



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ & ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**“Μοριακή και ενδοκρινική ρύθμιση της αύξησης στα πρώτα  
αναπτυξιακά στάδια του μαγιάτικου, *Seriola dumerili*”**

**Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία**

**Λιαμάκη Άννα**

**Ηράκλειο, 2023**

**Τριμελής εξεταστική επιτροπή:**

**Μιχαήλ Παυλίδης, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, επιβλέπων**

**Νικόλαος Πουλακάκης, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης, μέλος**

**Νικόλαος Παπανδρουλάκης, Ερευνητής Α, ΕΛΚΕΘΕ, μέλος**

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες σε όλους όσους συνέφεραν στο να φέρω εις πέρας την παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα της εργασίας αυτής, κύριο Μιχαήλ Παυλίδη για την πολύτιμη βοήθεια του και την σωστή καθοδήγηση για τη συγγραφή της εργασίας. Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την κυρία Jelena Radogicic και την κυρία Ελευθερία Φανουράκη για την άμεση και ανιδιοτελή βοήθεια, όσον αφορά το εργαστηριακό κομμάτι, καθώς επίσης και τον Νίκο Μητριζάκη (ΕΛΚΕΘΕ) για την διεξαγωγή της εκτροφής και την παράθεση των δειγμάτων. Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο γονείς μου για την αμέριστη συμπαράσταση, βοήθεια και προ πάντων κατανόηση και ανοχή καθ' όλο το χρονικό διάστημα των σπουδών μου.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μαγιάτικο, *Seriola dumerili*, εμφανίζει μεγάλη ποικιλότητα μεγεθών (παραλλακτικότητα), η οποία ξεκινάει από τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια και μπορεί να φτάσει σε ποσοστό (CV%) 200 έως 300% κατά τη διάρκεια της προπάχυνσης και πάχυνσης αντίστοιχα, δημιουργώντας διαχειριστικά προβλήματα. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η μοριακή και ενδοκρινική βάση της παραλλακτικότητας στο μαγιάτικο μελετώντας το μονοπάτι της όρεξης, του μεταβολισμού και της αύξησης. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η έκφραση γονιδίων του άξονα αυξητικής ορμόνης – ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 1 (GH – IGF-1 axis), υποθαλάμου – υπόφυσης – θυρεοειδή (HPT axis) καθώς και ρυθμιστικών ορμονών της όρεξης και του μεταβολισμού (λεπτίνη, γκρελίνη, νευροπεπτίδιο NPY) στο σώμα προνυμφών και νυμφών. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας νερού (20°C και 24°C) κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (έμβρυο - πρώτο τάισμα), ενώ μετά το πρώτο τάισμα η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 24°C σε όλες τις δεξαμενές. Επί προσθέτως, εξετάστηκαν δύο διαφορετικά διατροφικά πρωτόκολλα ζωντανής τροφής, τα οποία αποτελούνταν (α) από χορήγηση μόνο τροχοζώων ή (β) από ένα συνδυασμό τροχοζώων και κωπηπόδων. Δείγματα από κάθε συνθήκη συλλέχθηκαν στα ακόλουθα στάδια/φάσεις πρώτης ανάπτυξης: πρώτο τάισμα (3 – 3,5 mm), κάμψη νωτοχορδής (5 – 6 mm), τέλος νυμφικής εκτροφής (10 – 14 mm) και μέσο μεταμόρφωσης (15 – 20mm). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ρύθμιση της θερμοκρασίας στους 20°C κατά τη πρώιμη ανάπτυξη στο αυτότροφο στάδιο (έμβρυο – πρώτο τάισμα), ήταν ευνοϊκότερη για την έκφραση των περισσότερων γονιδίων που εξετάστηκαν, χωρίς ωστόσο να παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των δύο θερμοκρασιών στην έκφραση των γονιδίων του άξονα GH – IGF-1. Στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια όπου εισήχθη η εξωγενής διατροφή, καλύτερα αποτελέσματα έδωσε αυτή που αποτελούνταν από τροχοζώα & κωπήποδα. Συνεπώς, το συμπέρασμα που προέκυψε στο τέλος της νυμφικής εκτροφής ήταν ότι η μειωμένη θερμοκρασία κατά το αυτότροφο στάδιο και η προσθήκη των κωπηπόδων στην διατροφή των ιχθυονυμφών βελτίωσε την αύξηση και ανάπτυξη τους, καθώς ελαχιστοποίησε και το φαινόμενο της παραλλακτικότητας .

Λέξεις κλειδιά: μαγιάτικο, παραλλακτικότητα, γονίδια, ορμόνες

## ABSTRACT

The greater amberjack (*Seriola dumerili*) shows great size diversity (variability), which starts from the first developmental stages and can reach a percentage (CV%) of 200 to 300% during pre - fattening and fattening respectively, creating management problems. In the present study, the molecular and endocrinal basis of variability in the greater amberjack were investigated by studying the pathways of appetite, metabolism and growth. Specifically the expression of the genes of the GH-IGF axis and HPT (Hypothalamic – Pituitary – