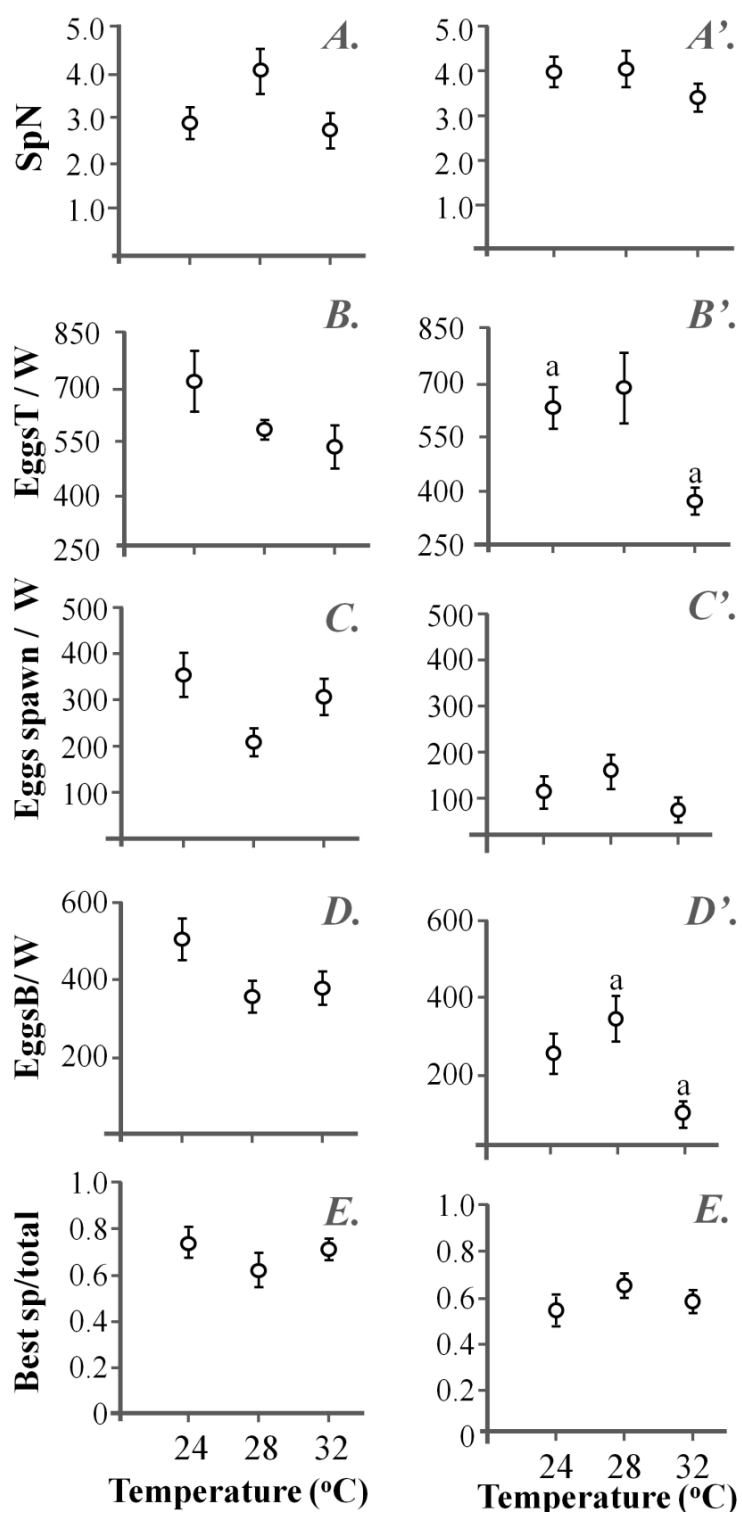
3.5 Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη γονιμότητα του zebrafish

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που προέκυψαν από τα πειράματα επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης σε χαρακτήρες της γονιμότητας του zebrafish. Οι πέντε προς εξέταση χαρακτήρες (κανονικοποιημένοι ως προς το βάρος σώματος των θηλυκών ατόμων), απεικονίζονται σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία ανάπτυξης στην Εικόνα 3.22. Τα πειράματα περιέλαβαν δύο πειραματικές επαναλήψεις.

Στην πρώτη πειραματική επανάληψη, η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης δεν ήταν σημαντική για κανένα από τους υπό εξέταση χαρακτήρες ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis test) (Εικόνα 3.22-A,B,C,D,E). Ο αριθμός των ωοτοκίων σε διάστημα πέντε ημερών κυμάνθηκε από 2,1 ($\pm 0,3$, SE) ωοτοκίες στους 24°C έως 3,1 ($\pm 0,4$) στους 28 °C. Ο συνολικός αριθμός των αβγών κυμάνθηκε από 554 (± 56) αβγά στους 28 °C μέχρι 718 (± 89) αβγά στους 24 °C. Ο αριθμός των αβγών ανά ωοτοκία κυμάνθηκε από 209 (± 25) αβγά στους 28 °C και μέχρι 353 (± 42) στους 24 °C. Τέλος, ο αριθμός των αβγών καλύτερης ωοτοκίας μετρήθηκε από 351 (± 39) αβγά στους 28 °C μέχρι 498 (± 54) στους 24 °C ενώ ο λόγος του αριθμού των αβγών καλύτερης ωοτοκίας προς το συνολικό αριθμό αβγών, κυμάνθηκε από 0,62 ($\pm 0,06$) στους 28°C και μέχρι 0,73 ($\pm 0,06$) στους 24 °C.

Στη δεύτερη πειραματική επανάληψη, το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis απέδειξε πως η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά ($p < 0,05$) σε δύο από τους πέντε υπό εξέταση χαρακτήρες. Οι κατά ζεύγη συγκρίσεις (Mann-Whitney U test) απέδειξαν πως τα θηλυκά άτομα των 24 °C είχαν σημαντικά μεγαλύτερο μέσο αριθμό αβγών (Eggs T, Εικόνα 3.22B') στο σύνολο των ωοτοκίων συγκριτικά με τα άτομα των 32 °C (481 ± 56 έναντι του 293 ± 32 στους 32 °C). Παράλληλα, τα θηλυκά άτομα των 28 °C είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές μέσου αριθμού αβγών καλύτερης ωοτοκίας (Eggs B, Εικόνα 3.22D') από τα θηλυκά των 32 °C (300 ± 35 έναντι του 152 ± 19 στους 32 °C). Ο αριθμός των ωοτοκίων σε διάστημα πέντε ημερών κυμάνθηκε από 3 ($\pm 0,3$, SE) ωοτοκίες στους 32 °C έως 4 ($\pm 0,4$) ωοτοκίες στους 28 °C και στους 24 °C. Ο αριθμός των αβγών ανά ωοτοκία κυμάνθηκε από 93 (± 12) στους 32°C έως 161 (± 35) στους 28 °C. Ο λόγος του αριθμού των αβγών καλύτερης ωοτοκίας προς το συνολικό αριθμό αβγών κυμάνθηκε από 0,49 ($\pm 0,04$) στους 24 °C μέχρι 0,59 ($\pm 0,04$) στους 28 °C.

Στο σύνολό τους οι δύο πειραματικές επαναλήψεις, αν και δεν αλληλο-επιβεβαιώθηκαν στατιστικά, επιδεικνύουν μια τάση για παραγωγή λιγότερων αβγών στις υψηλότερες θερμοκρασίες. Στην πρώτη πειραματική επανάληψη υπάρχει μια τάση για συγκριτικά μεγαλύτερο αριθμό συνολικών αβγών στους 24 °C σε σχέση με τους 32 °C η οποία όμως δεν επιβεβαιώνεται στατιστικά όπως στην δεύτερη πειραματική επανάληψη. Στο διάστημα των πέντε ημερών, ο αριθμός των ωοτοκίων κυμάνθηκε ~ από 2 έως 4 ωοτοκίες.



Εικόνα 3.22: Διαγράμματα της σχέσης: (A, A') του μέσου αριθμού ωοτοκίων (SpN), (B, B') του μέσου αριθμού αβγών στις ωοτοκίες (EggsT), (C, C') του μέσου αριθμού αβγών ανά ωοτοκία (Eggs spawn), (D, D') του μέσου αριθμού αβγών καλύτερης ωοτοκίας (Eggs B), και (E, E') του λόγου του μέσου αριθμού αβγών καλύτερης ωοτοκίας προς το μέσο συνολικό αριθμό αβγών (Best sp/total) για κάθε πειραματική συνθήκη (24, 28, 32 °C). Τα αποτελέσματα αφορούν την πρώτη (A, B, C, D, E) και τη δεύτερη (A', B', C', D', E') πειραματική επανάληψη. Τα όμοια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των θηλυκών ατόμων των διαφορετικών πειραματικών πληθυσμών ($p < 0.05$, Mann-Whitney U test). $n = 9, 7, 10$ (για τους 24, 28 και 32 °C της 1^{ης} πειραματικής επανάληψης), $n = 7, 6, 6$ (για τους 24, 28 και 32 °C της 2^{ης} πειραματικής επανάληψης). Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με ± 1 SE.

Αποτελέσματα

Ο αριθμός των αβγών ανά ωτοκία είχε μεγάλη διαφοροποίηση στις τιμές των δύο επαναλήψεων, όπου στη δεύτερη πειραματική επανάληψη οι τιμές ήταν κατά πολύ χαμηλότερες των τιμών της πρώτης πειραματικής επανάληψης. Το ίδιο συνέβη και για τις τιμές των αβγών της καλύτερης ωτοκίας (τιμές της πρώτης πειραματικής επανάληψης υψηλότερες από της δεύτερης), ενώ στην περίπτωση της δεύτερης πειραματικής επανάληψης η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά με τις θηλυκές των 28 °C να εμφανίζουν υψηλότερες τιμές από τους 32 °C.

4. Συζήτηση

4.1 Αναπτυξιακή πλαστικότητα της καρδιάς του zebrafish

Στην παρούσα εργασία, εξετάστηκε ένα σύνολο μορφομετρικών χαρακτήρων της καρδιάς, ώστε να μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης σε ιχθύδια και ενήλικα zebrafish.

Στα ιχθύδια, η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στο σχήμα της κοιλίας. Η επίδραση της θερμοκρασίας μελετήθηκε μέσω δύο διαφορετικών μεθόδων, του υπολογισμού του λόγου VL/VD και μέσω της Fourier ανάλυσης των περιγραμμάτων της κοιλίας. Η δεύτερη μέθοδος, ως πιο αναλυτική, επιβεβαίωσε τα αποτελέσματα της αύξησης της κυκλικότητας της κοιλίας με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης, περιγράφοντας πιο διεξοδικά πως μεταβλήθηκε το σχήμα της κοιλίας. Η περαιτέρω μελέτη των σχετικών διαστάσεων της καρδιάς έδειξε πως οι διαφορές στο σχήμα οφείλονταν στην ταυτόχρονη μείωση του μήκους και του βάθους της κοιλίας, με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης. Το μήκος του αρτηριακού βολβού έδειξε και αυτό να μειώνεται σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης, όπως και ο όγκος του αρτηριακού βολβού και ο όγκος της κοιλίας. Ως προς τη διάταξη των χώρων της καρδιάς, η γωνία της κοιλίας αυξήθηκε σημαντικά με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης ενώ υπήρχε μια ανάλογη τάση ως προς τη γωνία του αρτηριακού βολβού. Η μελέτη της μεταβολής της σχετικής ποσότητας του μυοκαρδίου κοιλίας αποκάλυψε πως η ποσότητα του μυοκαρδίου που καταλαμβάνει την κοιλία, μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης.

Από όλους τους υπό εξέταση μορφομετρικούς χαρακτήρες της καρδιάς, ένα μέρος συνέχισε να επηρεάζεται από τη θερμοκρασία ανάπτυξης μέχρι και την ενηλικίωση με φύλο-εξαρτώμενο τρόπο. Το πρότυπο μεταβολής των υπό εξέταση χαρακτήρων με βάση το φύλο, συζητείται αναλυτικά στο σχετικό υποκεφάλαιο (§4.2). Οι μετρήσεις μεταβολής του σχήματος απέδειξαν πως τα αρσενικά zebrafish που μεγάλωσαν στους 32 °C παρουσίασαν σημαντικά πιο κυκλική κοιλία (λόγω σημαντικής αύξησης του βάθους VD και μείωσης του μήκους VL) σε σχέση με τις υπόλοιπες θερμοκρασίες ανάπτυξης, ενώ στα θηλυκά άτομα, δεν παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης ως προς το σχήμα της κοιλίας (αύξηση μόνο του βάθους VD). Το μήκος του αρτηριακού βολβού δεν μεταβλήθηκε σημαντικά σε κανένα από τα δύο φύλα. Οι διαφορές επίσης που εντοπίστηκαν στο στάδιο των ιχθυδίων ως προς τον όγκο του αρτηριακού βολβού και τον όγκο κοιλίας εξομαλύνθηκαν στα αρσενικά και θηλυκά άτομα καθώς δεν υπήρχε επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών. Παρόλα αυτά, οι μετρήσεις αποκάλυψαν σημαντικές διαφυλετικές διαφορές ως προς τους όγκους του κάθε χώρου. Ο όγκος του μυοκαρδίου κοιλίας επίσης παρέμεινε αμετάβλητος με την ποσότητα του μυοκαρδίου να διαφοροποιείται μεταξύ των αρσενικών και θηλυκών ατόμων της ίδιας θερμοκρασίας. Στον Πίνακα 4.1 συνοψίζονται όλες οι παρατηρούμενες μεταβολές ανά στάδιο και φύλο των υπό εξέταση χαρακτήρων με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης.

Πίνακας 4.1: Σύνοψη των αλλαγών των υπό εξέταση μορφομετρικών χαρακτήρων της καρδιάς με την αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης.

	VL/VD	BaL/VL	BaL/VD	BaL/SL	VL/SL
Juveniles	▼	—	—	▼	▼
Females	—	▼	▼	—	—
Males	▼	▲	—	—	▼

	VD/SL	BulV/SL	VeV/SL	MyoV/SL	Ven Angle
Juveniles	▼	▼	▼	▼	▲
Females	▲	—	—	—	—
Males	▲	—	—	—	—

(juveniles) ιχθύδια, (females) θηλυκά, (males) αρσενικά, (VL/VD) μήκος προς ύψος κοιλίας, (BaL/VL) μήκος αρτηριακού βολβού προς ύψος κοιλίας, (BaL/VD) μήκος αρτηριακού βολβού προς ύψος κοιλίας, (BaL/SL) μήκος αρτηριακού βολβού ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (VL/SL) μήκος κοιλίας ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (VD/SL) ύψος κοιλίας ως προς το τυπικό μήκος σώματος, (VeV/SL) σχετικός όγκος κοιλίας, (BulV/SL) σχετικός όγκος αρτηριακού βολβού, (MyoV/SL) σχετικός όγκος μυοκαρδίου κοιλίας, (Ven Angle) γωνία κοιλίας, (SL) τυπικό μήκος σώματος.

Στην παρούσα εργασία, αποδεικνύεται για πρώτη φορά η πλαστικότητα της καρδιάς στο zebrafish έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης. Η πλαστικότητα του καρδιαγγειακού συστήματος του zebrafish έχει μελετηθεί στο παρελθόν έναντι της υποξίας και της έκθεσης σε πετρελαιοειδή. Οι Bagatto (2005) πρότειναν πως ανάπτυξη σε συνθήκες υποξίας προκάλεσε αλλαγή στο χρονοισμό του οντογενετικού προτύπου του καρδιαγγειακού συστήματος και σημαντικά χαμηλότερο καρδιακό ρυθμό σε νύμφες zebrafish. Οι Pelster (2002) έδειξαν πως μετά από ανάπτυξη σε συνθήκες έλλειψης οξυγόνου, παράμετροι του καρδιαγγειακού συστήματος (όπως η καρδιακή παροχή, και ο όγκος διαστολής) αυξάνουν σημαντικά σε νύμφες zebrafish. Οι παραπάνω εργασίες, αν και έχουν ως αντικείμενο μελέτης τις επιδράσεις της αναπτυξιακής πλαστικότητας, επικεντρώθηκαν μόνο στις πλαστικές αποκρίσεις κατά το νυμφικό στάδιο.

Η μελέτη της απόκρισης της καρδιάς ως προς το σχήμα της, έχει μελετηθεί υπό την επίδραση πετρελαιοειδών κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης. Οι Hicken *et al.* (2011) εξέθεσαν έμβρυα zebrafish σε υπο-θνησιγόνες ποσότητες πολυκυκλικών υδρογονανθράκων πετρελαίου (PAHs) για 48 h. Η έκθεση αυτή σε πετρελαιοειδή προκάλεσε μόνιμες αλλαγές στο σχήμα της κοιλίας των ενηλίκων και πιο συγκεκριμένα προκάλεσε ένα πιο κυκλικό σχήμα κοιλίας το οποίο συσχετίστηκε με μειωμένη κολυμβητική ικανότητα. Αντίστοιχα, οι Incardona *et al.* (2015) βρήκαν πως έκθεση σε χαμηλά επίπεδα πετρελαιοειδών σε έμβρυα σολομού και ρέγγας, προκάλεσε αλλαγές στο σχήμα της κοιλίας των ιχθυδίων, 8 - 9 μήνες μετά από την έκθεση και μείωση του σχετικού μήκους του αρτηριακού βολβού (κανονικοποιημένο ως προς το μήκος της κοιλίας). Στα ιχθύδια ρέγγας, παρατήρησαν επιπρόσθετα και σημαντική μείωση της γωνίας του αρτηριακού βολβού.

Στις παραπάνω εργασίες, η πιθανότητα πρόκλησης τερατογένεσης αποκλείστηκε υποδεικνύοντας τις πιθανές αποκρίσεις της αναπτυξιακής πλαστικότητας στη μορφολογία της καρδιάς των ιχθύων. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματά μας με τα αντίστοιχα των Hicken *et al.* (2011), βλέπουμε μια διαφοροποίηση ως προς τις τιμές

του σχήματος της κοιλίας. Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται αρχικά στο γεγονός ότι οι Hicken *et al.* (2011) αναλύσανε τα αποτελέσματά τους χωρίς να κάνουν διαχωρισμό φύλου ενώ επιδράσανε με πετρελαιοειδή μόνο κατά το εμβρυικό στάδιο ανάπτυξης του zebrafish. Παράλληλα, οι τελευταίοι, για τον καθορισμό του σχήματος της κοιλίας, εφαρμόσανε τεχνικές ιστολογίας έναντι του micro CT της παρούσης (τεχνική η οποία θεωρείται λιγότερο παρεμβατική έναντι της ιστολογίας).

Τέλος, αν και δεν υπάρχουν σχετικές εργασίες που να εξετάζουν τη θερμοκρασιακή πλαστικότητα της καρδιάς, πλήθος εργασιών έχει εστιάσει στις επιδράσεις του εγκλιματισμού στην καρδιά των ψαριών. Μέσω του εγκλιματισμού, η καρδιά των ιχθύων αναδιαμορφώνεται σε πολλά επίπεδα βιολογικής οργάνωσης, ως ένας μηχανισμός διατήρησης της καρδιακής λειτουργίας στις εποχιακές διακυμάνσεις (Keen *et al.* 2017). Πιο συγκεκριμένα, το μέγεθος της κοιλίας στα ψάρια, αυξάνει σε απόκριση κρύου εγκλιματισμού μέσω μηχανισμών υπερπλασίας και υπερτροφίας (Keen *et al.* 2017). Στην αρσενική πέστροφα, σε απόκριση κρύου εγκλιματισμού, έχει βρεθεί πως η κοιλία μεγαλώνει μέσω αύξησης του συνδετικού ιστού, του κολλαγόνου και των μυών του σπογγώδους μυοκαρδίου (Klaiman *et al.* 2011). Κατά τους συγγραφείς, η αύξηση αυτή σε μέγεθος θεωρείται μια αντιστάθμιση στη μείωση της συσταλτικότητας της καρδιάς λόγω χαμηλής θερμοκρασίας, εξισορροπώντας την με αύξηση της καρδιακής παροχής του αίματος ανά παλμό (Graham and Farrell 1989, Klaiman *et al.* 2011).

Στην παρούσα εργασία, κάποιοι από τους χαρακτήρες που εξετάστηκαν στο πρώτο υπό εξέταση στάδιο (στάδιο του ιχθυδίου) διαφοροποιήθηκαν σε απόκριση της θερμοκρασίας ανάπτυξης, ενώ στο ενήλικο στάδιο, κάποιες από τις διαφοροποιήσεις αυτές μεταξύ των συνθηκών εξομαλύνθηκαν. Οι τελευταίες ήταν αποκρίσεις εγκλιματισμού εφόσον μετά από την παραμονή στις κοινές συνθήκες οι διαφορές έπαψαν να εκφράζονται. Ανάμεσα σε αυτούς τους χαρακτήρες ήταν ο όγκος της κοιλίας των ιχθυδίων (VeV/SL), ο οποίος σε απόκριση κρύου εγκλιματισμού αυξήθηκε λόγω αύξησης του μυοκαρδίου, ο όγκος και το μήκος του αρτηριακού βολβού (BuIV/SL, BaL/SL) (τα οποία έδειξαν να αυξάνουν σε απόκριση του κρύου εγκλιματισμού), καθώς και η γωνία κοιλίας, Ven Angle (η οποία στα ιχθύδια μειώθηκε σε απόκριση κρύου εγκλιματισμού).

Στην παρούσα εργασία, οι παρατηρούμενες πλαστικές ή λόγω εγκλιματισμού μορφο-ανατομικές μεταβολές, συνδέονται με κάποια λειτουργικά χαρακτηριστικά της καρδιάς των ψαριών. Το σχήμα της κοιλίας, και συγκεκριμένα η κυκλικότητάς της, έχει προταθεί από προηγούμενες εργασίες ως δείκτης καρδιακής παροχής και συνεπώς δείκτης της αερόβιας κολύμβησης στο zebrafish και την πέστροφα (Claireaux *et al.* 2005, Hicken *et al.* 2011) (§1.4.3, Εισαγωγή). Ως προς την απόκριση του σχήματος της κοιλίας έναντι της έκθεσης σε πετρελαιοειδή, ο μηχανισμός δράσης των πετρελαιοειδών που προτείνεται είναι μέσω πρόκλησης αρρυθμίας της καρδιάς (Incardona *et al.* 2009, Incardona *et al.* 2013, Jung *et al.* 2013). Τα αποτελέσματα του σχήματος της παρούσας εργασίας υποστηρίζονται από

τα ευρήματα των προηγούμενων εργασιών καθώς περισσότερο κυκλική κοιλία στα αρσενικά, συμπίπτει με χαμηλότερες τιμές κρίσιμης ταχύτητας (§4.3, Συζήτηση).

Στα ιχθύδια, με την μείωση της θερμοκρασίας ανάπτυξης, παρατηρήθηκε αύξηση του όγκου και του μήκους του αρτηριακού βολβού καθώς και του όγκου και του μήκους της κοιλίας. Στο zebrafish, η μεγαλύτερη ποσότητα κοιλιακής μάζας έχει βρεθεί να εξυπηρετεί στην ανάπτυξη υψηλής αρτηριακής πίεσης και καρδιακής παροχής όπως και συμβάλει στην υποστήριξη ενός ενεργού μεταβολισμού (Hu *et al.* 2001). Επομένως, η αύξηση του όγκου και μήκους της κοιλίας είναι πιθανό να υποδεικνύει ένα μηχανισμό εξισορρόπησης της καρδιάς των ιχθυδίων στη χαμηλή συστολική πίεση λόγω χαμηλής θερμοκρασίας. Παράλληλα, καθώς ο αρτηριακός βολβός εξυπηρετεί στην εξομάλυνση της πίεσης του αίματος που προωθείται από την κοιλία (Olson 1998), είναι λογικό οι μεταβολές του σχήματος του να συνδέονται με τις παρατηρούμενες μεταβολές της κοιλίας. Στην παρούσα εργασία, η μεταβολή της ποσότητας του μυοκαρδίου των ιχθυδίων μαζί με τη μη- μεταβολή της κοιλότητας, επεξηγούν πως οι παρατηρούμενες αλλαγές του όγκου της κοιλίας μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών ήταν προϊόν μεταβολής αποκλειστικά του μυοκαρδιακού όγκου και όχι της κοιλότητας.

Στα ενήλικα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των συνθηκών ως προς τη σχετική ποσότητα μυοκαρδίου ή του όγκου κοιλίας. Οι Johnson *et al.* (2014) πρότειναν πως σε απόκριση κρύου εγκλιματισμού στο zebrafish, παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του συμπαγούς μυοκαρδίου λόγω μείωσης του κολλαγόνου, ενώ ο όγκος της καρδιάς παρέμεινε αμετάβλητος. Οι συγγραφείς απέδωσαν τη διατήρηση του όγκου της κοιλίας στη μη μεταβολή του καρδιακού παλμού σε απόκριση κρύου εγκλιματισμού (Little and Seebacher 2014) και πρότειναν πως εφόσον η συσταλτικότητα της καρδιάς δεν αλλάζει, δεν παρατηρείται αλλαγή στον όγκο γιατί δεν είναι απαραίτητη.

Οι αναστρέψιμες αποκρίσεις των γωνιών στο στάδιο του ιχθυδίου ήταν και αυτές απόρροια εγκλιματισμού στις διαφορετικές συνθήκες ανάπτυξης. Η μεταβολή της γωνίας της κοιλίας μπορεί να συνδέεται τόσο με τη μεταβολή του όγκου της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού, όσο και με την επιμήκυνση του αρτηριακού βολβού σε υψηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης. Σε νύμφες mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) οι Perrichon *et al.* (2017) βρήκαν πως με αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης μεγαλώνει η γωνία μεταξύ του κόλπου και της κοιλίας αλλάζοντας τη διάταξη των χώρων της καρδιάς. Τις αλλαγές αυτές τις απέδωσαν είτε στο οντογενετικό στάδιο (λόγω διαφορετικών θερμοκρασιών ανάπτυξης), είτε στην αλλαγή της μορφολογίας της καρδιάς έναντι της θερμοκρασίας προκειμένου να αντισταθμίσει τις μεταβολές στην συσταλτικότητα της καρδιάς, και συνεπώς της καρδιακής παροχής (Kalogirou *et al.* 2014, Edmunds *et al.* 2015). Αν και δεν έχει δειχτεί μέχρι τώρα άμεση σχέση της γωνίας αυτής με τη δυσλειτουργία της καρδιάς, η αύξηση της έχει συνδεθεί με έκθεση σε πετρελαιοειδή και με αλλαγές του προτύπου οντογένεσης του καρδιακού σωλήνα (Hicken *et al.* 2011, Edmunds *et al.* 2015). Τέλος, μεταβολές της γωνίας του αρτηριακού βολβού έχουν συσχετιστεί με μη-φυσιολογικά σχήματα κοιλίας (Porpe *et*

al. 2003, Singleman and Holtzman 2012) και με έκθεση σε περιβαλλοντικές τοξίνες (Gamperl and Farrell 2004, Claireaux *et al.* 2005).

Στο zebrafish, οι γωνίες που σχηματίζει η κοιλία με τον αρτηριακό βολβό έχουν μεγάλη σημασία για την οντογένεση της καρδιάς (Singleman and Holtzman 2012), ενώ έχουν προταθεί ως κατάλληλοι δείκτες των διαφορών του σχήματος της καρδιάς στην πέστροφα και το σολομό (Porpe *et al.* 2003, Claireaux *et al.* 2005). Στην παρούσα εργασία, φάνηκε πως το στάδιο ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στις γωνίες αρτηριακού βολβού και κοιλίας. Στην εργασία τους οι Singleman and Holtzman (2012) πρότειναν πως συγκεκριμένα η γωνία του αρτηριακού βολβού στα ενήλικα διαφοροποιείται σημαντικά σε σχέση με τα ιχθύδια. Το τελευταίο το απέδωσαν στη δυναμική φύση του αρτηριακού βολβού ο οποίος αναδιαμορφώνεται ανάλογα με τη διάταξη της καρδιάς κατά την οντογένεση.

Για την περαιτέρω διεύρυνση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας θα ήταν χρήσιμο να εξεταστούν ιστολογικά οι καρδιές των διαφορετικών συνθηκών των δύο υπό εξέταση σταδίων. Με την επεξεργασία αυτή γίνεται δυνατή η ποσοτικοποίηση της μεταβολής πολλών ιστολογικών χαρακτήρων, όπως η μεταβολή του σπογγώδους και του συμπαγούς μυοκαρδίου, ή η μεταβολή της ποσότητας του συνδετικού ιστού και του κολλαγόνου. Με αυτόν τον τρόπο δίνεται μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα των μορφολογικών τροποποιήσεων της καρδιάς, και μια περαιτέρω ιστολογική προσέγγιση των διαφορών.

Τέλος, με βάση τους Gupta and Poss (2012) ένα νέο φλοιώδες στρώμα προστίθεται στην καρδιά του zebrafish στις ~ 42 dpf, το επικάρδιο. Μια πιθανή ιστολογική προσέγγιση των αλλαγών που λαμβάνουν μέρος σε εκείνη την περίοδο της οντογένεσης του επικαρδίου, καθώς και οι πιθανές διαφοροποιήσεις της αναγεννητικής ικανότητας των καρδιο-μυοκυττάρων στο ενήλικο στάδιο (Sanchez-Iranzo *et al.* 2018) μεταξύ των θερμοκρασιακών συνθηκών θα ήταν εξίσου χρήσιμες για τον καθορισμό της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη λειτουργία και μορφογένεση της καρδιάς.

4.2 Φυλετικός διμορφισμός της καρδιάς στο zebrafish

Η πλαστική απόκριση της καρδιάς των ενηλίκων διαφοροποιήθηκε σημαντικά με φυλο-εξαρτώμενο τρόπο για τους υπό εξέταση μορφολογικούς χαρακτήρες. Σε αντίθεση με την πλαστική απόκριση που είχε η κυκλικότητα της καρδιάς των αρσενικών ατόμων στη θερμοκρασία ανάπτυξης, τα θηλυκά zebrafish δεν παρουσίασαν καμία διαφοροποίηση στο λόγο VL/VD μεταξύ των συνθηκών. Ως προς το λόγο VL/VD φαίνεται πως τα θηλυκά δεν παρουσίασαν καμία μεταβολή σε σχέση με τα ιχθύδια, ενώ στα αρσενικά ο λόγος διαφοροποιήθηκε σημαντικά (μειώθηκε) στους 28 και στους 32 °C σε σχέση με τα ιχθύδια. Φαίνεται λοιπόν, πως τα αρσενικά άτομα συνεχίζουν και μεταβάλλουν το σχήμα τους σε σχέση με το στάδιο του ιχθυδίου, με την καρδιά να γίνεται πιο κυκλική. Χαρακτηριστική είναι η απόκριση του προτύπου μεταβολής του μήκους της κοιλίας των δύο φύλων καθώς

ενώ στα αρσενικά οι τιμές δε μεταβάλλονται σημαντικά σε σχέση με τα ιχθύδια, στα θηλυκά των 24 °C, ο εν λόγω χαρακτήρας μειώνεται σημαντικά. Το ύψος της κοιλίας των αρσενικών ατόμων βρέθηκε σε όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες σημαντικά υψηλότερο από των θηλυκών. Η μεταβολή του προτύπου του ύψους της κοιλίας στα αρσενικά εμφάνισε ανοδικό πρότυπο σε όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες, ενώ στα θηλυκά, διαφοροποιήθηκε σε σχέση με τα ιχθύδια μόνο στους 32 °C. Το μήκος του αρτηριακού βολβού είχε την ίδια απόκριση στα δύο φύλα όπου σε όλες τις θερμοκρασίες παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του μήκους σε σχέση με τα ιχθύδια. Ο όγκος της κοιλίας (άρα και ο σχετικός όγκος του μυοκαρδίου) των αρσενικών ατόμων ήταν σημαντικά μεγαλύτερος από τον όγκο της κοιλίας των θηλυκών στους 24 και 28 °C όπως και ο όγκος του αρτηριακού βολβού στους 28 και 32 °C. Ως προς τις γωνίες του αρτηριακού βολβού και κοιλίας τα δύο φύλα δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφοροποιήσεις.

Ο φυλετικός διμορφισμός των καρδιακών αποκρίσεων έναντι της θερμοκρασίας έχει διερευνηθεί και σε άλλα είδη ψαριών. Στην αρσενική πέστροφα, σε απόκριση κρύου ή θερμού εγκλιματισμού, άλλαξε το μέγεθος της κοιλίας και η σύσταση σε συνδετικό ιστό ενώ στα θηλυκά δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές (Klaiman *et al.* 2011). Στο ίδιο είδος, σε απόκριση εγκλιματισμού, τα αρσενικά παρουσίασαν μεγαλύτερη κοιλία καθώς και μεγαλύτερη πίεση διαστολής σε σχέση με τα θηλυκά άτομα. Το τελευταίο το απέδωσαν στη μεγαλύτερη ποσότητα συμπαγούς μυοκαρδίου των αρσενικών έναντι των θηλυκών ατόμων (Klaiman *et al.* 2014). Οι Klaiman *et al.* (2011) συσχέτισαν τη φυλετικά καθοριζόμενη επίδραση του εγκλιματισμού στην καρδιά της πέστροφας, με τα επίπεδα των ορμονών. Σε απόκριση κρύου εγκλιματισμού, η μάζα της κοιλίας των αρσενικών ατόμων αυξήθηκε κατά 1,5 φορές ενώ στα θηλυκά δεν υπήρχε καμία μεταβολή. Πιο συγκεκριμένα οι συγγραφείς πρότειναν πως η αύξηση σε μάζα της κοιλίας των αρσενικών ατόμων λόγω του μηχανισμού της υπερτροφίας, επάγεται από τα αυξημένα επίπεδα τεστοστερόνης. Εκτός από τις αποκρίσεις του εγκλιματισμού, προηγούμενες εργασίες σε θηλαστικά και ψάρια έχουν δείξει πως η τεστοστερόνη προκαλεί υπερτροφία των μυών ενώ τα οιστρογόνα την αποτρέπουν (Behrendt 1977, Schaible *et al.* 1984, Davie and Thorarensen 1997, Pelzer *et al.* 1997, van Eickels *et al.* 2001, Babiker *et al.* 2002). Παράλληλα, στα σολομοειδή και σε άλλα είδη ψαριών, η αναπαραγωγική ωρίμανση της καρδιάς των αρσενικών έχει δείξει να συμπίπτει με την αύξηση της κοιλίας σε όγκο (Clark and Rodnick 1998, Gamperl and Farrell 2004, Farrell *et al.* 2009).

Στην παρούσα εργασία, οι διαφυλετικές διαφορές στον όγκο και στο σχήμα της καρδιάς θα μπορούσαν να εξηγηθούν εν μέρει από τη δράση της τεστοστερόνης σε συνδυασμό με τη θερμοκρασία ανάπτυξης στην καρδιά των αρσενικών ατόμων. Η επίδραση των στεροειδών θα μπορούσε επίσης να εξηγήσει την πλαστική απόκριση του σχήματος της κοιλίας των αρσενικών ατόμων τα οποία σε απόκριση της θερμοκρασίας ανάπτυξης προβάλλουν μεγαλύτερη ευαισθησία αλλαγής του προτύπου σχήματος της καρδιάς λόγω του μηχανισμού της υπερτροφίας.

Σε επίπεδο λειτουργικής σημασίας, αν και η μείωση του λόγου VL/VD στα αρσενικά συσχετίστηκε με μείωση της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης στις αντίστοιχες θερμοκρασίες, στα θηλυκά δε παρατηρήθηκε η ίδια απόκριση σχήματος. Παράλληλα, ενώ τα θηλυκά άτομα των 32 °C εμφάνισαν σημαντικά πιο μακρόστενη κοιλία από τα αρσενικά της ίδιας θερμοκρασιακής συνθήκης, είχαν χαμηλότερη κολυμβητική επίδοση. Συμπεραίνεται λοιπόν, πως οι πλαστικές αποκρίσεις της καρδιάς και της κολύμβησης των ενθλίκων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από το φύλο και τη συνεπίδραση που αυτό έχει με τον παράγοντα της θερμοκρασίας για τον καθορισμό των λειτουργικών χαρακτήρων. Η φυλο-εξαρτώμενη επίδραση της θερμοκρασίας στα αποτελέσματα της κολυμβητικής ικανότητας περιγράφεται και επεξηγείται αναλυτικά στο περαιτέρω κεφάλαιο (§ 4.3).

Ως προς τη λειτουργία της καρδιάς στο zebrafish, οι Wang *et al.* (2017), πρότειναν πως σε σύγκριση με τα αρσενικά άτομα, τα θηλυκά είχαν χαμηλότερη δύναμη διαστολής το οποίο και υποδηλώνει πως η πλήρωση με αίμα εξαρτάται περισσότερο από τη συστολή του κόλπου και λιγότερο από την κοιλιακή διαστολή. Η λειτουργική αυτή διαφοροποίηση της καρδιάς των αρσενικών έναντι των θηλυκών zebrafish υποδεικνύει πως τα δύο φύλα πιθανώς ακολουθούν διαφορετικές στρατηγικές ως προς την απόκρισή της καρδιάς έναντι της θερμοκρασίας, γεγονός που θα μπορούσε να προσφέρει μια πιθανή αιτιολογία της καλύτερης κολυμβητικής απόδοσης των αρσενικών στους 32 °C.

Μελλοντικά, απομένει να διερευνηθεί περαιτέρω ο φυλετικός διμορφισμός χαρακτήρων του zebrafish έναντι της θερμοκρασία ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, θα είχε ενδιαφέρον να εξεταστούν η δομή και η σύσταση των κολυμβητικών μυών και η ανατομία των βραγχίων για κάθε φύλο έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης. Παράλληλα, με την εξέταση και άλλων χαρακτήρων που συμμετέχουν στην κολύμβηση (σχήμα σώματος, καρδιά, μεταβολισμός, μεριστικοί χαρακτήρες) θα μπορέσει να εξιχνιαστεί ο βαθμός συμμετοχής τους στην κολυμβητική ικανότητα και ο φυλο-εξαρτώμενος καθορισμός της.

4.3 Φαινοτυπική πλαστικότητα και φυλετικός διμορφισμός της κολυμβητικής ικανότητας

Για την περαιτέρω μελέτη των αποτελεσμάτων της ανατομίας της καρδιάς του zebrafish έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης, πραγματοποιήθηκαν πειράματα κολύμβησης προκειμένου να ελεγχθεί η υπόθεση ότι ο λόγος VL/VD συνδέεται με την αερόβια άσκηση (§ 1.7, Εισαγωγή).

Στα ιχθύδια, ένα μήνα μετά από την παραμονή σε κοινές συνθήκες, η θερμοκρασία ανάπτυξης δεν επέδρασε σημαντικά στις τιμές της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα του σχήματος σώματος αποκάλυψαν έντονη διαφοροποίηση των ατόμων που αναπτύχθηκαν στους 32 °C σε σχέση με τα άτομα των 24 και 28 °C. Η πιο βαθιά κοιλία του σχήματος στους 24 °C σε σχέση με τους 32 °C θα μπορούσε να επεξηγήσει κατά ένα μέρος την έλλειψη στατιστικής

σημαντικότητας στην κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης των ιχθυδίων που μεγάλωσαν σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Στα ενήλικα, η θερμοκρασιακή πλαστικότητα της κολύμβησης εκφράστηκε και στα δύο φύλα. Τα αρσενικά άτομα που μεγάλωσαν στους 32 °C είχαν μειωμένη κολυμβητική επίδοση σε σχέση με τους 24 °C κατά 16%, ενώ τα θηλυκά των 32 °C είχαν χαμηλότερες τιμές και από τους 24 °C αλλά και από τους 28 °C κατά 25% και 30% αντίστοιχα. Η διαφοροποίηση στις τιμές της κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης των ενηλίκων συσχετίστηκε με τα αποτελέσματα του σχήματος σώματος. Στα αρσενικά, τα άτομα των 24 °C διαφοροποιήθηκαν από τα άτομα των 32 °C, ενώ στα θηλυκά, παρουσιάστηκε το ίδιο ακριβώς πρότυπο διαφοροποίησης του σχήματος σώματος με την κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης, όπου τα θηλυκά των 32 °C διέφεραν σημαντικά και από τα θηλυκά των 24 °C και από τα θηλυκά των 32 °C.

Η επίδραση του φύλου αποδείχτηκε σημαντική σε όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες με τα αρσενικά να επιτυγχάνουν υψηλότερες τιμές κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης έναντι των θηλυκών (αυξημένη RU_{crit} κατά 16% στους 24 °C, κατά 7% στους 28 °C και κατά 26% στους 32 °C). Η φυλετική διαφοροποίηση εκφράστηκε και από την εμφανώς πιο διογκωμένη κοιλιά των θηλυκών η οποία διαμορφώνει σε μεγάλο μέρος την κινητική της κολύμβησης.

Στο λαβράκι, οι Koumoundouros *et al.* (2009) εξέτασαν την επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην κολύμβηση και τη σύσταση των μυών του αμερικάνικου λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*). Παρατήρησαν πως τα ψάρια που αναπτύχθηκαν στους 15 °C είχαν αυξημένη κολυμβητική ικανότητα και κόκκινους μύες σε σχέση με τα ψάρια που αναπτύχθηκαν στους 20 °C. Σε αντίθεση με την παρούσα εργασία, οι τελευταίοι έλαβαν τις μετρήσεις της κρίσιμης ταχύτητας σε τέσσερις διαφορετικές θερμοκρασίες άσκησης, μετά από την παραμονή των πληθυσμών σε κοινές συνθήκες για περίπου ένα μήνα. Παράλληλα, τα αποτελέσματα τους αφορούν σε πληθυσμούς ιχθυδίων ενώ στην παρούσα εργασία αποδείχτηκε η θερμοκρασιακή πλαστικότητα της κολύμβησης σε ενήλικα άτομα.

Η θερμοκρασιακή απόκριση της κολύμβησης, έχει μελετηθεί και σε επίπεδο εγκλιματισμού. Στο zebrafish, οι Little *et al.* (2013) βρήκαν ότι σε απάντηση κρούου εγκλιματισμού, μέσω της δράσης της ορμόνης του θυρεοειδούς, αυξάνει ο μέγιστος μεταβολικός ρυθμός καθώς και η κολυμβητική επίδοση.

Στο zebrafish, η σχέση της θερμοκρασίας ανάπτυξης με την κολυμβητική ικανότητα έχει μελετηθεί εκτενώς σε σχέση με τη σύσταση των κολυμβητικών μυών (Scott and Johnston 2012), το σχήμα σώματος (Sfakianakis *et al.* 2011) και το φύλο (Leris *et al.* 2013). Οι Scott and Johnston (2012), μέτρησαν την κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης του zebrafish για να υπολογίσουν τη δυνατότητα εγκλιματισμού του σε διαφορετικές θερμοκρασίες άσκησης αλλά δεν παρατήρησαν σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην RU_{crit} των ψαριών που εγκλιματίστηκαν στους 27 °C. Παρόλα αυτά, έδειξαν ότι η επίδοση σε νερά χαμηλής (22 °C) ή υψηλής

θερμοκρασίας (34 °C) διαφοροποιήθηκε ανάλογα με τη θερμοκρασία ανάπτυξης. Αυτές οι διαφορές σχετίστηκαν μερικώς με την ποικιλία των μυϊκών ινών που συνθέτουν τους μύες της κολύμβησης. Σε αντίθεση με την παρούσα εργασία, οι Scott and Johnston (2012) επιδράσανε μόνο κατά την εμβρυική ανάπτυξη του zebrafish ενώ δεν εξέτασαν την επίδραση του φύλου. Οι Sfakianakis *et al.* (2011), έδειξαν πως αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης από τους 22 στους 31 °C προκάλεσε σημαντική αύξηση της ταχύτητας κολύμβησης των ιχθυδίων. Οι τελευταίοι, επιδράσανε μόνο μέχρι το στάδιο της εκκόλαψης με διαφορετικές θερμοκρασίες εξετάζοντας μόνο την επίδρασή της στο στάδιο του ιχθυδίου.

Εκτός από τις όποιες διαφορές μεταξύ του πειραματικού σχεδιασμού των παραπάνω εργασιών με την παρούσα (όπως οι οντογενετικές περιόδους έκθεσης των διαφορετικών θερμοκρασιών, ή η μη φυλετική ανάλυση των αποτελεσμάτων και το διαφορετικό οντογενετικό στάδιο μελέτης), τα αποτελέσματα της κολύμβησης της παρούσας εργασίας υποστηρίζονται από τα ευρήματα της απόκρισης της καρδιάς των αρσενικών ατόμων. Η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (U_{crit}) έχει αποδειχτεί ότι αποτελεί δείκτη καρδιακής παροχής (Gallaughner *et al.* 1995, Farrell 2002, Claireaux *et al.* 2005) και οι μέχρι τώρα σχετικές εργασίες έχουν εστιάσει στη σημασία της μορφολογίας της καρδιάς στην αερόβια κολύμβηση (Farrell 2002, Claireaux *et al.* 2005, Farrell 2007, Hicken *et al.* 2011). Συγκεκριμένα, η πιο κυκλική κοιλία έχει αποδειχτεί στο παρελθόν να σχετίζεται με μειωμένη κολυμβητική ικανότητα στο zebrafish (Hicken *et al.* 2011) αλλά και στην πέστροφα (Claireaux *et al.* 2005) (§1.3.3, Εισαγωγή). Στην παρούσα εργασία, η αντίστοιχη αύξηση της RU_{crit} στις χαμηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης συνδέθηκε με σημαντικές αλλαγές στη δομή της καρδιάς των αρσενικών ατόμων αλλά όχι των θηλυκών.

Ως προς το φυλετικό διμορφισμό της πλαστικής απόκρισης της κολύμβησης έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης, οι Leris *et al.* (2013), έδειξαν πως αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης από τους 22 °C στους 31 °C προκαλεί σημαντική αύξηση της ταχύτητας κολύμβησης των αρσενικών ατόμων, ενώ δεν επηρεάζει σημαντικά την ταχύτητα κολύμβησης των θηλυκών. Σύμφωνα με την ίδια εργασία, τα αρσενικά αποδείχθηκαν σημαντικά ταχύτεροι κολυμβητές από τα θηλυκά άτομα, αλλά μόνο στους 31 °C θερμοκρασία ανάπτυξης. Σε αντίθεση με την παρούσα εργασία, οι Leris *et al.* (2013) εφάρμοσαν τις διαφορετικές συνθήκες για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (100 μέρες μετά την εκκόλαψη) ενώ η θερμοκρασία άσκησης ήταν στους 26,5 °C.

Η επίδραση του φύλου στους μηχανισμούς κίνησης και κολύμβησης (locomotor performance) έχει εντοπιστεί και σε άλλα είδη ψαριών και εξώθερμων οργανισμών (Plaut 2002, Winne and Hopkins 2006) εκφράζοντας τις διαφορετικές στρατηγικές και πρότυπα διαβίωσης των δύο φύλων (π.χ. αναπαραγωγή, μετανάστευση, καταμερισμός ενέργειας). Πιο συγκεκριμένα, η θερμοκρασιακά ελεγχόμενη πλαστικότητα της κολύμβησης, οι μεταβολικές ανάγκες, καθώς και η κληρονομικότητα αυτών των χαρακτήρων, έχουν βρεθεί να διαφοροποιούνται σε αρσενικά και θηλυκά guppies (*Poecilia reticulata*) (Le Roy *et al.* 2017). Στο zebrafish, οι Conradsen and McGuigan (2015) διερεύνησαν πως οι διαφορές στο

σχήμα σώματος των δύο φύλων σχετίζονται με την κολυμβητική τους ικανότητα. Πρότειναν πως στα δύο φύλα, η ταχύτητα κολύμβησης επηρεάζεται με διαφορετικό τρόπο, από διαφορετικούς μεριστικούς χαρακτήρες (π.χ ύψος ουραίου πτερυγίου στα αρσενικά άτομα). Παράλληλα πρότειναν, πως η διαφορετική συσχέτιση αυτών των χαρακτήρων με την κολύμβηση συνδέεται με τις αναπαραγωγικές στρατηγικές του κάθε φύλου (π.χ. στα θηλυκά άτομα ο καταμερισμός της ενέργειας γίνεται με διαφορετικό τρόπο από ότι στα αρσενικά, ώστε να επενδύεται μεγάλο μέρος της στην κάλυψη των μεταβολικών αναγκών των ωοθηκών). Στο σολομό, τα αρσενικά χρησιμοποιούν λιγότερη ενέργεια για τη ωρίμανση των γονάδων από τα θηλυκά άτομα (Diana and Mackay 1979, Rljnsdorj and Ibelings 1989) υποδεικνύοντας τις φυλο-εξαρτώμενες διαφοροποιήσεις των προτύπων διαβίωσης των δύο φύλων στα ψάρια, ως προς τον καταμερισμό της ενέργειας.

Όπως και σε πολλά άλλα είδη ψαριών, το zebrafish χαρακτηρίζεται από έντονο φυλετικό διμορφισμό σε χαρακτήρες όπως το σχήμα σώματος (Georga and Koumoundouros 2010), το μεταβολισμό (Robison *et al.* 2008), και τη συμπεριφορά (Spence *et al.* 2008). Η πλαστική απόκριση της κολύμβησης των θηλυκών ατόμων έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης μπορεί επομένως να οφείλεται στις πλαστικές αποκρίσεις άλλων χαρακτήρων (π.χ. σχήμα σώματος) που διαμορφώνουν την κινητική της κολύμβησης και που έχουν διαφορετικά πρότυπα απόκρισης στη θερμοκρασία ανάπτυξης έναντι των αρσενικών ατόμων. Στην παρούσα εργασία, ο αριθμός των δειγμάτων για τη μελέτη του σχήματος σώματος δεν ήταν επαρκής ώστε να διαμορφωθούν συμπαγή συμπεράσματα ως προς τα αποτελέσματα του σχήματος σώματος. Σύμφωνα με τους Georga and Koumoundouros (2010), zebrafish που μεγάλωσαν σε χαμηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης (22 °C) είχαν έντονη σχηματική διαφοροποίηση σώματος σε σχέση με τα άτομα που μεγάλωσαν στους 28 και στους 32 °C (διαφοροποίηση ως προς τα ραχιαία, τα εδρικά και τα ουραία πτερύγια) ενώ ο παράγοντας του φύλου επέδρασε σημαντικά ως προς την υδροδυναμική του σώματος, επιβεβαιώνοντας την έντονη διογκωμένη κοιλία των θηλυκών ατόμων έναντι των αρσενικών.

Ένας άλλος χαρακτήρας που μπορεί να ευθύνεται για τη διαφορετική διαμόρφωση της κινητικής των δύο φύλων είναι το μέγεθος της κοιλίας της καρδιάς. Στην παρούσα εργασία, το μεγαλύτερο μέγεθος της κοιλίας των αρσενικών ατόμων (VeV) θα μπορούσε να εξηγήσει κατά ένα μέρος τις υψηλότερες κολυμβητικές επιδόσεις τους έναντι των θηλυκών στους 24 και στους 28 °C. Καθώς η μάζα της κοιλίας είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την καρδιακή παροχή (Castro *et al.* 2013) είναι πολύ πιθανό οι διαφορές στον όγκο των δύο φύλων να καθορίζουν και αυτές τις διαφορές στην κολύμβησης.

Αν και η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην ταχύτητα κολύμβησης περιορίστηκε μόνο στα ενήλικα, στα ιχθυόδια η ύπαρξη μιας ανάλογης τάσης με αυτήν των αρσενικών ατόμων δεν μπορεί να παραληφθεί. Η μεγαλύτερη διογκωμένη κοιλία του σχήματος σώματος των ιχθυιδίων θα μπορούσε να δικαιολογήσει εν μέρει τη μη ύπαρξη διαφορών στην κολυμβητική ικανότητα.

Σε σχέση με τα αποτελέσματα ως προς την ανατομία της καρδιάς, στην παρούσα εργασία, προκειμένου να αποφύγουμε τις πιθανές αποκρίσεις λόγω εγκλιματισμού της κολύμβησης των ιχθυδίων και ενήλικων zebrafish, μεσολάβησε χρόνος παραμονής στις κοινές συνθήκες ίσως με ένα μήνα για τα ιχθύδια και τρεις, για τα ενήλικα (διάστημα που έχει προταθεί από προηγούμενες εργασίες ως κατάλληλο για την αποφυγή των αποκρίσεων του εγκλιματισμού (Claireaux *et al.* 2007, Koumoundouros *et al.* 2009, Scott and Johnston 2012). Αντίθετα, η καρδιά των ιχθυδίων εξετάστηκε στο τέλος της εφαρμογής των κοινών συνθηκών γεγονός που εξηγεί εν μέρει τη μη συσχέτιση του λόγου VL/VD με την κολύμβηση των ιχθυδίων στις διαφορετικές συνθήκες.

Μια άλλη πιθανή εξήγηση της μη σημαντικής επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης των ιχθυδίων είναι η φυλετική διαφοροποίηση. Τα zebrafish γίνονται αναπαραγωγικά ώριμα σε ηλικία περίπου 3 μηνών, αν και η διαφοροποίηση των γονάδων ξεκινά από τις 21-23 dpf (Uchida *et al.* 2002, Rodríguez-Marí *et al.* 2010). Αυτό σημαίνει πως τα ιχθύδια που εξετάστηκαν είχαν ήδη, βάσει μήκους, καθορισμένο φύλο, με εκφρασμένα δευτερογενή φυλετικά χαρακτηριστικά τα οποία μπορεί να επιδράσανε στα αποτελέσματα της καρδιάς. Μια άλλη πιθανή εξήγηση της μη σημαντικής επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην κολύμβηση των ιχθυδίων είναι η οντογενετική απόκριση των διαφορών. Το γεγονός δηλαδή της ύπαρξης κάποιων διαφορών στο στάδιο του ιχθυδίου (ως προς την κολύμβηση) και της μεγιστοποίησής αυτών στο ενήλικο στάδιο.

Μια πιθανή πρόταση για περαιτέρω διερεύνηση των αποτελεσμάτων, θα ήταν η ανάλυση να γίνει με βάση και τον παράγοντα του φύλου στα ιχθύδια. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με τη βοήθεια της ποσοτικής έκφρασης συγκεκριμένων φυλετικά καθοριζόμενων γονιδίων-δεικτών που έχουν ήδη μελετηθεί κατά την έναρξη της διαφοροποίησης των γονάδων (π.χ. *sox9a*, *dmrt1*, *fig alpha*, *cyp19a1a*, (Jørgensen *et al.* 2008). Μια άλλη πρόταση θα ήταν η ανάπτυξη ενός εξολοκλήρου αρσενικού πληθυσμού, με γενετικό knock-out του γονιδίου *cyp19a1a* των γεννητόρων, το οποίο βάση της προϋπάρχουσας βιβλιογραφίας προκαλεί αρρενοποίηση όλων των απογόνων (Lau *et al.* 2016).

4.4 Μηχανισμοί εγκαθίδρυσης της πλαστικότητας της καρδιάς στο zebrafish

Με βάση τα αποτελέσματα της αλλομετρικής αύξησης (§3.2.5.2, Αποτελέσματα) δείχθηκε πως οι μεταβολές της καρδιάς των αρσενικών ατόμων οφείλονταν στην επίδραση της θερμοκρασίας στην αλλομετρική αύξηση του ύψους της κοιλίας, του μήκους του αρτηριακού βολβού, και του όγκου του αρτηριακού βολβού και της κοιλίας. Στα θηλυκά άτομα αντίστοιχα, οι μεταβολές της καρδιάς οφείλονταν στην επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη αλλομετρική αύξηση του μήκους και του ύψους της κοιλίας, και του όγκου της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού. Πιο αναλυτικά, από τα αποτελέσματα της αλλομετρικής αύξησης γίνεται εμφανές πως τα πρότυπα μεταβολής των χαρακτήρων διαφοροποιούνται με φυλο-εξαρτώμενο τρόπο

για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης ενώ μεταξύ των συνθηκών φαίνεται πως το πρότυπο της αλλομετρίας (αρνητική, ίση, θετική) επηρεάζεται άμεσα από την ίδια τη θερμοκρασία ανάπτυξης.

Σε κυτταρικό/βιοχημικό επίπεδο, έχει βρεθεί πως αλλαγές στο σχήμα και το μέγεθος των κυττάρων κατά την οντογένεση ρυθμίζουν το σχήμα της καρδιάς κάτω από τη δράση των περιβαλλοντικών παραγόντων. Συγκεκριμένα, κατά την οντογένεση του zebrafish, μηχανικές/αιμοδυναμικές δυνάμεις όπως η ένταση της ροής του αίματος (Hove *et al.* 2003) και η συσταλτικότητα των κυττάρων (Bartman *et al.* 2004) επηρεάζουν το σχήμα της καρδιάς. Η ροή του αίματος, μέσω της αιμοδυναμικής πίεσης, ρυθμίζει την κυτταρική επιμήκυνση και αύξηση των κυττάρων της εξωτερικής κοιλότητας της κοιλίας (outer curvature, OC) η οποία έχει μεγάλο ρόλο στη διαμόρφωση του τελικού σχήματος της καρδιάς (Auman *et al.* 2007). Επιπρόσθετα στο zebrafish, γονίδια όπως το *nppa* (natriuretic peptide precursor a) και το *myh7* (ventricular myosin heavy chain gene, *vmhc*) έχουν αναγνωριστεί να συμμετέχουν στη διαμόρφωση του σχήματος της καρδιάς μέσω της ρύθμισης της ροής του αίματος (Yelon and Stainier 1999, Berdough *et al.* 2003, Huang *et al.* 2003).

Ένας άλλος μηχανισμός που προτείνεται για τις παρατηρούμενες μεταβολές της ανατομίας της καρδιάς του zebrafish είναι μέσω των άμεσων επιδράσεων της θερμοκρασίας στις φυσιολογικές/βιοχημικές ιδιότητες της καρδιάς. Μια από τις επιδράσεις αυτές είναι ο καρδιακός ρυθμός. Τα ψάρια επιδεικνύουν αλλαγές στον καρδιακό τους ρυθμό έναντι των θερμοκρασιακών διακυμάνσεων (Gollock *et al.* 2006, Clark *et al.* 2008). Αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τις ανάγκες σε O₂ μεταβάλλοντας τη λειτουργία της καρδιάς (έστω στα ενήλικα στάδια) (Pelster 1999). Συγκεκριμένα, στο zebrafish, αύξηση της θερμοκρασίας έχει συνδεθεί με αύξηση των καρδιακών παλμών (Barrionuevo and Burggren 1999). Στην πέστροφα, με την πτώση της θερμοκρασίας η καρδιά αποκτά βραδυκαρδία λόγω της μεγαλύτερης διάρκειας της διαστολής (ενώ η διάρκεια της συστολής δεν επηρεάζεται) (Keen *et al.* 1993, Badr *et al.* 2016). Η προσαρμογή αυτή έχει ως στόχο την αύξηση της καρδιακής παροχής ως εξισορρόπηση στη μειωμένη από τη θερμοκρασία, καρδιακή συσταλτικότητα (Shiels *et al.* 2002, Vornanen *et al.* 2005). Παράλληλα, η πτώση της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση του ιξώδους του αίματος το οποίο έχει άμεση επίδραση στη ροή του αίματος καθώς επηρεάζονται παράμετροι όπως η αντίσταση των αγγείων και η ποσότητα του αίματος που αντλείται (cardiac load) (Graham and Fletcher 1985, Graham and Farrell 1989). Οι άμεσες επιδράσεις αυτές της θερμοκρασίας έχουν συνδεθεί στο παρελθόν με τη ρύθμιση της οντογένεσης της καρδιάς και συγκεκριμένα με τη μορφογένεση των χώρων, τη δημιουργία των βαλβίδων και τη δημιουργία των δοκίδων του μυοκαρδίου κοιλίας (Glickman and Yelon 2002, Kalogirou *et al.* 2014)

Σε μοριακό επίπεδο, η απόκριση αρκετών γονιδίων εμπλεκόμενων στο μεταβολισμό και τη σύσταση των μυών έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης. Οι (Schnurr *et al.* 2014) πρότειναν πως η θερμοκρασία ανάπτυξης έχει μόνιμες επιδράσεις στα μεταβολικά ένζυμα των μυών κολύμβησης επηρεάζοντας τις

μεταβολικές ιδιότητες τους. Σε απόκριση κρύου εγκλιματισμού στο zebrafish, οι (Scott and Johnston 2012) πρότειναν πως αλλάζουν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων εμπλεκόμενων στο μεταβολισμό, τη μυϊκή σύσπαση και την αγγειογένεση. Ως προς την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της καρδιάς της πέστροφας, οι (Keen *et al.* 2015) πρότειναν πως σε απόκριση κρύου εγκλιματισμού, αυξάνουν τα επίπεδα έκφρασης κάποιων γονιδίων δεικτών αύξησης της καρδιάς (π.χ. της βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης της κοιλίας VMHC, του νατριουρητικού πεπτιδίου τύπου ANP και της RCAN1 μέλος του σηματοδοτικού μονοπατιού του υπετροφικού δείκτη NFAT).

Στην παρούσα εργασία, προκειμένου να διαλευκάνουμε τις πρώιμες μοριακές μεταβολές που έλαβαν μέρος κατά το τέλος της επίδρασης των διαφορετικών συνθηκών εξετάσαμε τη γονιδιακή έκφραση πέντε γονιδίων που εμπλέκονται στην αναδιαμόρφωση της καρδιάς. Προκειμένου να διαλευκανθεί αν τα αποτελέσματα αυτά ήταν αποκρίσεις του εγκλιματισμού, η έκφραση των ίδιων γονιδίων εξετάστηκε και 20 μέρες μετά από εγκλιματισμό στις κοινές συνθήκες των 28 °C. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η έκφραση του *nppa* (natriuretic peptide precursor a), δείκτη πολλαπλασιασμού των κυττάρων και μορφογένεσης της καρδιάς (Bakkers 2011, Sergeeva and Christoffels 2013), του *nfatc1* (nuclear factor of activated T cells), βασικού μεταγραφικού παράγοντα του μηχανισμού της υπερτροφίας (Schulz and Yutzey 2004), της *actb2* (*actin, beta 2,*) (συστατικό του κυτταροσκελετού πολλών κατηγοριών κυττάρων, ενώ στην περίπτωση των μυϊκών κυττάρων συμμετέχει άμεσα και στη διαδικασία της μυϊκής συστολής), καθώς και του *myh7* (myosin heavy chain 7) και του *mybpc3* (myosin binding protein C), δομικών γονιδίων εμπλεκόμενων στη ρύθμιση της συσταλτικότητας της καρδιάς (England and Loughna 2013, Yalcin *et al.* 2016).

Τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης έδειξαν σημαντική υπερ-έκφραση όλων των υπό εξέταση γονιδίων (εκτός του *nfatc1*) στο τέλος της εφαρμογής των διαφορετικών συνθηκών, με σημαντική υπερ-έκφραση στους 24 °C. Μετά από 20 μέρες εγκλιματισμού στις κοινές συνθήκες οι διαφορές για τα γονίδια *nppa*, *myh7* και *actinb2*, εξομαλύνθηκαν. Αντίθετα, η σχετική έκφραση των γονιδίων *nfatc1* και *mybpc3*, αυξήθηκε σημαντικά στους 28 °C μετά από εγκλιματισμό στις κοινές συνθήκες.

Η υπερ-έκφραση των περισσότερων γονιδίων στο τέλος των διαφορετικών συνθηκών υποδεικνύει μια απόκριση εγκλιματισμού στο κρύο. Στην εργασία τους, οι (Klaiman *et al.* 2014) απέδειξαν πως σε απόκριση κρύου εγκλιματισμού στην πέστροφα αυξάνει η συσταλτικότητα της καρδιάς, λόγω της τροποποίησης της έκφρασης συσταλτικών μυϊκών πρωτεϊνών. Στην παρούσα εργασία, η υπερ-έκφραση των τεσσάρων γονιδίων στο τέλος των διαφορετικών συνθηκών στους 24 °C επιδεικνύει μια τάση για αύξηση της συσταλτικότητας της καρδιάς, ως αντιστάθμιση είτε στο αυξημένο ιξώδες του αίματος, είτε στη μειωμένη συσταλτική δύναμη της καρδιάς λόγω χαμηλής θερμοκρασίας. Η αντιστάθμιση αυτή αντανακλάται και από

την αύξηση του μεγέθους της κοιλίας στους 24 °C στο συγκεκριμένο στάδιο (§3.2.2, Αποτελέσματα).

Στο δεύτερο υπό εξέταση στάδιο παρατηρείται μια γενικότερη αύξηση της έκφρασης όλων των γονιδίων σε όλες τις θερμοκρασίες, πιθανώς λόγω της επίδρασης του οντογενετικού σταδίου, ενώ η εξομάλυνση των αρχικών διαφορών (του πρώτου σταδίου) ενισχύει την υπόθεση ότι οι αρχικές γονιδιακές αλλαγές που έλαβαν μέρος ήταν πιθανότατα προϊόν εγκλιματισμού. Παράλληλα, η υψηλή έκφραση του *nfatc1* και του *mybrc3* στους 28 °C πιθανότατα συνδέεται με θερμοκρασιακά-εξαρτώμενες αποκρίσεις της γονιδιακής έκφρασης έναντι των επιδράσεων του εγκλιματισμού. Τα ψάρια που μεγάλωσαν στους 28 °C και στη συνέχεια εγκλιματίστηκαν στην ίδια θερμοκρασία, έδειξαν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στους 28 °C πιθανόν λόγω της παραμονής τους στις ίδιες συνθήκες στις οποίες μεγάλωσαν.

Μια άλλη περίπτωση της αλλαγής του προτύπου απόκρισης της γονιδιακής έκφρασης στο δεύτερο υπό εξέταση στάδιο είναι ο φυλοκαθορισμός. Στο δεύτερο στάδιο σε ηλικία ~ 50dpf (μετά από 20 μέρες παραμονής στις κοινές συνθήκες) το φύλο στο zebrafish έχει ήδη καθοριστεί χωρίς να είναι όμως εμφανή τα δευτερογενή χαρακτηριστικά, καθώς η διαφοροποίηση των γονάδων ξεκινά από τις 21-23 dpf (Uchida *et al.* 2002). Οπότε είναι πολύ πιθανό, τα αποτελέσματα του δεύτερου σταδίου να εκφράζουν την απόκριση και των δύο φύλων.

Αν και μετά τη λήξη των διαφορετικών συνθηκών οι διαφοροποιήσεις στην έκφραση των γονιδίων άλλαξαν πρότυπο, οι γονιδιακές αλλαγές που έλαβαν μέρος μέχρι το στάδιο της μεταμόρφωσης (τέλος διαφορετικών συνθηκών, ~ 12 - 14mm SL) καθόρισαν πολλά από τα χαρακτηριστικά και τις λειτουργίες των μετέπειτα σταδίων. Σύμφωνα με τους (Gupta and Poss 2012) η οντογένεση της καρδιάς στο zebrafish έχει ολοκληρωθεί μέχρι τις 30 dpf στο στάδιο του ιχθυδίου, υποδεικνύοντας τη σημαντικότητα της επίδρασης της θερμοκρασίας κατά το στάδιο αυτό.

Οι γονιδιακές αλλαγές που έλαβαν χώρο κατά τα πρώτα οντογενετικά στάδια μπορεί να είναι και προϊόν επιγενετικών τροποποιήσεων μέσω της μεθυλίωσης του DNA. Στα ψάρια, ο προγραμματισμός της οντογένεσης ξεκινά μετά τη γονιμοποίηση και ολοκληρώνεται κατά την εμβρυογένεση (Jiang *et al.* 2013, Potok *et al.* 2013). Στο zebrafish, αύξηση της θερμοκρασίας κατά 7,5 °C κατά τη διάρκεια αυτής της ευαίσθητης περιόδου επέδρασε στην έκφραση των DNA-μεθυλτρανσφερασών χωρίς όμως να αλλάζουν τα επίπεδα μεθυλίωσης (Dorts *et al.* 2016). Οι Anastasiadi *et al.* (2017) πρότειναν πως αύξηση της θερμοκρασίας κατά 2 °C σε νύμφες λαβρακιού μπορεί να επιφέρει τροποποιήσεις στη μεθυλίωση και την έκφραση γονιδίων εμπλεκόμενων στις αποκρίσεις του stress, και στην οντογένεση των μυών και των οργάνων. Οι τελευταίοι είδαν πως η δράση αυτή της θερμοκρασίας ανάπτυξης εξαρτάται από το στάδιο κατά το οποίο θα γίνει η επίδραση, αλλά και από το αν τα ψάρια είχαν προηγουμένως εγκλιματιστεί σε άλλες θερμοκρασίες. Τα ευρήματα αυτά επιδεικνύουν πως η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης κατά τα πρώτα κυρίως στάδια των ψαριών μπορεί να προκαλέσει μόνιμες επιγενετικές αλλαγές στο

γονιδιώμά τους. Τα στάδια αυτά επομένως θεωρούνται κρίσιμα οντογενετικά παράθυρα για την επιβίωση των ψαριών σε ένα πληθυσμιακό επίπεδο.

Ένα βήμα παραπέρα της μελέτης της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην έκφραση των γονιδίων που συμμετέχουν στην αναδιαμόρφωση της καρδιάς θα ήταν να διερευνηθεί το πότε ακριβώς λαμβάνουν χώρα οι γονιδιακές αυτές τροποποιήσεις. Τα επόμενα πειράματα θα μπορούσαν να περιορίσουν την επίδραση των διαφορετικών θερμοκρασιακών συνθηκών μόνο στο εμβρυικό στάδιο ώστε να εντοπιστούν τα κρίσιμα οντογενετικά παράθυρα κατά τα οποία λαμβάνουν μέρος οι μόνιμες αλλαγές στο σχήμα της καρδιάς των ενηλίκων σε μοριακό επίπεδο.

4.5 Θερμοκρασιακή πλαστικότητα των αναπαραγωγικών χαρακτήρων στο zebrafish

Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκαν δύο ξεχωριστά πειράματα μελέτης της γονιμότητας του zebrafish, στα οποία όμως το πρότυπο της επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης ήταν επαναλήψιμο αλλά δεν επιβεβαιώθηκε στατιστικά. Ως προς το σύνολο των αβγών, τα αποτελέσματα της δεύτερης πειραματικής επανάληψης έδειξαν πως τα θηλυκά που αναπτύχθηκαν στις χαμηλότερες θερμοκρασίες (24 °C) παρουσίασαν υψηλότερες τιμές συνολικού αριθμού αβγών από τα θηλυκά που αναπτύχθηκαν στους 32 °C. Στην πρώτη πειραματική επανάληψη, τα ευρήματα αυτά δε διαπιστώθηκαν στατιστικά ενώ υπήρχε μια ανάλογη τάση (§3.5, Αποτελέσματα).

Από τους αναπαραγωγικούς χαρακτήρες τους οποίους έχει βρεθεί να επηρεάζει σημαντικά η θερμοκρασία ανάπτυξης είναι ο φυλοκαθορισμός. Στο zebrafish, οι Sfakianakis *et al.* (2011) πρότειναν πως μείωση της θερμοκρασίας ανάπτυξης (22 °C) προκαλεί αρρενοποίηση του πληθυσμού σε ποσοστό 87,1%, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες ανάπτυξης (31 °C) το 82,4% του πληθυσμού ήταν θηλυκά, υποδεικνύοντας τη θερμο-εξαρτώμενη ρύθμιση του φύλου στο zebrafish (TSD, Temperature-dependent sex determination). Τα αποτελέσματα των Sfakianakis *et al.* (2011) έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα των (Uchida *et al.* 2004) οι οποίοι επέδρασαν με πολύ υψηλές θερμοκρασίες (28,5, 35 και 37 °C) κατά την περίοδο της φυλετικής διαφοροποίησης (15-25 dph) προκαλώντας 0%, 68,8% και 100% αρρενοποίηση αντίστοιχα, σε γενετικά-καθορισμένα θηλυκά άτομα. Τις διαφορές τις απέδωσαν στη εφαρμογή ακραίων θερμοκρασιών εκτός του φυσιολογικού θερμοκρασιακού εύρους του zebrafish, και στα διαφορετικά οντογενετικά παράθυρα της έκθεσης στη θερμοκρασία ανάπτυξης. Οι Sfakianakis *et al.* (2011) πρότειναν πως το zebrafish ανήκει στη δεύτερη κατά τους Ospina-Álvarez and Piferrer (2008) κατηγορία θερμο-εξαρτώμενου φυλετικού καθορισμού, όπου χαμηλές θερμοκρασίες προκαλούν αρρενοποίηση και υψηλές θερμοκρασίες θηλυκοποίηση του πληθυσμού, αποτελώντας το μοναδικό ψάρι που έχει μελετηθεί μέχρι τώρα που να ακολουθεί αυτό το πρότυπο.

Οι Pavlidis *et al.* (2000) μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στο λαβράκι, και πρότειναν πως ανήκει στην ίδια κατηγορία θερμο-εξαρτώμενου φυλοκαθορισμού με τους περισσότερους τελεόστεους, όπου το ποσοστό των αρσενικών αυξάνει σε υψηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης (Conover and Kynard 1981, Baroiller *et al.* 1999). Συγκεκριμένα έδειξαν πως ανάπτυξη μέχρι τη μεταμόρφωση σε χαμηλές θερμοκρασίες (13 ή 15 °C) προκαλεί θηλυκοποίηση του πληθυσμού ενώ οι υψηλότερες θερμοκρασίες (20 °C) οδήγησαν σε μεγαλύτερο ποσοστό αρσενικών ατόμων. Σε μοριακό επίπεδο, οι Navarro-Martín *et al.* (2011) πρότειναν πως η αρρενοποίηση των ιχθυδίων λαβρακίου σε απόκριση των υψηλών θερμοκρασιών ανάπτυξης οφείλεται στη μεθυλίωση και αποσιώπηση του φυλοκαθοριστικού γονιδίου *cyp19a1a*. Αντίστοιχα, οι Díaz and Piferrer (2015) έδειξαν πως κατά την αρρενοποίηση των θηλυκών, λαμβάνουν μέρος επιγενετικές αλλαγές του γοναδικού μεταγραφώματος οι οποίες καθορίζουν τη μετέπειτα σεξουαλική διαφοροποίηση και την αναλογία του φύλου σε πληθυσμιακό επίπεδο.

Εκτός του φυλετικού καθορισμού, η πλαστική απόκριση άλλων αναπαραγωγικών χαρακτήρων έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης έχει γίνει αντικείμενο μελέτης εργασιών στο παρελθόν. Στο σολομό, οι Jonsson *et al.* (2014) έδειξαν πως ανάπτυξη σε υψηλή θερμοκρασία κατά την εμβρυογένεση οδήγησε σε παραγωγή μεγαλύτερων αβγών και γοναδικής μάζας στην ενηλικίωση. Παρόλα αυτά, δε διαπίστωσαν διαφορές στην ηλικία πρώτης ωρίμανσης ή στη γονιμότητα. Την έλλειψη πλαστικότητας ως προς τη γονιμότητα (αριθμός αβγών) την απέδωσαν στον εξολοκλήρου γενετικά-καθοριζόμενο προγραμματισμό του αριθμού ωοκυττάρων. Σε απόκριση της υπερθέρμανσης του πλανήτη, τα οικολογικά μοντέλα που πρότειναν οι Holt and Jorgensen (2014) προέβλεψαν πως μελλοντικά θα αυξηθεί η γονιμότητα του σολομού (μέσω αύξησης του γοναδικού βάρους και της γοναδικής λειτουργίας) με την προϋπόθεση όμως ότι η διαθεσιμότητα τροφής θα παραμείνει σταθερή.

Σε απόκριση εγκλιματισμού, η δια-γενεακή πλαστικότητα της αναπαραγωγής έχει μελετηθεί και αυτή σε πλήθος εργασιών. Οι Donelson *et al.* (2014) πρότειναν πως στο *Acanthochromis polyacanthus* (tropical reef fish) σε απόκριση θερμοκρασιακού εγκλιματισμού (1,5 °C) είναι δυνατή η βελτίωση της αναπαραγωγικής ικανότητας της επόμενης γενεάς. Οι αντίστοιχες αποκρίσεις δεν διαπιστώθηκαν όταν οι τελευταίοι αυξήσανε τη θερμοκρασία κατά 3 °C, υποδεικνύοντας τα πιθανά θερμικά όρια του αναπαραγωγικού εγκλιματισμού του είδους. Την προσαρμογή αυτή την απέδωσαν στη θερμοκρασιακή ρύθμιση του ενδοκρινικού συστήματος μέσω της τροποποίησης των ορμονών και των στεροειδών που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή (Kraak and Pankhurst 1997, Pankhurst and Munday 2011). Στο ίδιο είδος, οι Donelson *et al.* (2016) απέδειξαν πως η δια-γενεακή πλαστικότητα της αναπαραγωγής εξαρτάται από το ρυθμό αύξησης της θερμοκρασίας με την πάροδο των γενεών. Συγκεκριμένα, βρήκαν πως σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια δύο γενεών (αύξηση κατά +1,5 °C στην πρώτη γενεά και κατά + 3 °C στη δεύτερη, οδήγησε σε μεγαλύτερη πλαστικότητα των αναπαραγωγικών χαρακτηριστικών (π.χ. η ποιότητα

των απογόνων) σε σχέση με τα ψάρια που είχαν την ίδια αύξηση θερμοκρασίας αλλά σε μια μόνο γενεά.

Συμπεραίνεται λοιπόν πως οι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην αναπαραγωγή των ψαριών υπόκεινται στην πλαστική επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης προκειμένου να ανταπεξέλθουν στις μεταβαλλόμενες συνθήκες. Στην παρούσα εργασία, η μελέτη της θερμοκρασιακής απόκρισης της γονιμότητας είχε ως στόχο τη συσχέτιση των αποτελεσμάτων με τα αποτελέσματα της θερμοκρασιακής πλαστικότητας της καρδιάς και της κολύμβησης προκειμένου να αποκτηθεί μια ολιστική προσέγγιση ως προς τις μόνιμες μεταβολές της φυσιολογίας και λειτουργίας του zebrafish. Συγκεκριμένα η παραγωγή αβγών αποτελεί πολύ σημαντική παράμετρο που επηρεάζει τον καταμερισμό της ενέργειας και τις πλαστικές διαφοροποιήσεις έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης των δύο φύλων. Στην παρούσα εργασία, τα αποτελέσματα δεν επιβεβαίωσαν την πλαστική απόκριση της γονιμότητας των θηλυκών ατόμων μεταξύ των δύο πειραματικών επαναλήψεων. Μελλοντικά, απομένει η επανάληψη των πειραμάτων σε συνδυασμό με την μελέτη κάποιων ιστολογικών χαρακτήρων των θηλυκών γονάδων όπως του σταδίου και του αριθμού των ωοκυττάρων. Παράλληλα, με την τεχνική του micro-ct θα μπορούσε να γίνει υπολογισμός του όγκου των γονάδων και πως αυτός διαφοροποιείται με τη θερμοκρασία ανάπτυξης.

4.6 Σημασία των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας για τους φυσικούς πληθυσμούς

Στα πλαίσια της κλιματικής αλλαγής η θερμοκρασία του πλανήτη έχει αυξηθεί κατά 1,1 °C από το τέλος του 19^{ου} αιώνα ενώ προβλέπεται να αυξηθεί κατά 0,2 °C μέσα στις επόμενες δύο δεκαετίες χάρη στην έκθεση του διοξειδίου του άνθρακα και άλλων ανθρωπογενών ρύπων που διαχέονται στην ατμόσφαιρα (εκτίμηση του 2013 της Διακυβερνητικής Επιτροπής για την Αλλαγή του Κλίματος, IPCC). Η υπερθέρμανση του πλανήτη, έχει αντίκτυπο στην παγκόσμια βιοποικιλότητα καθώς επηρεάζει τη φυσιολογία των ατόμων (Somero 2010) και τη διασπορά των πληθυσμών (Poloczanska *et al.* 2013). Σε αυτά τα πλαίσια, επιστρατεύονται μηχανισμοί οι οποίοι σε απόκριση των περιβαλλοντικών διακυμάνσεων βοηθούν στην επιβίωση των οργανισμών (Thomas *et al.* 2004, Heller and Zavaleta 2009, Schulte *et al.* 2011). Τα τελευταία χρόνια, το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας έχει επικεντρωθεί στις πλαστικές αποκρίσεις των οργανισμών έναντι της θερμοκρασίας, για να κατανοήσει τον τρόπο με τον οποίο οι οργανισμοί αποκρίνονται στην υπερ-θέρμανση του πλανήτη (Pigliucci *et al.* 2006).

Τα ψάρια αποτελούν μια ομάδα εξώθερμων οργανισμών που επιδεικνύει μεγάλου βαθμού πλαστικότητα ως προς τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Σε αυτά, η κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης χρήζει μεγάλης οικολογικής σημασίας καθώς καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τη μετανάστευση, τη κολύμβηση αλλά και τη λήψη τροφής (Reidy *et al.* 2000, Plaut 2001). Έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης, ένα πλήθος χαρακτήρων έχει μελετηθεί στα ψάρια που διαμορφώνουν την κινητική της

κολύμβησης, όπως το σχήμα σώματος, οι μύες, οι μεριστικοί χαρακτήρες και τα πτερύγια (Johnston 2006, Georgakopoulou *et al.* 2007, Georga and Koumoundouros 2010, Conradsen and McGuigan 2015). Παρά της σύνδεσης της ανατομίας της καρδιάς των ιχθύων με την καρδιακή παροχή και την κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης (Claireaux *et al.* 2005, Farrell 2007, Hicken *et al.* 2011), από όσο γνωρίζουμε, δεν έχει υπάρξει καμία μελέτη μέχρι τώρα, που να συσχετίζει τη θερμοκρασιακή πλαστικότητα της κολύμβησης με την καρδιά των ιχθύων. Παράλληλα, η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη μελέτη επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην ανατομία της καρδιάς των ενήλικων zebrafish, επιδεικνύοντας τις μόνιμες επιδράσεις της θερμοκρασίας στην καρδιά των ιχθύων. Οι μέχρι τώρα εργασίες έχουν εστιάσει στην επίδραση της θερμοκρασίας στην οντογένεση της καρδιάς (Barrionuevo and Burggren 1999, Schonweger *et al.* 2000, Perrichon *et al.* 2017), και στους μηχανισμούς που επιστρατεύονται για τη διατήρηση της καρδιακής λειτουργίας εν όψει των θερμοκρασιακών εποχικών διακυμάνσεων (Gamperl and Farrell 2004, Farrell *et al.* 2009, Klaiman *et al.* 2011, Keen *et al.* 2015).

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας αποδεικνύουν τη φύλο-εξαρτώμενη επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην καρδιά και στην κολυμβητική ικανότητα του zebrafish. Συγκεκριμένα αποδείχτηκε πως η πλαστική απόκριση του σχήματος της καρδιάς των αρσενικών ατόμων συνδέεται με μειωμένη κολυμβητική ικανότητα σε υψηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης. Στα θηλυκά, η καρδιά δεν εμφάνισε πλαστική απόκριση του σχήματος, ενώ η μειωμένη κολυμβητική ικανότητα στις υψηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης συνδέθηκε με την αλλαγή των υπόλοιπων χαρακτήρων που συμμετέχουν στην κινητική της κολύμβησης (σχήμα σώματος, μύες, μεριστικοί χαρακτήρες, κλπ).

Φαίνεται λοιπόν πως η απόκριση της καρδιάς των δύο φύλων έναντι της θερμοκρασίας ανάπτυξης διαφέρει σημαντικά, επιδεικνύοντας διαφορετικά πρότυπα διαβίωσης και λειτουργίας σε απάντηση της κλιματικής αλλαγής. Όπως φαίνεται από την παρούσα εργασία, στο zebrafish, τα αρσενικά άτομα είναι πιο ευάλωτα στην επίδραση της θερμοκρασίας ως προς την ανατομία της καρδιάς, γεγονός που μπορεί να έχει ως οικολογική συνέπεια πιθανές αλλαγές στην αναλογία φύλου του πληθυσμού (δεδομένου της διαφορετικής απόκρισης της καρδιάς των αρσενικών).

Πέρα των πλαστικών αποκρίσεων της καρδιάς οι οποίες αποδεικνύουν την μόνιμη επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης, οι παρατηρούμενες μεταβολές της καρδιάς των ιχθυδίων χρήζουν και αυτές μεγάλης οικολογικής σημασίας. Το περιβάλλον διαβίωσης κατά το νυμφικό στάδιο των ψαριών στη στήλη του νερού αποτελεί κρίσιμης σημασίας παράγοντα για την εγκατάσταση τους στο υπόστρωμα (settlement), τη μεταμόρφωση της νύμφης σε νεαρό άτομο και τη στρατολόγηση (recruitment) του πληθυσμού (Houde 1989, Rijnsdorp *et al.* 2009). Συγκεκριμένα, το στάδιο της μεταμόρφωσης χαρακτηρίζεται από έντονες αλλαγές στην αύξηση, τη μορφολογία, και τη συμπεριφορά της πλειονότητας των βενθοπελαγικών ιχθύων, οι οποίες είναι καθοριστικές για την επιβίωση των ατόμων και τη δομή των φυσικών πληθυσμών (Fuiman and Werner 2002).

Τα αναπτυσσόμενα ψάρια έχουν στενότερα θερμικά όρια από τα ενήλικα, γεγονός που τα καθιστά ιδιαίτερα ευάλωτα στις θερμοκρασιακές αλλαγές του περιβάλλοντός τους (Pelster 1999, Pörtner *et al.* 2001, Rijnsdorp *et al.* 2009). Η ευαισθησία των πρώιμων οντογενετικών σταδίων στη θερμοκρασία είναι απόρροια του μικρού τους μεγέθους, της μη ολοκληρωμένης μορφολογικής και φυσιολογικής ανάπτυξης, του υψηλού μεταβολικού τους ρυθμού και της χαμηλής ικανότητας του για μετανάστευση (Schultz 2010). Η καρδιά των ψαριών είναι το πρώτο όργανο που σχηματίζεται και λειτουργεί (Bakkers 2011) με αποτέλεσμα μικρές μεταβολές του σχήματος ή της λειτουργίας της καρδιάς στα πρώιμα στάδια να επηρεάζουν σημαντικά την ανάπτυξη και την επιβίωση του πληθυσμού.

Για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας, η επιλογή του zebrafish ως κατάλληλου πειραματόζωου αποδεικνύεται και από προηγούμενες εργασίες. Οι Hicken *et al.* (2011) επέλεξαν το zebrafish για να μελετήσουν την επίδραση των πετρελαιοειδών στην ανατομία της καρδιάς και στην κολυμβητική του ικανότητα. Οι τελευταίοι απέδειξαν πως η παρατηρούμενες αλλαγές του σχήματος ήταν προϊόν αλλαγής του οντογενετικού προτύπου και όχι χαρακτηριστικό μόνο του συγκεκριμένου είδους. Παράλληλα, το zebrafish, αποτελεί ένα είδος συνεχόμενης κολύμβησης με πυραμιδικό σχήμα κοιλίας κατάλληλο για μετρήσεις αλλαγής σχήματος (Santer *et al.* 1983, Sanchez-Quintana and Hurlle 1987, Hu *et al.* 2000). Επιπρόσθετα, και άλλα χαρακτηριστικά, όπως ο μικρός χρόνος γενεάς, το αποκωδικοποιημένο γονιδίωμα, η δυνατότητα μελέτης μεταλλαγμένων ή και διαγονιδιακών σειρών, καθώς και η ευαισθησία των πρώιμων οντογενετικών σταδίων καθιστούν το zebrafish κατάλληλο οργανισμό για τη μελέτη της φαινοτυπικής πλαστικότητας.

Εκτός από τα ψάρια, η θερμοκρασιακή πλαστικότητα της μετακίνησης εμφανίζεται και σε άλλους εξώθερμους οργανισμούς όπως στα ερπετά και στα αμφίβια (Elphick 1998, Amiel *et al.* 2014, Pezaro *et al.* 2017). Παράλληλα, τα αποτελέσματά μας θα μπορούσαν να αφορούν στις πλαστικές αποκρίσεις και πληθυσμών εκτός των ιχθύων, δίνοντας έτσι μια πιο ολιστική προσέγγιση στις πιθανές αποκρίσεις της κλιματικής αλλαγής στην καρδιά των εξώθερμων οργανισμών του πλανήτη.

5. Συμπεράσματα

- Η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στο σχήμα της κοιλίας των ιχθυδίων και των αρσενικών ατόμων. Η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 24 στους 32 °C συσχετίστηκε με περισσότερο κυκλική κοιλία κατά 22% στα αρσενικά και κατά 10% στα ιχθύδια.
- Στους υπό εξέταση μορφομετρικούς χαρακτήρες καθώς και στα πρότυπα μεταβολής τους κατά την ανάπτυξη, η επίδραση της θερμοκρασίας αποδείχτηκε φυλο-εξαρτώμενη. Από τους σημαντικότερους παράγοντες όπου το φύλο επέδρασε σημαντικά, ήταν το σχήμα της κοιλίας (VL/VD), το μήκος του αρτηριακού βολβού (BaL/SL) και ο σχετικός όγκος της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού (VeV/SL, BulV/SL).
- Στα ιχθύδια, σημειώθηκαν σημαντικές αλλά αναστρέψιμες αποκρίσεις (εγκλιματισμός) και άλλων χαρακτήρων της καρδιάς έναντι της θερμοκρασίας. Η αύξηση της θερμοκρασίας ανάπτυξης συσχετίστηκε με μείωση του μήκους του αρτηριακού βολβού, του όγκου της κοιλίας, του όγκου του αρτηριακού βολβού, καθώς και του όγκου του μυοκαρδίου. Επίσης, με αύξηση της γωνίας μεταξύ της κοιλίας και του αρτηριακού βολβού.
- Η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στην κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης των ενήλικων zebrafish. Τα αρσενικά που μεγάλωσαν στους 32 °C είχαν σημαντικά μικρότερη κρίσιμη ταχύτητα κολύμβησης σε σχέση με τα αρσενικά που μεγάλωσαν στους 24 °C. Τα θηλυκά που μεγάλωσαν στους 32 °C είχαν συγκριτικά μικρότερη ταχύτητα κολύμβησης από τα θηλυκά των 28 °C και από τα θηλυκά των 32 °C.
- Η επίδραση του φύλου αποδείχτηκε σημαντική σε όλες τις υπό εξέταση θερμοκρασίες με τα αρσενικά να επιτυγχάνουν υψηλότερες τιμές κρίσιμης ταχύτητας κολύμβησης έναντι των θηλυκών (αυξημένη RU_{crit} κατά 16% στους 24 °C, κατά 7% στους 28 °C και κατά 26% στους 32 °C).
- Στα ιχθύδια, η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης δεν αποδείχτηκε σημαντική αν και δεν μπορεί να παραβληθεί η ύπαρξη μια ανάλογης τάσης με των ενηλίκων.
- Στο τέλος της εφαρμογής των διαφορετικών συνθηκών τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στη μορφογένεση της καρδιάς παρουσίασαν σημαντική υπερέκφραση στους 24 °C (υπερέκφραση των *nppa*, *myh7*, *myhrc3*, *actin*). Μετά από 20 μέρες εγκλιματισμού στις κοινές συνθήκες (28 °C) οι περισσότερες από τις διαφορές εξομαλύνθηκαν ενώ παρατηρήθηκε υπερέκφραση των *nfat* και *mybpc3* στους 28 °C.

- Τα αποτελέσματα του σχήματος του σώματος απέδειξαν πως η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στο σχήμα σώματος του zebrafish. Στα ιχθύδια, τα άτομα που μεγάλωσαν στους 32 °C διαφοροποιήθηκαν σημαντικά από τις υπόλοιπες θερμοκρασίες με χαρακτηριστικό πιο επίμηκες σώμα και λιγότερο διογκωμένη κοιλιακή περιοχή. Στα αρσενικά, τα άτομα των 24 °C διαφοροποιήθηκαν σημαντικά από τα άτομα των 28 και 32 °C με χαρακτηριστική πιο διογκωμένη κοιλία, ενώ τα θηλυκά των 32 °C διαφοροποιήθηκαν σημαντικά από τα άτομα των 24 και 28 °C (πιο υδροδυναμικό σχήμα στη συνθήκη των 32 °C).
- Η θερμοκρασία ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στη σχετική γονιμότητα των θηλυκών της πρώτης πειραματικής επανάληψης. Ο συνολικός αριθμός των αβγών ανά μονάδα βάρους των θηλυκών των 24 °C ήταν σημαντικά υψηλότερος σε σχέση με τα θηλυκά των 32 °C. Στις χαμηλές θερμοκρασίες ανάπτυξης η σχετική γονιμότητα του zebrafish αυξήθηκε κατά 40%.

III. Βιβλιογραφία

- Agrawal, A. A. (2001). "Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species." *Science* **294**(5541): 321.
- Allen, R. M., Y. M. Buckley and D. J. Marshall (2008). "Offspring size plasticity in response to intraspecific competition: an adaptive maternal effect across life-history stages." *Am Nat* **171**(2): 225-237.
- Amiel, J. J., T. Lindstrom and R. Shine (2014). "Egg incubation effects generate positive correlations between size, speed and learning ability in young lizards." *Animal cognition* **17**(2): 337-347.
- Ampatzis, K. and C. Dermon (2016). Sexual dimorphisms in swimming behavior, cerebral metabolic activity and adrenoceptors in adult zebrafish (*Danio rerio*).
- Anastasiadi, D., N. Díaz and F. Piferrer (2017). Small ocean temperature increases elicit stage-dependent changes in DNA methylation and gene expression in a fish, the European sea bass.
- Anderson, M. and T. Willis (2003). Canonical analysis of principal coordinates: A useful method of constrained ordination for ecology.
- Anderson, M. J. and J. Robinson (2003). "Generalized discriminant analysis based on distances." *Australian & New Zealand Journal of Statistics* **45**(3): 301-318.
- Angilletta, M. J. (2009). *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*.
- Anway, M. D., A. S. Cupp, M. Uzumcu and M. K. Skinner (2005). "Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility." *Science* **308**(5727): 1466-1469.
- Auman, H. J., H. Coleman, H. E. Riley, F. Olale, H. J. Tsai and D. Yelon (2007). "Functional modulation of cardiac form through regionally confined cell shape changes." *PLoS Biology* **5**(3): 0604-0615.
- Ayala, M. D., O. Lopez-Albors, F. Gil, R. Latorre, J. M. Vazquez, A. Garcia-Alcazar, E. Abellan, G. Ramirez and F. Moreno (2000). "Temperature effect on muscle growth of the axial musculature of the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)." *Anat Histol Embryol* **29**(4): 235-241.
- Babiker, F. A., L. J. De Windt, M. van Eickels, C. Grohe, R. Meyer and P. A. Doevendans (2002). "Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function." *Cardiovascular Research* **53**(3): 709-719.
- Badr, A., M. F. El-Sayed and M. Vornanen (2016). "Effects of seasonal acclimatization on temperature dependence of cardiac excitability in the roach, *Rutilus rutilus*." *J Exp Biol* **219**(Pt 10): 1495-1504.
- Bagatto, B. (2005). "Ontogeny of cardiovascular control in zebrafish (*Danio rerio*): effects of developmental environment." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **141**(4): 391-400.
- Bailey, J. R. and W. R. Driedzic (1990). "Enhanced maximum frequency and force development of fish hearts following temperature acclimation." *Journal of Experimental Biology* **149**(1): 239.
- Baker, J., W. Cresko, S. A Foster and D. Heins (2005). Life-history differentiation of benthic and limnetic ecotypes in a polytypic population of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*).
- Bakkers, J. (2011). "Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease." *Cardiovascular Research* **91**(2): 279-288.

- Baroiller, J.-F., Y. Guiguen and A. Fostier (1999). "Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish." *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **55**(6): 910-931.
- Barrett, R. D. H., Paccard, A., Healy, T. M, Bergek, S., Schulte, P. M., Schluter, D., & Rogers, S. M. (2011). Rapid evolution of cold tolerance in stickleback. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **278**(1703): 233–238.
- Barrionuevo, W. R. and W. W. Burggren (1999). "O₂ consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O₂." *Am J Physiol* **276**(2 Pt 2): R505-513.
- Bartman, T., E. C. Walsh, K.-K. Wen, M. McKane, J. Ren, J. Alexander, P. A. Rubenstein and D. Y. R. Stainier (2004). "Early Myocardial Function Affects Endocardial Cushion Development in Zebrafish." *PLOS Biology* **2**(5): e129.
- Bateson, P. and P. Gluckman (2012). "Plasticity and robustness in development and evolution." *International Journal of Epidemiology* **41**(1): 219-223.
- Beamish, F. W. H. (1979). *Swimming Capacity Fish physiology*. Academic Press, New York.
- Behrendt, H. (1977). "Effect of anabolic steroids on rat heart muscle cells." *Cell and Tissue Research* **180**(3): 303-315.
- Beis, D., T. Bartman, S. W. Jin, I. C. Scott, L. A. D'Amico, E. A. Ober, H. Verkade, J. Frantsve, H. A. Field, A. Wehman, H. Baier, A. Tallafuss, L. Bally-Cuif, J. N. Chen, D. Y. Stainier and B. Jungblut (2005). "Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development." *Development* **132**(18): 4193-4204.
- Beldade, P., A. R. A. Mateus and R. A. Keller (2011). "Evolution and molecular mechanisms of adaptive developmental plasticity." *Molecular Ecology* **20**(7): 1347-1363.
- Berdougo, E., H. Coleman, D. H. Lee, D. Y. Stainier and D. Yelon (2003). "Mutation of weak atrium/atrial myosin heavy chain disrupts atrial function and influences ventricular morphogenesis in zebrafish." *Development* **130**(24): 6121-6129.
- Blaxter, J. H. S. (1991). "The Effect of Temperature On Larval Fishes." *Netherlands Journal of Zoology* **42**(2): 336-357.
- Blaxter, J. H. S. and G. Hempel (1963). "The Influence of Egg Size on Herring Larvae (*Clupea harengus* L.)." *ICES Journal of Marine Science* **28**(2): 211-240.
- Braendle, C., G. K. Davis, J. A. Brisson and D. L. Stern (2006). "Wing dimorphism in aphids." *Heredity* **97**: 192.
- Brakefield, P. M., J. Pijpe and B. J. Zwaan (2007). "Developmental plasticity and acclimation both contribute to adaptive responses to alternating seasons of plenty and of stress in *Bicyclus* butterflies." *Journal of Biosciences* **32**(3): 465-475.
- Braun, M. H., R. W. Brill, J. M. Gosline and D. R. Jones (2003). "Form and function of the bulbous arteriosus in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): dynamic properties." *J Exp Biol* **206**(Pt 19): 3327-3335.
- Brett, J. R. (1964). "The Respiratory Metabolism and Swimming Performance of Young Sockeye Salmon." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **21**(5): 1183-1226.
- Bunnell, D. B., T. S. E. and R. A. Stein (2007). "Prey resources before spawning influence gonadal investment of female, but not male, white crappie." *Journal of Fish Biology* **70**(6): 1838-1854.
- Castro, V., B. Grisdale-Helland, S. J. Helland, J. Torgersen, T. Kristensen, G. Claireaux, A. P. Farrell and H. Takle (2013). "Cardiac Molecular-Acclimation Mechanisms in Response to Swimming-Induced Exercise in Atlantic Salmon." *PLoS ONE* **8**(1): e55056.
- Chambers, R. C. and W. C. Leggett (1987). "Size and Age at Metamorphosis in Marine Fishes: An Analysis of Laboratory-Reared Winter Flounder (*Pseudopleuronectes*

- americanus) with a Review of Variation in Other Species." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **44**(11): 1936-1947.
- Chang, C. P., J. R. Neilson, J. H. Bayle, J. E. Gestwicki, A. Kuo, K. Stankunas, I. A. Graef and G. R. Crabtree (2004). "A field of myocardial-endocardial NFAT signaling underlies heart valve morphogenesis." *Cell* **118**(5): 649-663.
- Christopher, M., N. W. Tomara, B. Brian and B. G. M. Francisco (2005). "Developmental Environment Alters Conditional Aggression in Zebrafish." *Copeia* **2005**(4): 901-908.
- Claireaux, G., C. Couturier and A. L. Groison (2006). "Effect of temperature on maximum swimming speed and cost of transport in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)." *Journal of experimental biology* **209**(Pt 17): 3420-3428.
- Claireaux, G., C. Handelsman, E. Standen and J. A. Nelson (2007). "Thermal and temporal stability of swimming performance in the European sea bass." *Physiol Biochem Zool* **80**(2): 186-196.
- Claireaux, G., D. J. McKenzie, A. G. Genge, A. Chatelier, J. Aubin and A. P. Farrell (2005). "Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout." *J Exp Biol* **208**(Pt 10): 1775-1784.
- Clark, R. J. and K. J. Rodnick (1998). "Morphometric and biochemical characteristics of ventricular hypertrophy in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *J Exp Biol* **201**(Pt 10): 1541-1552.
- Clark, T. D., E. Sandblom, G. K. Cox, S. G. Hinch and A. P. Farrell (2008). "Circulatory limits to oxygen supply during an acute temperature increase in the Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **295**(5): R1631-1639.
- Clarke, K. and R. N. Gorley (2006). *PRIMER v6: user manual/tutorial*. PRIMER-E, Plymouth.
- Conover, D. O. and B. E. Kynard (1981). "Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish." *Science* **213**(4507): 577-579.
- Conradsen, C. and K. McGuigan (2015). "Sexually dimorphic morphology and swimming performance relationships in wild-type zebrafish *Danio rerio*." *J Fish Biol* **87**(5): 1219-1233.
- Corti, M., A. Loy and S. Cataudella (1996). Form changes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Moronidae: Teleostei), after acclimation to freshwater: An analysis using shape coordinates.
- Crozier, L. G. and J. A. Hutchings (2014). "Plastic and evolutionary responses to climate change in fish." *Evolutionary Applications* **7**(1): 68-87.
- Davie, P. S. and A. P. Farrell (1991). "The coronary and luminal circulations of the myocardium of fishes." *Canadian Journal of Zoology* **69**(7): 1993-2001.
- Davie, P. S. and H. Thorarensen (1997). "Heart Growth in Rainbow Trout in Response to Exogenous Testosterone and 17- α Methyltestosterone." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **117**(2): 227-230.
- Davies, P. R., I. Hanyu, K. Furukawa and M. Nomura (1986). "Effect of temperature and photoperiod on sexual maturation and spawning of the common carp: III. Induction of spawning by manipulating photoperiod and temperature." *Aquaculture* **52**(2): 137-144.
- Debat, V. and P. David (2001). "Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability." *Trends in Ecology & Evolution* **16**(10): 555-561.
- Descamps, E., A. Sochacka, B. De Kegel, D. Van Loo, L. Van Hoorebeke and D. Adriaens (2014). "Soft tissue discrimination with contrast agents using micro-CT scanning." *Belgian Journal of Zoology* **144**(1): 20-40.

- Dhillon, R. S. and P. M. Schulte (2011). "Intraspecific variation in the thermal plasticity of mitochondria in killifish." *J Exp Biol* **214**(Pt 21): 3639-3648.
- Diana, J. S. and W. C. Mackay (1979). "Timing and Magnitude of Energy Deposition and Loss in the Body, Liver, and Gonads of Northern Pike (*Esox lucius*)." *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* **36**(5): 481-487.
- Díaz, N. and F. Piferrer (2015). "Lasting effects of early exposure to temperature on the gonadal transcriptome at the time of sex differentiation in the European sea bass, a fish with mixed genetic and environmental sex determination." *BMC Genomics* **16**(1): 679.
- Donelson, J. M., M. I. McCormick, D. J. Booth and P. L. Munday (2014). "Reproductive Acclimation to Increased Water Temperature in a Tropical Reef Fish." *PLoS ONE* **9**(5): e97223.
- Donelson, J. M., M. Wong, D. J. Booth and P. L. Munday (2016). "Transgenerational plasticity of reproduction depends on rate of warming across generations." *Evolutionary Applications* **9**(9): 1072-1081.
- Donelson, J. M., P. L. Munday, M. I. McCormick, N. W. Pankhurst and P. M. Pankhurst (2010). "Effects of elevated water temperature and food availability on the reproductive performance of a coral reef fish." *Marine Ecology Progress Series* **401**: 233-243.
- Dorts, J., E. Falisse, E. Schoofs, E. Flamion, P. Kestemont and F. Silvestre (2016). "DNA methyltransferases and stress-related genes expression in zebrafish larvae after exposure to heat and copper during reprogramming of DNA methylation." *Scientific Reports* **6**: 34254.
- Driedzic, W. R., J. R. Bailey and D. H. Sephton (1996). "Cardiac adaptations to low temperature in non-polar teleost fish." *Journal of Experimental Zoology* **275**(2-3): 186-195.
- Dudley, S. A. and J. Schmitt (1996). "Testing the Adaptive Plasticity Hypothesis: Density-Dependent Selection on Manipulated Stem Length in *Impatiens capensis*." *The American Naturalist* **147**(3): 445-465.
- Duncan, E. J., P. D. Gluckman and P. K. Dearden (2014). "Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype?" *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **322**(4): 208-220.
- Dyer, A. R., C. S. Brown, E. K. Espeland, J. K. McKay, H. Meimberg and K. J. Rice (2010). "The role of adaptive trans-generational plasticity in biological invasions of plants." *Evolutionary Applications* **3**(2): 179-192.
- Edmunds, R. C., J. A. Gill, D. H. Baldwin, T. L. Linbo, B. L. French, T. L. Brown, A. J. Esbaugh, E. M. Mager, J. Stieglitz, R. Hoenig, D. Benetti, M. Grosell, N. L. Scholz and J. P. Incardona (2015). "Corresponding morphological and molecular indicators of crude oil toxicity to the developing hearts of mahi mahi." *Scientific Reports* **5**: 17326.
- Elphick, M. (1998). "Longterm effects of incubation temperatures on the morphology and locomotor performance of hatchling lizards (*Bassiana duperreyi*, Scincidae)." *Biological Journal of the Linnean Society* **63**(3): 429-447.
- Engel, K., R. Tollrian and J. M. Jeschke (2011). "Integrating biological invasions, climate change and phenotypic plasticity." *Communicative & Integrative Biology* **4**(3): 247-250.
- England, J. and S. Loughna (2013). "Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart." *Cellular and molecular life sciences* **70**(7): 1221-1239.
- Evans, D. H., A. C. Harrie and M. S. Kozlowski (2003). "Characterization of the effects of vasoactive substances on the bulbus arteriosus of the eel, *Anguilla rostrata*." *J Exp Zool A Comp Exp Biol* **297**(1): 45-51.

- Farrell, A. P. (1991). "From Hagfish to Tuna: A Perspective on Cardiac Function in Fish." *Physiological Zoology* **64**(5): 1137-1164.
- Farrell, A. P. (2002). "Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: insights into cardiovascular design limitations in fishes." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **132**(4): 797-810.
- Farrell, A. P. (2007). "Cardiorespiratory performance during prolonged swimming tests with salmonids: a perspective on temperature effects and potential analytical pitfalls." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **362**(1487): 2017.
- Farrell, A. P. and D. R. Jones (1992). 1 - The Heart. *Fish Physiology*. D. J. R. W.S. Hoar and A. P. Farrell, Academic Press. **Volume 12, Part A**: 1-88.
- Farrell, A. P. and S. M. Clutterham (2003). "On-line venous oxygen tensions in rainbow trout during graded exercise at two acclimation temperatures." *J Exp Biol* **206**(Pt 3): 487-496.
- Farrell, A. P., A. M. Hammons, M. S. Graham and G. F. Tibbits (1988). "Cardiac growth in rainbow trout, *Salmo gairdneri*." *Canadian Journal of Zoology* **66**(11): 2368-2373.
- Farrell, A. P., E. J. Eliason, E. Sandblom and T. D. Clark (2009). "Fish cardiorespiratory physiology in an era of climate change The present review is one of a series of occasional review articles that have been invited by the Editors and will feature the broad range of disciplines and expertise represented in our Editorial Advisory Board." *Canadian Journal of Zoology* **87**(10): 835-851.
- Feinberg, A. P. and R. A. Irizarry (2010). "Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Stochastic epigenetic variation as a driving force of development, evolutionary adaptation, and disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107** **Suppl 1**: 1757-1764.
- Fordyce, J. A. (2006). "The evolutionary consequences of ecological interactions mediated through phenotypic plasticity." *Journal of Experimental Biology* **209**(12): 2377.
- Forsman, A. (2014). "Rethinking phenotypic plasticity and its consequences for individuals, populations and species." *Heredity* **115**: 276.
- Fuiman, L. A. and P. W. Webb (1988). "Ontogeny of routine swimming activity and performance in zebra danios (Teleostei: Cyprinidae)." *Animal Behaviour* **36**(1): 250-261.
- Fuiman, L. A. and R. G. Werner (2002). *Fishery science : the unique contributions of early life stages*. Oxford [etc.], Blackwell Science.
- Fuiman, L. A., K. A. Rose, J. H. Cowan and E. P. Smith (2006). "Survival skills required for predator evasion by fish larvae and their relation to laboratory measures of performance." *Animal Behaviour* **71**(6): 1389-1399.
- Fuiman, L. A., K. R. Poling and D. M. Higgs (1998). "Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes." *Copeia*(3): 602-611.
- Fuiman, L. and R. Batty (1997). "What a drag it is getting cold: partitioning the physical and physiological effects of temperature on fish swimming." *J Exp Biol* **200**(Pt 12): 1745-1755.
- Fusco, G. and A. Minelli (2010). "Phenotypic plasticity in development and evolution: facts and concepts." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**(1540): 547.
- Gallaugher, P., H. Thorarensen and A. P. Farrell (1995). "Hematocrit in oxygen transport and swimming in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." *Respir Physiol* **102**(2-3): 279-292.
- Galloway, T. F., E. Kjorsvik and H. Kryvi (1998). "Effect of temperature on viability and axial muscle development in embryos and yolk sac larvae of the Northeast Arctic cod (*Gadus morhua*)." *Marine Biology* **132**(4): 559-567.

- Gamperl, A. K. and A. P. Farrell (2004). "Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences." *J Exp Biol* **207**(Pt 15): 2539-2550.
- Georga, I. and G. Koumoundouros (2010). "Thermally induced plasticity of body shape in adult zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822)." *J Morphol* **271**(11): 1319-1327.
- Georgakopoulou, E., D. G. Sfakianakis, S. Kouttouki, P. Divanach, M. Kentouri and G. Koumoundouros (2007). "The influence of temperature during early life on phenotypic expression at later ontogenetic stages in sea bass." *Journal of Fish Biology* **70**(1): 278-291.
- Gertz, J., T. E. Reddy, K. E. Varley, M. J. Garabedian and R. M. Myers (2012). "Genistein and bisphenol A exposure cause estrogen receptor 1 to bind thousands of sites in a cell type-specific manner." *Genome research* **22**(11): 2153-2162.
- Glickman, N. S. and D. Yelon (2002). "Cardiac development in zebrafish: coordination of form and function." *Semin Cell Dev Biol* **13**(6): 507-513.
- Gluckman, P. D., M. A. Hanson, H. G. Spencer and P. Bateson (2005). "Environmental influences during development and their later consequences for health and disease: implications for the interpretation of empirical studies." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272**(1564): 671-677.
- Gollock, M. J., S. Currie, L. H. Petersen and A. K. Gamperl (2006). "Cardiovascular and haematological responses of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to acute temperature increase." *J Exp Biol* **209**(Pt 15): 2961-2970.
- Graham, M. S. and A. P. Farrell (1989). "The Effect of Temperature Acclimation and Adrenaline on the Performance of a Perfused Trout Heart." *Physiological Zoology* **62**(1): 38-61.
- Graham, M. S. and G. L. Fletcher (1985). "On the low viscosity blood of two cold water, marine sculpins." *Journal of Comparative Physiology B* **155**(4): 455-459.
- Green, J. (1967). The distribution and variation of *Daphnia lumholtzi* (Crustacea: Cladocera) in relation to fish predation in Lake Albert, East Africa.
- Greer, E. L., T. J. Maures, D. Ucar, A. G. Hauswirth, E. Mancini, J. P. Lim, B. A. Benayoun, Y. Shi and A. Brunet (2011). "Transgenerational epigenetic inheritance of longevity in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **479**: 365.
- Guderley, H. (2004). "Metabolic responses to low temperature in fish muscle." *Biol Rev Camb Philos Soc* **79**(2): 409-427.
- Guderley, H. and I. I. Johnston (1996). "Plasticity of fish muscle mitochondria with thermal acclimation." *J Exp Biol* **199**(Pt 6): 1311-1317.
- Guiguen, Y., A. Fostier, F. Piferrer and C. F. Chang (2010). "Ovarian aromatase and estrogens: a pivotal role for gonadal sex differentiation and sex change in fish." *Gen Comp Endocrinol* **165**(3): 352-366.
- Gupta, V. and K. D. Poss (2012). "Clonally dominant cardiomyocytes direct heart morphogenesis." *Nature* **484**(7395): 479-484.
- Hammer, C. (1995). "Fatigue and exercise tests with fish." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **112**(1): 1-20.
- Haverinen, J. and M. Vornanen (2007). "Temperature acclimation modifies sinoatrial pacemaker mechanism of the rainbow trout heart." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **292**(2): R1023-1032.
- Heller, N. E. and E. S. Zavaleta (2009). "Biodiversity management in the face of climate change: A review of 22 years of recommendations." *Biological Conservation* **142**(1): 14-32.

- Herb, B. R., F. Wolschin, K. D. Hansen, M. J. Aryee, B. Langmead, R. Irizarry, G. V. Amdam and A. P. Feinberg (2012). "Reversible switching between epigenetic states in honeybee behavioral subcastes." *Nature Neuroscience* **15**: 1371.
- Hicken, C. E., T. L. Linbo, D. H. Baldwin, M. L. Willis, M. S. Myers, L. Holland, M. Larsen, M. S. Stekoll, S. D. Rice, T. K. Collier, N. L. Scholz and J. P. Incardona (2011). "Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(17): 7086-7090.
- Hisaoka, K. K. and F. C. Firlit (1962). *Ovarian Cycle and Egg Production in the Zebrafish, Brachydanio rerio*.
- Ho, D. H. and W. W. Burggren (2010). "Epigenetics and transgenerational transfer: a physiological perspective." *J Exp Biol* **213**(1): 3-16.
- Holt, R. E. and C. Jorgensen (2014). "Climate warming causes life-history evolution in a model for Atlantic cod (*Gadus morhua*)." *Conserv Physiol* **2**(1): cou050.
- Houde, E. (1989). *Comparative growth, mortality, and energetics of marine fish larvae: temperature and implied latitudinal effects*.
- Hove, J. R., R. W. Köster, A. S. Forouhar, G. Acevedo-Bolton, S. E. Fraser and M. Gharib (2003). "Intracardiac fluid forces are an essential epigenetic factor for embryonic cardiogenesis." *Nature* **421**: 172.
- Howe, K., M. D. Clark, C. F. Torroja, J. Torrance, C. Berthelot, M. Muffato, J. E. Collins, S. Humphray, K. McLaren, L. Matthews, S. McLaren, I. Sealy, M. Caccamo, C. Churcher, C. Scott, J. C. Barrett, R. Koch, G. J. Rauch, S. White, W. Chow, B. Kilian, L. T. Quintais, J. A. Guerra-Assuncao, Y. Zhou, Y. Gu, J. Yen, J. H. Vogel, T. Eyre, S. Redmond, R. Banerjee, J. Chi, B. Fu, E. Langley, S. F. Maguire, G. K. Laird, D. Lloyd, E. Kenyon, S. Donaldson, H. Sehra, J. Almeida-King, J. Loveland, S. Trevanion, M. Jones, M. Quail, D. Willey, A. Hunt, J. Burton, S. Sims, K. McLay, B. Plumb, J. Davis, C. Clee, K. Oliver, R. Clark, C. Riddle, D. Elliot, G. Threadgold, G. Harden, D. Ware, S. Begum, B. Mortimore, G. Kerry, P. Heath, B. Phillimore, A. Tracey, N. Corby, M. Dunn, C. Johnson, J. Wood, S. Clark, S. Pelan, G. Griffiths, M. Smith, R. Glithero, P. Howden, N. Barker, C. Lloyd, C. Stevens, J. Harley, K. Holt, G. Panagiotidis, J. Lovell, H. Beasley, C. Henderson, D. Gordon, K. Auger, D. Wright, J. Collins, C. Raisen, L. Dyer, K. Leung, L. Robertson, K. Ambridge, D. Leongamornlert, S. McGuire, R. Gilderthorp, C. Griffiths, D. Manthavadi, S. Nichol, G. Barker, S. Whitehead, M. Kay, J. Brown, C. Murnane, E. Gray, M. Humphries, N. Sycamore, D. Barker, D. Saunders, J. Wallis, A. Babbage, S. Hammond, M. Mashreghi-Mohammadi, L. Barr, S. Martin, P. Wray, A. Ellington, N. Matthews, M. Ellwood, R. Woodmansey, G. Clark, J. Cooper, A. Tromans, D. Grafham, C. Skuce, R. Pandian, R. Andrews, E. Harrison, A. Kimberley, J. Garnett, N. Fosker, R. Hall, P. Garner, D. Kelly, C. Bird, S. Palmer, I. Gehring, A. Berger, C. M. Dooley, Z. Ersan-Urun, C. Eser, H. Geiger, M. Geisler, L. Karotki, A. Kirn, J. Konantz, M. Konantz, M. Oberlander, S. Rudolph-Geiger, M. Teucke, C. Lanz, G. Raddatz, K. Osoegawa, B. Zhu, A. Rapp, S. Widaa, C. Langford, F. Yang, S. C. Schuster, N. P. Carter, J. Harrow, Z. Ning, J. Herrero, S. M. Searle, A. Enright, R. Geisler, R. H. Plasterk, C. Lee, M. Westerfield, P. J. de Jong, L. I. Zon, J. H. Postlethwait, C. Nusslein-Volhard, T. J. Hubbard, H. Roest Crollius, J. Rogers and D. L. Stemple (2013). "The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome." *Nature* **496**(7446): 498-503.
- Hu, N. and B. B. Keller (1995). "Relationship of simultaneous atrial and ventricular pressures in stage 16-27 chick embryos." *Am J Physiol* **269**(4 Pt 2): H1359-1362.

- Hu, N., D. Sedmera, H. J. Yost and E. B. Clark (2000). "Structure and function of the developing zebrafish heart." *Anat Rec* **260**(2): 148-157.
- Hu, N., H. J. Yost and E. B. Clark (2001). "Cardiac morphology and blood pressure in the adult zebrafish." *Anat Rec* **264**(1): 1-12.
- Huang, C., F. Sheikh, M. Hollander, C. Cai, D. Becker, P. H. Chu, S. Evans and J. Chen (2003). "Embryonic atrial function is essential for mouse embryogenesis, cardiac morphogenesis and angiogenesis." *Development* **130**(24): 6111-6119.
- Huey, R. B. and R. D. Stevenson (1979). "Integrating Thermal Physiology and Ecology of Ectotherms: A Discussion of Approaches." *American Zoologist* **19**(1): 357-366.
- Huxley, J. S. (1976). "Problems of Relative Growth. Julian S. Huxley." *The Quarterly Review of Biology* **51**: 94-94.
- Icardo, J. M. and A. Fernandez-Teran (1987). "Morphologic study of ventricular trabeculation in the embryonic chick heart." *Acta Anat (Basel)* **130**(3): 264-274.
- Icardo, J. M., E. Colvée, M. C. Cerra and B. Tota (1999). "Bulbus arteriosus of the antarctic teleosts. I. The white-blooded *Chionodraco hamatus*." *Anat Rec* **254**(3): 396-407.
- Incardona, J. P., M. G. Carls, L. Holland, T. L. Linbo, D. H. Baldwin, M. S. Myers, K. A. Peck, M. Tagal, S. D. Rice and N. L. Scholz (2015). "Very low embryonic crude oil exposures cause lasting cardiac defects in salmon and herring." *Scientific Reports* **5**: 13499.
- Incardona, J. P., T. L. Swarts, R. C. Edmunds, T. L. Linbo, A. Aquilina-Beck, C. A. Sloan, L. D. Gardner, B. A. Block and N. L. Scholz (2013). "Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages." *Aquatic Toxicology* **142-143**(Supplement C): 303-316.
- Incardona, J., M. Carls, H. L. Day, C. Sloan, J. Bolton, T. Collier and N. Scholz (2009). Cardiac Arrhythmia Is the Primary Response of Embryonic Pacific Herring (*Clupea pallasii*) Exposed to Crude Oil during Weathering.
- Jiang, L., J. Zhang, J. J. Wang, L. Wang, L. Zhang, G. Li, X. Yang, X. Ma, X. Sun, J. Cai, J. Zhang, X. Huang, M. Yu, X. Wang, F. Liu, C. I. Wu, C. He, B. Zhang, W. Ci and J. Liu (2013). "Sperm, but not oocyte, DNA methylome is inherited by zebrafish early embryos." *Cell* **153**(4): 773-784.
- Johansen, J. L. and G. P. Jones (2011). "Increasing ocean temperature reduces the metabolic performance and swimming ability of coral reef damselfishes." *Global Change Biology* **17**(9): 2971-2979.
- Johansen, K. (1965). "Cardiovascular dynamics in fishes, amphibians, and reptiles." *Ann N Y Acad Sci* **127**(1): 414-442.
- Johnson, A. C., A. J. Turko, J. M. Klaiman, E. F. Johnston and T. E. Gillis (2014). "Cold acclimation alters the connective tissue content of the zebrafish (*Danio rerio*) heart." *J Exp Biol* **217**(Pt 11): 1868-1875.
- Johnston, I. A. (1993). "Temperature influences muscle differentiation and the relative timing of organogenesis in herring (*Clupea harengus*) larvae." *Marine Biology* **116**(3): 363-379.
- Johnston, I. A. (2006). "Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish." *J Exp Biol* **209**(Pt 12): 2249-2264.
- Johnston, I. A. and G. K. Temple (2002). "Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour." *J Exp Biol* **205**(Pt 15): 2305-2322.
- Johnston, I. A. and T. E. Hall (2004). Mechanisms of muscle development and responses to temperature change in fish larvae. The development of form and function in fishes and

- the question of larval adaptation , American Fisheries Society Symp 40: Bethesda , Maryland: 113-144.
- Johnston, I. A., H. T. Lee, D. J. Macqueen, K. Paranthaman, C. Kawashima, A. Anwar, J. R. Kinghorn and T. Dalmay (2009). "Embryonic temperature affects muscle fibre recruitment in adult zebrafish: genome-wide changes in gene and microRNA expression associated with the transition from hyperplastic to hypertrophic growth phenotypes." *J Exp Biol* **212**(Pt 12): 1781-1793.
- Johnston, I. A., V. L. A. Vieira and G. K. Temple (2001). "Functional consequences and population differences in the developmental plasticity of muscle to temperature in Atlantic herring *Clupea harengus*." *Marine Ecology Progress Series* **213**: 285-300.
- Johnston, I. I. and N. Cole (1998). "Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring." *J Exp Biol* **201** (Pt 12): 623-646.
- Johnston, I. I., N. Cole, V. V. Vieira and I. I. Davidson (1997). "Temperature and developmental plasticity of muscle phenotype in herring larvae." *J Exp Biol* **200**(Pt 5): 849-868.
- Jonsson, B. and N. Jonsson (2014). "Early environment influences later performance in fishes." *Journal of Fish Biology* **85**(2): 151-188.
- Jonsson, B., N. Jonsson and A. Finstad (2014). "Linking embryonic temperature with adult reproductive investment in Atlantic salmon *Salmo salar*". *Marine Ecology Progress Series*. **515**: 217-226.
- Jordaan, A., S. E. Hayhurst and L. J. Kling (2006). "The influence of temperature on the stage at hatch of laboratory reared *Gadus morhua* and implications for comparisons of length and morphology." *Journal of Fish Biology* **68**(1): 7-24.
- Jørgensen, A., J. E. Morthorst, O. Andersen, L. J. Rasmussen and P. Bjerregaard (2008). "Expression profiles for six zebrafish genes during gonadal sex differentiation." *Reproductive Biology and Endocrinology* **6**(1): 25.
- Jung, J. H., C. E. Hicken, D. Boyd, B. F. Anulacion, M. G. Carls, W. J. Shim and J. P. Incardona (2013). "Geologically distinct crude oils cause a common cardiotoxicity syndrome in developing zebrafish." *Chemosphere* **91**(8): 1146-1155.
- Kalogirou, S., N. Malissovass, E. Moro, F. Argenton, D. Y. R. Stainier and D. Beis (2014). "Intracardiac flow dynamics regulate atrioventricular valve morphogenesis." *Cardiovascular Research* **104**(1): 49-60.
- Kamler, E. (2002). "Ontogeny of yolk-feeding fish: an ecological perspective." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **12**(1): 79-103.
- Kassahn, K. S., R. H. Crozier, H. O. Pörtner and M. J. Caley (2009). "Animal performance and stress: responses and tolerance limits at different levels of biological organisation." *Biological Reviews* **84**(2): 277-292.
- Keegan, B. R., D. Meyer and D. Yelon (2004). "Organization of cardiac chamber progenitors in the zebrafish blastula." *Development* **131**(13): 3081-3091.
- Keen, A. N., A. J. Fenna, J. C. McConnell, M. J. Sherratt, P. Gardner and H. A. Shiels (2015). "The Dynamic Nature of Hypertrophic and Fibrotic Remodeling of the Fish Ventricle." *Front Physiol* **6**: 427.
- Keen, A. N., J. M. Klaiman, H. A. Shiels and T. E. Gillis (2017). "Temperature-induced cardiac remodelling in fish." *The Journal of Experimental Biology* **220**(2): 147-160.
- Keen, J. E., D. M. Vianzon, A. P. Farrell and G. F. Tibbits (1993). "Thermal acclimation alters both adrenergic sensitivity and adrenoceptor density in cardiac tissue of rainbow trout." *The Journal of Experimental Biology* **181**(1): 27-48.

- Kelly, S. A., T. M. Panhuis and A. M. Stoehr (2011). Phenotypic Plasticity: Molecular Mechanisms and Adaptive Significance. *Comprehensive Physiology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Kendall, A. W., Jr. (1984). "Early life history stages of fishes and their characters." *Ontogeny and systematics of fishes*: 11-22.
- Kennedy, J., P. R. Witthames, R. D. M. Nash and C. J. Fox (2008). "Is fecundity in plaice (*Pleuronectes platessa* L.) down-regulated in response to reduced food intake during autumn?" *Journal of Fish Biology* **72**(1): 78-92.
- Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." *Dev Dyn* **203**(3): 253-310.
- Kinne, O. (1962). "Irreversible nongenetic adaptation." *Comparative Biochemistry and Physiology* **5**(4): 265-282.
- Klaiman, J. M., A. J. Fenna, H. A. Shiels, J. Macri and T. E. Gillis (2011). "Cardiac remodeling in fish: strategies to maintain heart function during temperature Change." *PLoS One* **6**(9): e24464.
- Klaiman, J. M., W. G. Pyle and T. E. Gillis (2014). "Cold acclimation increases cardiac myofilament function and ventricular pressure generation in trout." *J Exp Biol* **217**(Pt 23): 4132-4140.
- Koumoundouros, G., C. Ashton, D. G. Sfakianakis, P. Divanach, M. Kentouri, N. Anthwal and N. C. Stickland (2009). "Thermally induced phenotypic plasticity of swimming performance in European sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles." *Journal of Fish Biology* **74**(6): 1309-1322.
- Koumoundouros, G., D. G. Sfakianakis, P. Divanach and M. Kentouri (2002). "Effect of temperature on swimming performance of sea bass juveniles." *Journal of Fish Biology* **60**(4): 923-932.
- Koumoundouros, G., M. Pavlidis, L. Anezaki, C. Kokkari, A. Sterioti, P. Divanach and M. Kentouri (2002). "Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): critical sensitive ontogenetic phase." *J Exp Zool* **292**(6): 573-579.
- Koumoundouros, G., P. Divanach and M. Kentouri (1999). "Ontogeny and allometric plasticity of *Dentex dentex* (Osteichthyes: Sparidae) in rearing conditions." *Marine Biology* **135**(3): 561-572.
- Koumoundouros, G., P. Divanach, L. Anezaki and M. Kentouri (2001). Temperature-induced ontogenic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*).
- Kraak, G. and N. Pankhurst (1997). Temperature effects on the reproductive performance of fish.
- Lau, E. S., Z. Zhang, M. Qin and W. Ge (2016). "Knockout of Zebrafish Ovarian Aromatase Gene (*cyp19a1a*) by TALEN and CRISPR/Cas9 Leads to All-male Offspring Due to Failed Ovarian Differentiation." *Sci Rep* **6**: 37357.
- Lawrence, C. (2007). "The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review." *Aquaculture* **269**(1): 1-20.
- Lawrence, C., J. P. Ebersole and R. V. Kesseli (2008). "Rapid growth and out-crossing promote female development in zebrafish (*Danio rerio*)." *Environmental Biology of Fishes* **81**(2): 239-246.
- Le Roy, A., I. Loughland and F. Seebacher (2017). "Differential effects of developmental thermal plasticity across three generations of guppies (*Poecilia reticulata*): canalization and anticipatory matching." *Scientific Reports* **7**(1): 4313.

- Lee, C.G., Farrell A.P., Lotto A., MacNutt, M.J., Hinch, S.G., Healey, M.C. (2006). "The effect of temperature on swimming performance and oxygen consumption in adult sockeye (*Oncorhynchus nerka*) and coho (*O. kisutch*) salmon stocks." *Journal of Experimental Biology* **209**(13): 2606.
- Leimar, O., P. Hammerstein and Tom J. M. Van Dooren (2006). "A New Perspective on Developmental Plasticity and the Principles of Adaptive Morph Determination." *The American Naturalist* **167**(3): 367-376.
- Leris, I., D. G. Sfakianakis and M. Kentouri (2013). "Are zebrafish *Danio rerio* males better swimmers than females?" *J Fish Biol* **83**(5): 1381-1386.
- Libungan, L. A. and S. Pálsson (2015). "ShapeR: An R Package to Study Otolith Shape Variation among Fish Populations." *PLOS ONE* **10**(3): e0121102.
- Lindsey, C. C. (1988). 3 Factors Controlling Meristic Variation. *Fish Physiology*. W. S. Hoar and D. J. Randall, Academic Press. **11**: 197-274.
- Little, A. G. and F. Seebacher (2014). "Thyroid hormone regulates cardiac performance during cold acclimation in zebrafish (*Danio rerio*)." *The Journal of Experimental Biology* **217**(5): 718-725.
- Little, A. G., T. Kunisue, K. Kannan and F. Seebacher (2013). "Thyroid hormone actions are temperature-specific and regulate thermal acclimation in zebrafish (*Danio rerio*)." *BMC Biology* **11**(1): 26.
- Liu, J., M. Bressan, D. Hassel, J. Huisken, D. Staudt, K. Kikuchi, K. D. Poss, T. Mikawa and D. Y. Stainier (2010). "A dual role for ErbB2 signaling in cardiac trabeculation." *Development* **137**(22): 3867-3875.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC(T)} Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lurman, G. J., L. H. Petersen and A. K. Gamperl (2012). "In situ cardiac performance of Atlantic cod (*Gadus morhua*) at cold temperatures: long-term acclimation, acute thermal challenge and the role of adrenaline." *The Journal of Experimental Biology* **215**(22): 4006.
- Marcil, J., D. P. Swain and J. A. Hutchings (2006). "Genetic and environmental components of phenotypic variation in body shape among populations of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)." *Biological Journal of the Linnean Society* **88**(3): 351-365.
- Marshall, D. J., S. C. Burgess and J. Byers (2015). "Deconstructing environmental predictability: seasonality, environmental colour and the biogeography of marine life histories." *Ecology Letters* **18**(2): 174-181.
- Martell, D. J., J. D. Kieffer and E. A. Trippel (2005). "Effects of temperature during early life history on embryonic and larval development and growth in haddock." *Journal of Fish Biology* **66**(6): 1558-1575.
- Martell, D. J., J. D. Kieffer and E. A. Trippel (2005). "Effects of the embryonic thermal environment on haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) developmental trajectories through exogenous feeding stages." *Marine Biology* **149**(2): 177.
- Meyer, A. (1987). "Phenotypic plasticity and heterochrony in *Cichlasoma managuense* (pisces, cichlidae) and their implications for speciation in cichlid fishes." *Evolution* **41**(6): 1357-1369.
- Moczek, A. P. and E. C. Snell-Rood (2008). "The basis of being different: the role of gene silencing in plasticity." *Evolution & Development* **10**(5): 511-513.

- Moore, F. B. G., M. Hosey and B. Bagatto (2006). "Cardiovascular system in larval zebrafish responds to developmental hypoxia in a family specific manner." *Frontiers in Zoology* **3**: 4-4.
- Myrick, C. A. and J. J. Cech (2000). "Swimming Performances of Four California Stream Fishes: Temperature Effects." *Environmental Biology of Fishes* **58**(3): 289-295.
- Nakazawa, M., S. Miyagawa, A. Takao, E. B. Clark and N. Hu (1986). "Hemodynamic effects of environmental hyperthermia in stage 18, 21, and 24 chick embryos." *Pediatr Res* **20**(12): 1213-1215.
- Navarro-Martín, L., J. Viñas, L. Ribas, N. Díaz, A. Gutiérrez, L. Di Croce and F. Piferrer (2011). "DNA Methylation of the Gonadal Aromatase (*cyp19a*) Promoter Is Involved in Temperature-Dependent Sex Ratio Shifts in the European Sea Bass." *PLOS Genetics* **7**(12): e1002447.
- Ojanguren, A. F. and F. Braña (2000). "Thermal dependence of swimming endurance in juvenile brown trout." *Journal of Fish Biology* **56**(6): 1342-1347.
- Olson-Manning, C. F., M. R. Wagner and T. Mitchell-Olds (2012). "Adaptive evolution: evaluating empirical support for theoretical predictions." *Nature reviews. Genetics* **13**(12): 867-877.
- Ospina-Álvarez, N. and F. Piferrer (2008). "Temperature-Dependent Sex Determination in Fish Revisited: Prevalence, a Single Sex Ratio Response Pattern, and Possible Effects of Climate Change." *PLOS ONE* **3**(7): e2837.
- O'Steen, S. and A. F. Bennett (2003). "Thermal acclimation effects differ between voluntary, maximum, and critical swimming velocities in two cyprinid fishes." *Physiol Biochem Zool* **76**(4): 484-496.
- Pankhurst, N. W. and M. J. R. Porter (2003). "Cold and dark or warm and light: variations on the theme of environmental control of reproduction." *Fish Physiology and Biochemistry* **28**(1): 385-389.
- Pankhurst, W. N. and L. P. Munday (2011). Effect of climate change on fish reproduction and early life history stages. *Marine and Freshwater Research* **62**, 1015-1026.
- Parichy, D. M. and J. M. Turner (2003). "Zebrafish *puma* mutant decouples pigment pattern and somatic metamorphosis." *Developmental Biology* **256**(2): 242-257.
- Parichy, D. M., M. R. Elizondo, M. G. Mills, T. N. Gordon and R. E. Engeszer (2009). "Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish." *Dev Dyn* **238**(12): 2975-3015.
- Parsons, K. J., B. W. Robinson and T. Hrbek (2003). "Getting into Shape: An Empirical Comparison of Traditional Truss-Based Morphometric Methods with a Newer Geometric Method Applied to New World Cichlids." *Environmental Biology of Fishes* **67**(4): 417-431.
- Pavlidis, M., G. Koumoundouros, A. Sterioti, S. Somarakis, P. Divanach and M. Kentouri (2000). "Evidence of temperature-dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)." *J Exp Zool* **287**(3): 225-232.
- Pelster, B. (1999). "Environmental influences on the development of the cardiac system in fish and amphibians." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* **124**(4): 407-412.
- Pelster, B. (2002). "Developmental plasticity in the cardiovascular system of fish, with special reference to the zebrafish." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **133**(3): 547-553.

- Pelzer, T., A. Shamim, S. Wölfges, M. Schumann and L. Neyses (1997). Modulation of Cardiac Hypertrophy by Estrogens. *Hypertension and the Heart*. A. Zanchetti, R. B. Devereux, L. Hansson and S. Gorini. Boston, MA, Springer US: 83-89.
- Perrichon, P., C. Pasparakis, E. M. Mager, J. D. Stieglitz, D. D. Benetti, M. Groseil and W. W. Burggren (2017). "Morphology and cardiac physiology are differentially affected by temperature in developing larvae of the marine fish mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*)." *Biology Open* **6**(6): 800-809.
- Petersen, L. H. and A. K. Gamperl (2010). "In situ cardiac function in Atlantic cod (*Gadus morhua*): effects of acute and chronic hypoxia." *J Exp Biol* **213**(5): 820-830.
- Pezaro, N., J. S. Doody and M. B. Thompson (2017). "The ecology and evolution of temperature-dependent reaction norms for sex determination in reptiles: a mechanistic conceptual model." *Biol Rev Camb Philos Soc* **92**(3): 1348-1364.
- Pías, B., S. Matesanz, A. Herrero, T. E. Gimeno, A. Escudero and F. Valladares (2010). "Transgenerational effects of three global change drivers on an endemic Mediterranean plant." *Oikos* **119**(9): 1435-1444.
- Piersma, T. and Å. Lindström (1997). "Rapid reversible changes in organ size as a component of adaptive behaviour." *Trends in Ecology & Evolution* **12**(4): 134-138.
- Piersma, T. and J. Drent (2003). "Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design." *Trends in Ecology & Evolution* **18**(5): 228-233.
- Piferrer, F., M. Blazquez, L. Navarro and A. Gonzalez (2005). "Genetic, endocrine, and environmental components of sex determination and differentiation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.)." *Gen Comp Endocrinol* **142**(1-2): 102-110.
- Pigliucci, M. and C. D. Schlichting (1998). "Reaction norms of *Arabidopsis*. V. Flowering time controls phenotypic architecture in response to nutrient stress." *Journal of Evolutionary Biology* **11**(3): 285-301.
- Pigliucci, M., C. J. Murren and C. D. Schlichting (2006). "Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation." *Journal of experimental biology* **209**(12): 2362-2367.
- Pittman, K., M. Yúfera, M. Pavlidis, A. J. Geffen, W. Koven, L. Ribeiro, J. L. Zambonino-Infante and A. Tandler (2013). "Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world." *Reviews in Aquaculture* **5**: S224-S267.
- Plaut, I. (2001). "Critical swimming speed: its ecological relevance." *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* **131**(1): 41-50.
- Plaut, I. (2002). "Does Pregnancy Affect Swimming Performance of Female Mosquitofish, *Gambusia affinis*?" *Functional Ecology* **16**(3): 290-295.
- Poloczanska, E. S., C. J. Brown, W. J. Sydeman, W. Kiessling, D. S. Schoeman, P. J. Moore, K. Brander, J. F. Bruno, L. B. Buckley, M. T. Burrows, C. M. Duarte, B. S. Halpern, J. Holding, C. V. Kappel, M. I. O'Connor, J. M. Pandolfi, C. Parmesan, F. Schwing, S. A. Thompson and A. J. Richardson (2013). "Global imprint of climate change on marine life." *Nature Climate Change* **3**(10): 919-925.
- Poppe, T. T., R. Johansen, G. Gunnes and B. Torud (2003). "Heart morphology in wild and farmed Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*." *Dis Aquat Organ* **57**(1-2): 103-108.
- Pörtner, H. O., B. Berdal, R. Blust, O. Brix, A. Colosimo, B. De Wachter, A. Giuliani, T. Johansen, T. Fischer, R. Knust, G. Lannig, G. Naevdal, A. Nedenes, G. Nyhammer, F. J. Sartoris, I. Serendero, P. Sirabella, S. Thorkildsen and M. Zakhartsev (2001). "Climate induced temperature effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish: developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus*

- morhua) and common eelpout (*Zoarces viviparus*)." *Continental Shelf Research* **21**(18): 1975-1997.
- Poss, K. D., L. G. Wilson and M. T. Keating (2002). "Heart regeneration in zebrafish." *Science* **298**(5601): 2188-2190.
- Potok, M. E., D. A. Nix, T. J. Parnell and B. R. Cairns (2013). "Reprogramming the maternal zebrafish genome after fertilization to match the paternal methylation pattern." *Cell* **153**(4): 759-772.
- Radman, M. (1999). "Enzymes of evolutionary change." *Nature* **401**(6756): 866-867, 869.
- Randall, D. and C. Brauner (1991). "Effects of Environmental Factors on Exercise in Fish." *Journal of Experimental Biology* **160**(1): 113-126.
- Reed, T. E., R. S. Waples, D. E. Schindler, J. J. Hard and M. T. Kinnison (2010). "Phenotypic plasticity and population viability: the importance of environmental predictability." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*.
- Regen, D. M. (1988). "Effects of chamber shape and fiber orientation on relations between fiber dynamics and chamber dynamics." *Ann Biomed Eng* **16**(6): 589-607.
- Reidy, S. P., S. R. Kerr and J. A. Nelson (2000). "Aerobic and anaerobic swimming performance of individual Atlantic cod." *Journal of experimental biology* **203**(2): 347-357.
- Ribas, L. and W. C. Liew (2017). "Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and yields a set of different gonadal transcriptomes." **114**(6): E941-e950.
- Ricker, W. E. (1979). 11 - Growth Rates and Models. *Fish Physiology*. W. S. Hoar, D. J. Randall and J. R. Brett, Academic Press. **8**: 677-742.
- Rijnsdorp, A. D., M. A. Peck, G. H. Engelhard, C. Möllmann and J. K. Pinnegar (2009). "Resolving the effect of climate change on fish populations." *ICES Journal of Marine Science* **66**(7): 1570-1583.
- Rijnsdorp, A. D. and B. Ibelings (1989). "Sexual dimorphism in the energetics of reproduction and growth of North Sea plaice, *Pleuronectes platessa* L." *Journal of Fish Biology* **35**(3): 401-415.
- Robison, B. D., R. E. Drew, G. K. Murdoch, M. Powell, K. J. Rodnick, M. Settles, D. Stone, E. Churchill, R. A. Hill, M. R. Papasani, S. S. Lewis and R. W. Hardy (2008). "Sexual dimorphism in hepatic gene expression and the response to dietary carbohydrate manipulation in the zebrafish (*Danio rerio*)." *Comparative biochemistry and physiology. Part D: Genomics & proteomics* **3**(2): 141-154.
- Rodríguez-Marí, A., C. Cañestro, R. A. BreMiller, A. Nguyen-Johnson, K. Asakawa, K. Kawakami and J. H. Postlethwait (2010). "Sex Reversal in Zebrafish fancl Mutants Is Caused by Tp53-Mediated Germ Cell Apoptosis." *PLOS Genetics* **6**(7): e1001034.
- Roff, D. (2017). *The evolution of life histories : theory and analysis / Derek A. Roff*.
- Roff, D. A. (1996). "The Evolution of Threshold Traits in Animals." *The Quarterly Review of Biology* **71**(1): 3-35.
- Rohlf, F. (2015). *The Tps series of software*.
- Rohlf, F. J. (1996). *Morphometric Spaces, Shape Components and the Effects of Linear Transformations. Advances in Morphometrics*. L. F. Marcus, M. Corti, A. Loy, G. J. P. Naylor and D. E. Slice. Boston, MA, Springer US: 117-129.
- Rohlf, F. J. and D. Slice (1990). "Extensions of the Procrustes Method for the Optimal Superimposition of Landmarks." *Systematic Biology* **39**(1): 40-59.
- Rohlf, F. J. and L. F. Marcus (1993). "A revolution morphometrics." *Trends Ecol Evol* **8**(4): 129-132.

- Samsa, L. A., B. Yang and J. Liu (2013). "Embryonic Cardiac Chamber Maturation: Trabeculation, Conduction and Cardiomyocyte Proliferation." *American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics* **163**(3): 157-168.
- Sanchez-Iranzo, H., M. Galardi-Castilla, C. Minguillon, A. Sanz-Morejon, J. M. Gonzalez-Rosa, A. Felker, A. Ernst, G. Guzman-Martinez, C. Mosimann and N. Mercader (2018). "Tbx5a lineage tracing shows cardiomyocyte plasticity during zebrafish heart regeneration." *Nat Commun* **9**(1): 428.
- Sanchez-Quintana, D. and J. M. Hurlle (1987). "Ventricular myocardial architecture in marine fishes." *The Anatomical Record* **217**(3): 263-273.
- Sänger, A. and W. Stoiber (2001). 7. Muscle fiber diversity and plasticity.
- Santer, R. M., M. G. Walker, L. Emerson and P. R. Witthames (1983). "On the morphology of the heart ventricle in marine teleost fish (teleostei)." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **76**(3): 453-457.
- Schaefer, J. and A. Ryan (2006). "Developmental plasticity in the thermal tolerance of zebrafish *Danio rerio*." *Journal of Fish Biology* **69**(3): 722-734.
- Schaible, T. F., A. Malhotra, G. Ciambone and J. Scheuer (1984). "The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats." *Circulation Research* **54**(1): 38-49.
- Scherz, P. J., J. Huisken, P. Sahai-Hernandez and D. Y. Stainier (2008). "High-speed imaging of developing heart valves reveals interplay of morphogenesis and function." *Development* **135**(6): 1179-1187.
- Schirone, R. C. and L. Gross (1968). "Effect of temperature on early embryological development of the zebra fish, *Brachydanio rerio*." *Journal of Experimental Zoology* **169**(1): 43-52.
- Schnurr, M. E., Y. Yin and G. R. Scott (2014). "Temperature during embryonic development has persistent effects on metabolic enzymes in the muscle of zebrafish." *J Exp Biol* **217**(Pt 8): 1370-1380.
- Schonweger, G., T. Schwerte and B. Pelster (2000). "Temperature-dependent development of cardiac activity in unrestrained larvae of the minnow *Phoxinus phoxinus*." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**(5): R1634-1640.
- Schulte, P. M., T. M. Healy and N. A. Fanguie (2011). "Thermal Performance Curves, Phenotypic Plasticity, and the Time Scales of Temperature Exposure." *Integrative and Comparative Biology* **51**(5): 691-702.
- Schultz, E. (2010). *Fish Larval Physiology*. Edited by R. N. Finn and B. G. Kapoor. Enfield (New Hampshire) : Science Publishers .. xv + 724 p.; ill.; species, common name, and subject indexes. ISBN: 978-1-57808-388-6 . 2008.
- Schulz, R. A. and K. E. Yutzey (2004). "Calcineurin signaling and NFAT activation in cardiovascular and skeletal muscle development." *Developmental Biology* **266**(1): 1-16.
- Scott, G. R. and I. A. Johnston (2012). "Temperature during embryonic development has persistent effects on thermal acclimation capacity in zebrafish." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**(35): 14247-14252.
- Sedmera, D., T. Pexieder, M. Vuillemin, R. P. Thompson and R. H. Anderson (2000). "Developmental patterning of the myocardium." *The Anatomical Record* **258**(4): 319-337.
- Selman, K., R. A. Wallace, A. Sarka and X. Qi (1993). "Stages of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*." *Journal of Morphology* **218**(2): 203-224.

- Sergeeva, I. A. and V. M. Christoffels (2013). "Regulation of expression of atrial and brain natriuretic peptide, biomarkers for heart development and disease." *Biochimica et Biophysica acta* **1832**(12): 2403-2412.
- Sfakianakis, D. G., G. Koumoundouros, P. Divanach and M. Kentouri (2004). "Osteological development of the vertebral column and of the fins in *Pagellus erythrinus* (L. 1758). Temperature effect on the developmental plasticity and morpho-anatomical abnormalities." *Aquaculture* **232**(1): 407-424.
- Sfakianakis, D. G., I. Leris and M. Kentouri (2011). "Effect of developmental temperature on swimming performance of zebrafish (*Danio rerio*) juveniles." *Environmental Biology of Fishes* **90**(4): 421-427.
- Sfakianakis, D. G., I. Leris, A. Laggis and M. Kentouri (2011). "The effect of rearing temperature on body shape and meristic characters in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles." *Environmental Biology of Fishes* **92**(2): 197.
- Sfakianakis, D., I. Leris, C. Mylonas and M. Kentouri (2011). Temperature during early life determines sex in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, 2012.
- Shang, E. H., R. M. Yu and R. S. Wu (2006). "Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*)." *Environ Sci Technol* **40**(9): 3118-3122.
- Shiels, H. A., M. Vornanen and A. P. Farrell (2002). "Effects of temperature on intracellular Ca²⁺ in trout atrial myocytes." *J Exp Biol* **205**(Pt 23): 3641-3650.
- Singleman, C. and N. G. Holtzman (2012). "Analysis of postembryonic heart development and maturation in the zebrafish, *Danio rerio*." *Dev Dyn* **241**(12): 1993-2004.
- Singleman, C. and N. G. Holtzman (2014). "Growth and Maturation in the Zebrafish, *Danio rerio*: A Staging Tool for Teaching and Research." *Zebrafish* **11**(4): 396-406.
- Sokal, R. and F. Rohlf (1981). *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*.
- Somero, G. N. (2010). "The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'." *J Exp Biol* **213**(6): 912-920.
- Spence, R. and C. Smith (2006). "Mating preference of female zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance." *Behavioral Ecology* **17**(5): 779-782.
- Spence, R. G. A., K. F. Runa, M. Reichard, K. A. Huq, M. A. Wahab, Z. F. Ahmed and C. H. Smith (2006). "The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh." *Journal of Fish Biology* **69**: 1435-1448.
- Spence, R., G. Gerlach, C. Lawrence and C. Smith (2008). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*." *Biol Rev Camb Philos Soc* **83**(1): 13-34.
- Stainier, D. Y., R. K. Lee and M. C. Fishman (1993). "Cardiovascular development in the zebrafish. I. Myocardial fate map and heart tube formation." *Development* **119**(1): 31-40.
- Stearns, S. C. (1989). "The Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity Phenotypic sources of variation among organisms can be described by developmental switches and reaction norms." *BioScience* **39**(7): 436-445.
- Stoiber, W., J. R. Haslett, R. Wenk, P. Steinbacher, H. P. Gollmann and A. M. Sanger (2002). "Cellularity changes in developing red and white fish muscle at different temperatures: simulating natural environmental conditions for a temperate freshwater cyprinid." *J Exp Biol* **205**(Pt 16): 2349-2364.
- Stouder, C. and A. Paoloni-Giacobino (2010). "Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm." *Reproduction* **139**(2): 373-379.

- Svanbäck, R. and P. Eklöv (2002). "Effects of habitat and food resources on morphology and ontogenetic growth trajectories in perch." *Oecologia* **131**(1): 61-70.
- Terblanche, J. S. and S. L. Chown (2006). "The relative contributions of developmental plasticity and adult acclimation to physiological variation in the tsetse fly, *Glossina pallidipes* (Diptera, Glossinidae)." *Journal of Experimental Biology* **209**(6): 1064-1073.
- Thomas, C. D., A. Cameron, R. E. Green, M. Bakkenes, L. J. Beaumont, Y. C. Collingham, B. F. Erasmus, M. F. De Siqueira, A. Grainger, L. Hannah, L. Hughes, B. Huntley, A. S. Van Jaarsveld, G. F. Midgley, L. Miles, M. A. Ortega-Huerta, A. T. Peterson, O. L. Phillips and S. E. Williams (2004). "Extinction risk from climate change." *Nature* **427**(6970): 145-148.
- Timmerman, L. A., J. Grego-Bessa, A. Raya, E. Bertran, J. M. Perez-Pomares, J. Diez, S. Aranda, S. Palomo, F. McCormick, J. C. Izpisua-Belmonte and J. L. de la Pompa (2004). "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation." *Genes Dev* **18**(1): 99-115.
- Tota, B. (1983). "Vascular and metabolic zonation in the ventricular myocardium of mammals and fishes." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **76**(3): 423-437.
- Uchida, D., M. Yamashita, T. Kitano and T. Iguchi (2002). "Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish." *J Exp Biol* **205**(Pt 6): 711-718.
- Uchida, D., M. Yamashita, T. Kitano and T. Iguchi (2004). "An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal." *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **137**(1): 11-20.
- Uusi-Heikkilä, S., A. Kuparinen, C. Wolter, T. Meinelt and R. Arlinghaus (2012). "Paternal body size affects reproductive success in laboratory-held zebrafish (*Danio rerio*)." *Environmental Biology of Fishes* **93**(4): 461-474.
- Van Eickels, M., C. Grohe, J. P. Cleutjens, B. J. Janssen, H. J. Wellens and P. A. Doevendans (2001). "17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy." *Circulation* **104**(12): 1419-1423.
- Van Noordwijk, A. J. (1988). "Futuyma, D. J. 1986. *Evolutionary Biology* 2nd edition, Sinauer Associates Inc. Sunderland, Mass." *Journal of Evolutionary Biology* **1**(1): 89-90.
- Varley, K. E., J. Gertz, K. M. Bowling, S. L. Parker, T. E. Reddy, F. Pauli-Behn, M. K. Cross, B. A. Williams, J. A. Stamatoyannopoulos, G. E. Crawford, D. M. Absher, B. J. Wold and R. M. Myers (2013). "Dynamic DNA methylation across diverse human cell lines and tissues." *Genome research* **23**(3): 555-567.
- Vaña, J. (2002). "Biochemical adaptation: Mechanism and process in physiological evolution." *Biochemistry and Molecular Biology Education* **30**(3): 215-216.
- Vornanen, M., M. Hassinen, H. Koskinen and A. Krasnov (2005). "Steady-state effects of temperature acclimation on the transcriptome of the rainbow trout heart." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **289**(4): R1177-1184.
- Voronov, D. A., P. W. Alford, G. Xu and L. A. Taber (2004). "The role of mechanical forces in dextral rotation during cardiac looping in the chick embryo." *Dev Biol* **272**(2): 339-350.
- Walsh, M. R., T. Castoe, J. Holmes, M. Packer, K. Biles, M. Walsh, S. B. Munch and D. M. Post (2016). "Local adaptation in transgenerational responses to predators." *Proc Biol Sci* **283**(1823).

- Walther, G.-R., E. Post, P. Convey, A. Menzel, C. Parmesan, T. J. C. Beebee, J.-M. Fromentin, O. Hoegh-Guldberg and F. Bairlein (2002). "Ecological responses to recent climate change." *Nature* **416**: 389.
- Wang, H., M. T. Maurano, H. Qu, K. E. Varley, J. Gertz, F. Pauli, K. Lee, T. Canfield, M. Weaver, R. Sandstrom, R. E. Thurman, R. Kaul, R. M. Myers and J. A. Stamatoyannopoulos (2012). "Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation." *Genome research* **22**(9): 1680-1688.
- Wang, L. W., I. G. Huttner, C. F. Santiago, S. H. Kesteven, Z.-Y. Yu, M. P. Feneley and D. Fatkin (2017). "Standardized echocardiographic assessment of cardiac function in normal adult zebrafish and heart disease models." *Disease Models & Mechanisms* **10**(1): 63-76.
- Wang, X. G., R. Bartfai, I. Sleptsova-Freidrich and L. Orban (2007). "The timing and extent of 'juvenile ovary' phase are highly variable during zebrafish testis differentiation." *Journal of Fish Biology* **70**: 33-44.
- Webb, J. F. (1999). Chapter 4 - Larvae in Fish Development and Evolution A2 - Hall, Brian K. *The Origin and Evolution of Larval Forms*. M. H. Wake. San Diego, Academic Press: 109-158.
- West-Eberhard, M. J. (1989). "Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity." *Annual Review of Ecology and Systematics* **20**(1): 249-278.
- West-Eberhard, M. J. (2005). "Developmental plasticity and the origin of species differences." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102 Suppl 1**: 6543-6549.
- Westerfield, M. (1995) *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio)*, 3rd Edition. Eugene, OR, University of Oregon Press.,:385.
- Whitman, D. and A. Agrawal (2009). What is Phenotypic Plasticity and Why is it Important?
- Widmer, S., F. B. G. Moore and B. Bagatto (2006). "The effects of chronic developmental hypoxia on swimming performance in zebrafish." *Journal of Fish Biology* **69**(6): 1885-1891.
- Wilson, R. S. and C. E. Franklin (2002). "Testing the beneficial acclimation hypothesis." *Trends in Ecology & Evolution* **17**(2): 66-70.
- 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 the Linnean Society* **45**(3): 197-218.
- Windig, J. J., C. G. F. d. Kovel and G. Jong (2004). *Genetics and Mechanics of Plasticity. Phenotypic Plasticity - Functional and Conceptual Approaches*, Oxford University Press: 31-49.
- Winne, C. T. and W. A. Hopkins (2006). "Influence of sex and reproductive condition on terrestrial and aquatic locomotor performance in the semi-aquatic snake *Seminatrix pygaea*." *Functional Ecology* **20**(6): 1054-1061.
- Yalcin, H. C., A. Amindari, J. T. Butcher, A. Althani and M. Yacoub (2017). "Heart function and hemodynamic analysis for zebrafish embryos." *Dev Dyn* **246**(11): 868-880.
- Yalcin, H., S. I. Da'As, I. A. Mohammed, G. K. Nasrallah, J. Al Suwaidi and M. H. Yacoub (2016). "Human c-MYBPC3 RNA Targeted Therapy, Reversal of Hypertrophic Cardiomyopathy in the Zebrafish Model." *Qatar Foundation Annual Research Conference Proceedings* **2016**(1): HBPP2955.
- Yelon, D. and D. Y. R. Stainier (1999). "Patterning during organogenesis: genetic analysis of cardiac chamber formation." *Seminars in Cell & Developmental Biology* **10**(1): 93-98.
- Yoneda, M. and P. Wright (2005). Effect of temperature and food availability on reproductive investment of first-time spawning male Atlantic cod, *Gadus morhua*.

Zhang, X., C. Y. Ung, S. H. Lam, J. Ma, Y. Z. Chen, L. Zhang, Z. Gong and B. Li (2012).
"Toxicogenomic Analysis Suggests Chemical-Induced Sexual Dimorphism in the
Expression of Metabolic Genes in Zebrafish Liver." PLOS ONE 7(12): e51971.

Παράρτημα I

Πρωτόκολλα ποσοτικοποίησης γονιδιακής έκφρασης με Real Time PCR

1. Απομόνωση ολικού RNA από ιστό καρδιάς με χρήση του φαινολικού αντιδραστήριου (TRIzol)

Οι ιστοί, μετά την απόψυξή τους, ομογενοποιήθηκαν στο αντιδραστήριο TRIzol (Invitrogen) το οποίο περιέχει φαινόλη και το χημικό αντιδραστήριο Guanidinium thiocyanate (GITC) υπεύθυνο της αποδιάταξης των πρωτεϊνών και των κυττάρων καθώς και της αναστολής της δράσης των RNAασών. Η ομογενοποίηση γίνεται πάνω σε πάγο για τη διατήρηση του ολικού RNA. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε είναι το παρακάτω:

- Ομογενοποίηση ιστού μέσα σε Trizol (2 καρδιές σε 500 μ l Trizol).
- Επώαση 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και προσθήκη χλωροφόρμιου (0,2ml/ml TRIzol) στο υπερκείμενο.
- Vortex για 15 sec.
- Επώαση 3 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντριση για 15 min στις 12000 rpm και στους 4° C.
- Μεταφορά της διάφανης φάσης σε καινούργιο eppendorf 1.4 ml και σε αυτό προσθήκη 2.5 μ l γλυκογόνου και 0.5ml ισοπροπανόλης (0.5ml/ ml of TRIzol).
- Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 min.
- Φυγοκέντριση για 10 min στις 12000 rpm και στους 4° C και απόρριψη του υπερκείμενου
- Επαναίωση του ιζήματος σε 1ml 75% αιθανόλης (1ml/ ml of TRIzol).
- Φυγοκέντριση για 10 min στις 12000 rpm και στους 4° C και απόρριψη του υπερκείμενου
- Στέγνωμα του ιζήματος RNA για 5-10 min και επαναίωση σε 20 μ l H₂O ελεύθερου RNAασών (DEPC)
- Επώαση σε υδατόλουτρο στους 55 - 60° C για 3 min και υπολογισμός συγκέντρωσης.
- Αποθήκευση στους - 80° C

2. DNase Treatment

Για την καλύτερη αποτελεσματικότητα των αποτελεσμάτων, τα εκχυλισμένα RNAs των δειγμάτων (του σταδίου A) υποβλήθηκαν σε περαιτέρω καταστροφή των εναπομεινάντων υπολειμμάτων DNA με το ένζυμο Turbo DNase (Ambion 2238G2). Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται παρακάτω:

- Μεταφορά του RNA σε 0.5 ml eppendorf
- Προσθήκη
2 μ l 10x DNase buffer (TURBO)
0,5-1 μ l TURBO DNase (1 μ l για 10 μ g σε 50 μ l σύνολο)
- Επώαση στο PCR μηχάνημα για
30min at 37°C
10min at 75°C

2. Φωτομετρικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης RNA

Καθώς τα διαλύματα των νουκλεϊκών οξέων απορροφούν στο υπεριώδες, με μέγιστο στα 260nm, μικρή ποσότητα δείγματος (2-4 μ l) αραιώθηκε σε νερό (DEPC water) και στη συνέχεια μετρήθηκε η απορρόφηση του διαλύματος φωτομετρικά στα 260nm (40 μ g RNA/ml έχουν οπτική πυκνότητα στα 260 nm ίση με 1). Η καθαρότητα του απομονωμένου RNA εκτιμήθηκε από τους λόγους 260/ 280 nm (καθαρότητα από πρωτεΐνες) και 260/230 nm (καθαρότητα από διάφορους διαλύτες). Λόγοι > 1.65 θεωρούνται ικανοποιητικοί. Η διαδικασία είχε ως εξής:

- 250 μ l νερού DEPC φωτομετρούνται στα 260nm και το φωτόμετρο μηδενίζεται
- Λήψη 5 μ l δείγματος και αραιώση σε DEPC νερό μέχρι τελικού όγκου 25 μ l
- Τοποθέτηση του αραιωμένου δείγματος στην κυβελίδα και φωτομέτρηση σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδους ορατού στα 260nm.

- Υπολογισμός του λόγου 260nm/280nm για την εκτίμηση της καθαρότητας του εκάστοτε δείγματος.
- Υπολογισμός του λόγου 260/230 nm για την εκτίμηση της καθαρότητας από διάφορους διαλύτες.

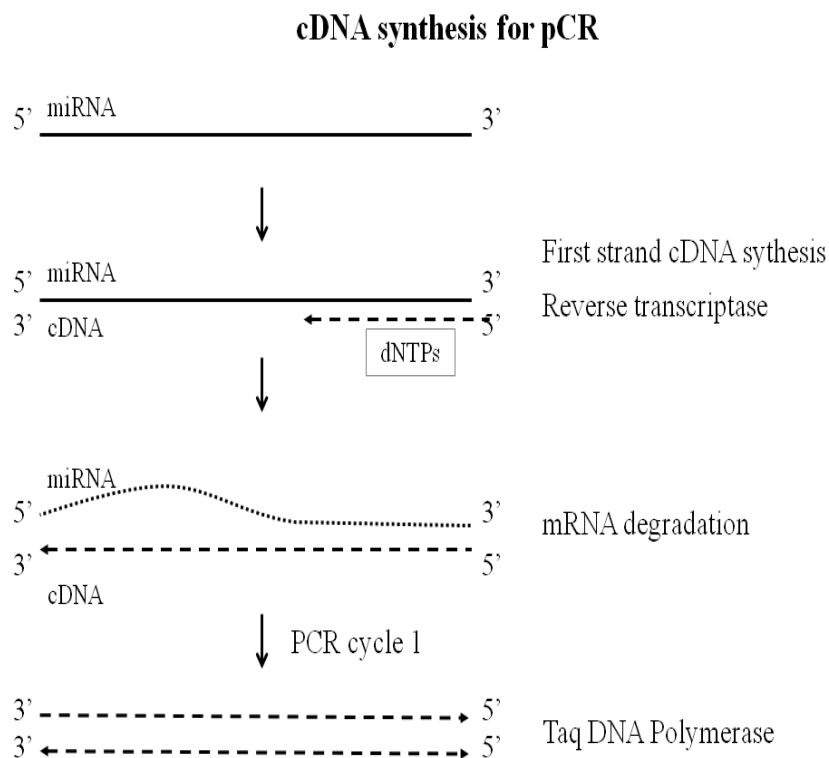
Η συγκέντρωση του απομονωμένου RNA (σε µg/ml) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{RNA}(\mu\text{g/ml}) = \text{ABS}(260\text{nm}) \times 40\mu\text{g/ml} \times \text{παράγοντας διάλυσης (dilution factor)}$$

όπου dilution factor, η αναλογία του τελικού όγκου του δείγματος μετά την αραιώση, προς τον όγκο του δείγματος (5µl) που χρησιμοποιήθηκε για να γίνει η φωτομέτρηση.

4. Σύνθεση cDNA

Την απομόνωση του ολικού RNA, ακολούθησε η σύνθεση cDNA με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription, RT), κατά την οποία το ένζυμο ανάστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase) καταλύει τη σύνθεση μιας συμπληρωματικής αλυσίδας cDNA. Η αντίδραση σύνθεσης της πρώτης αλυσίδας του cDNA (First strand cDNA synthesis) γίνεται με κατεύθυνση 5' -3'. Απαραίτητα αντιδραστήρια είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, το αρχικό υλικό RNA, τα dNTPs και οι κατάλληλοι εκκινητές. Μετά το πέρας της αντίδρασης σχηματίζεται ένα δίκλωνο υβριδικό μόριο που περιέχει μια αλυσίδα RNA και μια αλυσίδα DNA (Εικόνα 1). Το cDNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αρχικό υλικό στην αντίδραση PCR (αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης).



Εικόνα 1: Τα στάδια της cDNA σύνθεσης με αντίστροφη μεταγραφή. Μετά την υβριδοποίηση των εκκινητών, η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει τη συμπληρωματική αλυσίδα cDNA χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το mRNA. Σε υψηλή θερμοκρασία αποδιατάσσεται το RNA και προκύπτει η μονή αλυσίδα cDNA που αποτελεί αρχικό υλικό στην αντίδραση PCR.

Αναλυτικά τα συστατικά για τη σύνθεση cDNA (για μια αντίδραση) περιγράφονται στον πίνακα παρακάτω. Χρησιμοποιήθηκαν τα τυποποιημένα αντιδραστήρια της TaKaRa (PrimeScript RT reagent Kit, Takara Bio Inc.).

Πίνακας 1: Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του cDNA (TaKaRa reagent kit).

Reagents	Volume (μ l)
5x PrimeScript Buffer (for Real Time)	2
PrimeScript RT Enzyme Mix I	0.5
Oligo dT Primers (50 μ M)	0.5
Random 6 mers (100 μ M)	0.5
Total RNA (500ng)	x
Rnase free dH ₂ O	Up to 10 μ l

Για τη σύνθεση cDNA ακολουθήσε επώαση στο PCR μηχάνημα για:

- 15 min στους 37°C
- 5 sec στους 85°C
- 4°C

Η μετέπειτα ποσοτικοποίηση της γονιδιακής έκφρασης στην καρδιά των ιχθυδίων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Real Time Q-PCR.

5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real-Time PCR)

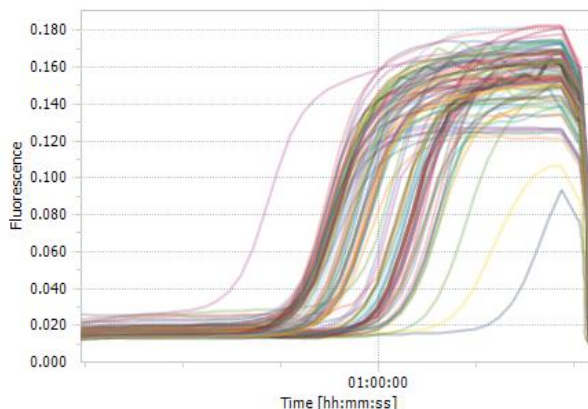
Η κλασική αντίδραση της PCR πραγματοποιείται σε τρία στάδια (Εικόνα 2) τα οποία επαναλαμβάνονται διαδοχικά (30-40 κύκλοι):

Αποδιάταξη – denaturation: Οι δύο αλυσίδες του DNA αναδιατάσσονται με θέρμανση

Υβριδισμός των εκκινητών - primer annealing: Με μείωση της θερμοκρασίας οι εκκινητές υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο εκμαγείο DNA

Σύνθεση – extension: Στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης της Taq πολυμεράσης, η πολυμεράση επιμηκώνει τους εκκινητές εισάγοντας τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (Deoxyribonucleotide triphosphates, dNTPs).

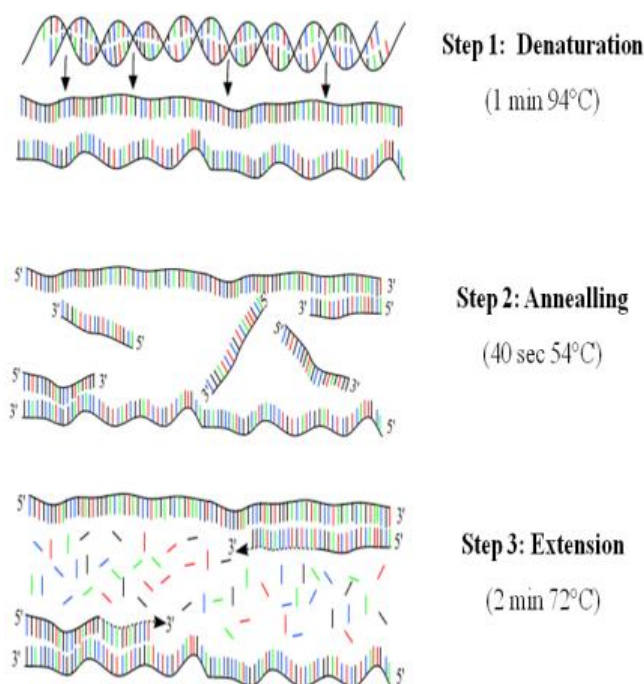
Η Quantitative Real Time PCR βασίζεται στις ίδιες αρχές λειτουργίας με την κλασική PCR και αποτελεί παραλλαγή αυτής. Στη real-time PCR, τα δεδομένα συλλέγονται όταν η αντίδραση είναι ακόμη στη φάση της εκθετικής αύξησης. Ο πολλαπλασιασμός των προϊόντων (της αλληλουχίας-στόχου) είναι εκθετικός, αφού τα προϊόντα κάθε κύκλου αποτελούν τα αντιδρώντα του επόμενου κύκλου. Η σημαντικότερη παράμετρος για την ποσοτικοποίηση είναι η τιμή Ct (threshold cycle), που αντιστοιχεί στον κύκλο κατά τον οποίο η τιμή του φθορισμού προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο όριο (threshold, Εικόνα 3). Όσο μικρότερη η τιμή Ct, τόσο υψηλότερη η αρχική συγκέντρωση του υποστρώματος.



Εικόνα 3: Στιγμιότυπο των καμπύλων αντίδρασης (Light Cycler 96, Roche) όπου αναγράφεται η ένταση του φθορισμού σε συνάρτηση με το χρόνο. Στις καμπύλες διακρίνονται η εκθετική, η γραμμική και η φάση

κορεσμού. Το όριο φθορισμού βρίσκεται πάνω από το επίπεδο θορύβου (baseline) και στην αρχή της εκθετικής φάσης.

Steps of Polymerase Chain Reaction (PCR)



Εικόνα 2: Τα στάδια μιας PCR. Η μέθοδος της PCR βασίζεται στην πραγματοποίηση διαδοχικών κύκλων αντιγραφής του DNA (30-40) με τη χρήση τυχαίων εκκινητών. Κάθε κύκλος αντιγραφής αποτελείται από τα εξής 3 στάδια: (1) Αποδιάταξη του DNA (Denaturation, 94°C). (2) Υβριδοποίηση των εκκινητών στις συμπληρωματικές προς αυτούς αλληλουχίες (Annealing, 50-72°C) και (3) Επιμήκυνση των εκκινητών και σύνθεση DNA με κατεύθυνση 5'→3', με τη βοήθεια της DNA πολυμεράσης (Extension, 72°C).

Η RT-PCR πραγματοποιήθηκε στον θερμικό κυκλοποιητή (Light Cycler 96, Roche), συσκευή που φέρει θερμαινόμενη πλάκα που μπορεί να εναλλάσσει θερμοκρασίες με ταχύτητα και ακρίβεια. Το συγκεκριμένο πειραματικό πρωτόκολλο βασίστηκε στη χρήση και ανίχνευση της χρωστικής (SYBR GREEN I). Το SYBR Green I, χρησιμοποιείται ως χρωστική των νουκλεϊκών οξέων και παρουσιάζει ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερο, και φθορίζει όταν ενσωματώνεται σε δίκλιωνα μόρια DNA.

Κατά τη Real Time PCR με υπόστρωμα cDNA, τα συστατικά της κάθε αντίδρασης, σε τελικό όγκο 20μl, είναι τα ακόλουθα:

- 10μl 2xMaster Mix SYBR-Green (KAPA SYBR qRT-PCR master mix)
- 0.5μl ανοδικός εκκινητής (10μM Forward primer)
- 0.5μl καθοδικός εκκινητής (10μM Reverse Primer)
- 4 μl H₂O (DEPC)
- 5 μl cDNA (1:8 αραωμένο)

Το πρόγραμμα που εφαρμόστηκε στο θερμικό κυκλοποιητή ήταν το ακόλουθο:

- 1. Preincubation:** 50 °C 2 min, 95 °C 10 min
- 2. Two step amplification (40 cycles):** 95 °C 15 sec, 60 °C 60 sec
- 3. Melting:** 95 °C 60 sec, 65 °C 60 sec, 95 °C 10 sec

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης στην οντογένεση και στη λειτουργία της καρδιάς των νυμφών zebrafish

ABSTRACT

As a known vertebrate model organism, the zebrafish is ideal for the analysis of the cardiovascular system thanks to its transparency during early larval stages. Goal of this study was to indentify phenotypic plasticity in the onset of cardiovascular responses in zebrafish larvae. Phenotypic plasticity was induced by developing zebrafish at three different temperatures (24°C, 28°C and 32°C) till 30 days post-fertilization (dpf). Fish reared at 24°C appeared delayed onset of all developmental processes in comparison with those reared at 28°C and 32°C. Cardiac activity was measured in all three groups of fish, at five distinct developmental stages. Statistical analysis proved no significant effect of anesthesia on larvae heart rate. Mean resting heart rate of fish reared at 24°C compared with those reared at 28 and 32°C, revealed a significant lower number of beats min^{-1} ,

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

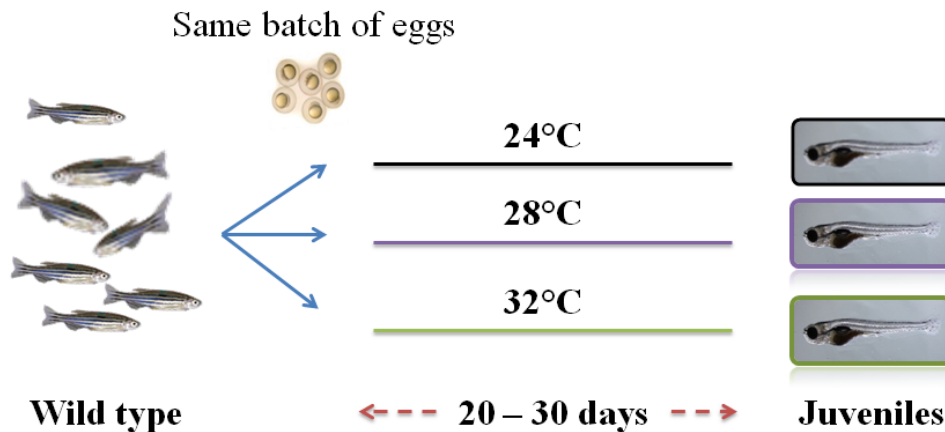
Στη φύση, η συνεχής μεταβολή των περιβαλλοντικών συνθηκών σε συνδυασμό με το γενετικό υπόβαθρο του κάθε οργανισμού, καθορίζουν το εύρος των διαφορετικών φαινοτύπων που δύναται να προκύψουν. Ιδιαίτερα στα ψάρια, μεταβολές περιβαλλοντικών συνθηκών (μεταβολές O_2 , θερμοκρασίας, φωτοπεριόδου) προκαλούν πλαστικότητα κατά τη διάρκεια της οντογένεσης (Pelster 2002, Bagatto 2005).

Το zebrafish αποτελεί τα τελευταία χρόνια ένα από τα καλύτερα μοντέλα μελέτης της αναπτυξιακής βιολογίας και εμβρυολογίας. Η εκτενής γενετική ανάλυση του γονιδιώματός του σε συνδυασμό με το διαφανές κατά την εμβρυική και νυμφική ανάπτυξη του σώμα, έχει προσφέρει τη δυνατότητα της απεικόνισης των δομών και των λειτουργιών του *in vivo*. Η καρδιά του zebrafish είναι από τα πρώτα όργανα που σχηματίζονται και λειτουργούν (48hpf). Ο καρδιακός παλμός αλλάζει κατά την ανάπτυξη ακολουθώντας διαφορετικά μοτίβα σε κάθε οργανισμό. Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να μελετήσει την επίδραση του οντογενετικού σταδίου/ηλικία (dpf) στον καρδιακό παλμό νεαρών ατόμων zebrafish καθώς και την επίδραση θερμοκρασίας ανάπτυξης και του αναισθητικού, στην παραπάνω σχέση.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Αυγά συλλέχθηκαν από το ίδιο stock γεννητόρων, και τοποθετήθηκαν σε επωαστήρες ενυδρείων τριών διαφορετικών θερμοκρασιών 24°C, 28°C και 32°C (Εικ.1). Ο εγκλιματισμός των αυγών κράτησε 5hrs ώστε να αποφευχθούν απότομες θερμοκρασιακές αλλαγές. Τα αναπτυξιακά στάδια που πραγματοποιήθηκαν οι δειγματοληψίες, έχουν αναγνωριστεί μορφολογικά από τους (Parichy, Elizondo *et al.* 2009). Η μέτρηση των παλμών πραγματοποιήθηκε σε ανάστροφο μικροσκόπιο Zeiss Observer.D1 με θερμοκρασιακά ελεγχόμενες πλάκες. Για τον υπολογισμό του καρδιακού ρυθμού, μετρήθηκαν οι παλμοί που μεσολάβησαν μέσα σε 15sec. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων έλαβε χώρα χρήση 65ppm MS-222 (tricaine methanesulfonate) και 65ppm ισοφλουράνιο (isoflurane) ως κατάλληλη αναισθητική φόρμουλα για παλμογραφήματα ατόμων zebrafish προτεινόμενη από τους (Huang, Hsieh *et al.* 2010). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε δύο επαναλήψεις (Replicate 1 και Replicate 2).

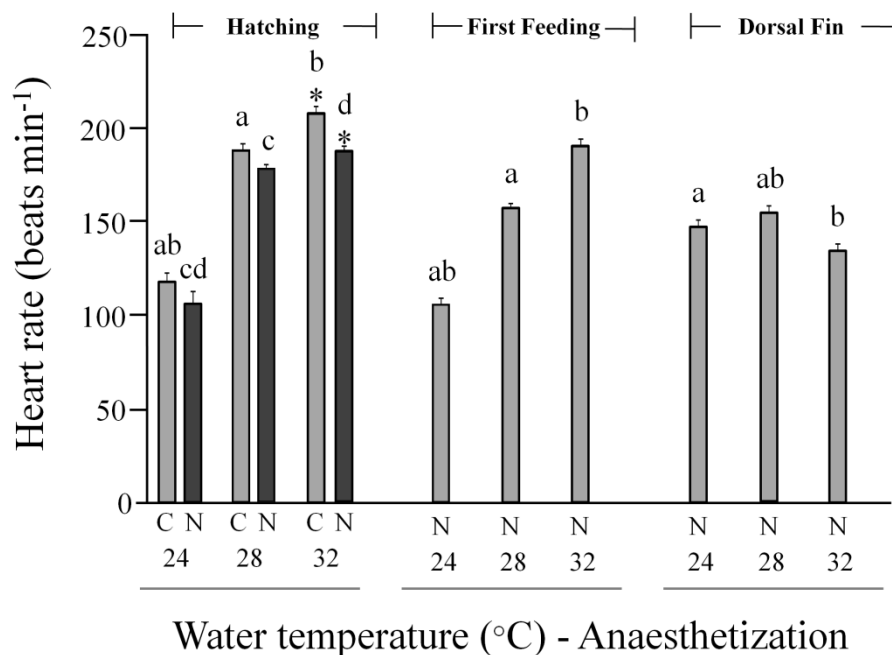
Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το πρόγραμμα STATISTICA 7. Ο έλεγχος της σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ των διαφορετικών συνθηκών ελέγχθηκε με το μη παραμετρικό τεστ Kruskal-Wallis.



Εικόνα 1: Επίδραση διαφορετικών θερμοκρασιών κατά της διάρκεια του εμβρυϊκού και νυμφικού σταδίου.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Επίδραση αναισθησίας κατά την εκκόλαψη



Εικόνα 2: Μέσος όρος παλμών (beats min⁻¹) σε τρία οντογενετικά στάδια (Hatching, First feeding και Dorsal Fin) στις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης (24, 28, 32°C). Οι αστερίσκοι υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των παλμών των αναισθητοποιημένων (N) και των μη αναισθητοποιημένων ατόμων (C) κατά την εκκόλαψη (Hatching). Τα ίδια γράμματα υποδεικνύουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των θερμοκρασιακών συνθηκών για το κάθε οντογενετικό στάδιο σε αναισθητοποιημένα και μη αναισθητοποιημένα άτομα. (C), control, χωρίς την επίδραση αναισθησίας; (N), New Formula, με την επίδραση αναισθησίας. ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis). Γραμμές σφάλματος = $\pm 1SE$.

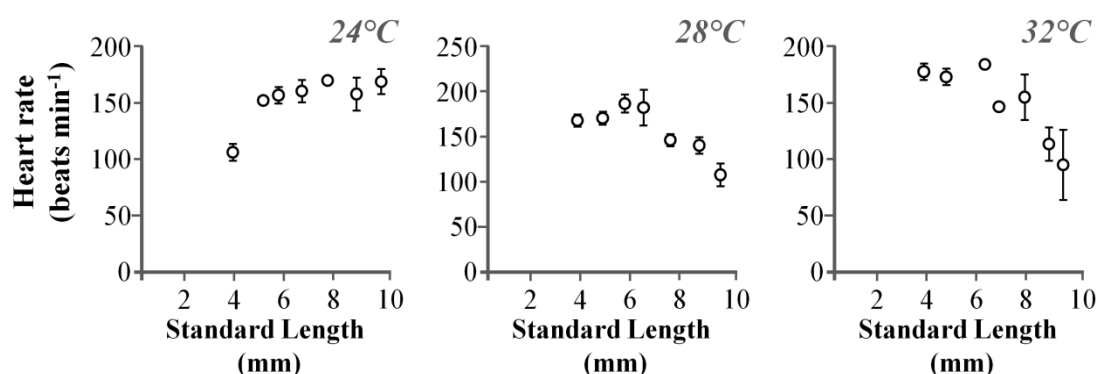
Στην Εικόνα 2 παρατίθενται ο παλμός των ατόμων που καταγράφηκε σε τρία αναπτυξιακά στάδια (εκκόλαψης (hatching), έναρξης εξωγενούς θρέψης (first feeding) και εμφάνισης του ραχιαίου πτερυγίου (dorsal fin). Η στατιστική ανάλυση της επίδρασης του αναισθητικού στον καρδιακό παλμό (Εικόνα 2, αστερίσκοι) επιβεβαίωσε τη μη σημαντική στατιστικά επίδραση της New Formula σε σύγκριση με μη αναισθητοποιημένα άτομα κατά την εκκόλαψη (Hatching) για τους 24 και 28°C ($p > 0.05$, Kruskal-Wallis test). Αντίθετα, στους 32°C τα αναισθητοποιημένα άτομα είχαν σημαντικά χαμηλότερους παλμούς σε σύγκριση με τα μη αναισθητοποιημένα (control) άτομα ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test).

Επίδραση θερμοκρασίας στον καρδιακό παλμό κατά την οντογένεση νυμφών zebrafish

Στην Εικόνα 2 απεικονίζεται η μεταβολή του μέσου όρου των παλμών για τα τρία πρώτα υπό μελέτη οντογενετικά στάδια (Hatching, First Feeding, Dorsal Fin). Η θερμοκρασία επέδρασε σημαντικά στο μέσο όρο των παλμών. Στο στάδιο της εκκόλαψης, τα μη αναισθητοποιημένα άτομα των 24°C είχαν σημαντικά μικρότερο μέσο όρο παλμών από τα άτομα των 28 και 32°C αντίστοιχα ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test). Στο στάδιο της έναρξης της διατροφής, τα αναισθητοποιημένα άτομα των 24°C είχαν σημαντικά μικρότερο μέσο όρο παλμών από τα αναισθητοποιημένα άτομα των 28 και 32°C αντίστοιχα ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test). Στο στάδιο έναρξης της διατροφής, τα αναισθητοποιημένα άτομα των 28°C είχαν σημαντικά μεγαλύτερο μέσο όρο παλμών από τα αναισθητοποιημένα άτομα των 24 και 32°C αντίστοιχα ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test).

Επίδραση οντογενετικού σταδίου στον καρδιακό παλμό νυμφών zebrafish σε κάθε θερμοκρασία

Στο δεύτερο σκέλος του πειράματος εξετάστηκε ο τρόπος διαφοροποίησης της καρδιακής λειτουργίας κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των νυμφών zebrafish, από την εκκόλαψη (Hatching) μέχρι τα ψάρια να φτάσουν το μέγεθος των 10 mm (SL) (Εικόνα 3). Για τη μέτρηση των παλμών των νυμφών χρησιμοποιήθηκε η New Formula αναισθητικών.



Εικόνα 3: Μεταβολή καρδιακού παλμού (beats min⁻¹) νυμφών zebrafish στους 24°C (A), στους 28°C (B) και στους 32°C (C) μέχρι τυπικό μήκος (SL) 10mm. Γραμμές σφάλματος = ±1SE.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3, παρατηρήθηκαν συνολικά υψηλότεροι παλμοί στους 28 °C και 32 °C από τι στους 24 °C. Το μοτίβο επίσης της μεταβολής διαφοροποιείται στην κάθε θερμοκρασία. Η απόκριση της καρδιακής λειτουργίας στις θερμοκρασίες των 28 °C και 32 °C ακολουθεί το ίδιο βασικό μοτίβο με τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια να παρουσιάζουν ομοιογένεια και σταθερότητα στον καρδιακό ρυθμό μέχρι τα 5 – 6 mm. Και στις δύο συνθήκες, μετά από αυτό το στάδιο, παρατηρείται πτώση του καρδιακού ρυθμού καθώς τα άτομα αυξάνονται σε μέγεθος. Αντίθετα, στους 24 °C το πρότυπο μεταβολής μέχρι τα 10mm έχει αρχίσει να σταθεροποιείται. Η διαφορετική απόκριση των ψαριών που αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία 24 °C χαρακτηρίζεται από το μικρότερο μήκος σώματος στο οποίο αλλάζει το μοτίβο μεταβολής του καρδιακού ρυθμού (στα 4 mm, SL) και από την ανοδική τάση που παρουσιάζει μετά από αυτό το σημείο ο καρδιακός παλμός.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Bagatto B (2005) Ontogeny of cardiovascular control in zebrafish (*Danio rerio*): Effects of developmental environment *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 141:391–400

Parichy DM, Elizondo MR, Mills MG, Gordon TN and Engeszer RE. (2009) Normal Table of Postembryonic Zebrafish. *Anatomy of the Living Fish Developmental Dynamics* 238:2975–3015

Pelster B (2003) Developmental plasticity in the cardiovascular system of fish, with special reference to the zebrafish *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 133:547–553

Wei-Chang Huang, Yi-Shan Hsieh, I-Hui Chen, Chieh-Huei Wang, Han-Wei Chang, Chung-Chi Yang, Tien-Hsiung Ku, Shin-Rung Yeh and Yung-Jen Chuang (2010) Combined Use of MS-222 (Tricaine) and Isoflurane Extends Anesthesia Time and Minimizes Cardiac Rhythm Side Effects in Adult Zebrafish. *ZEBRAFISH* 7: 3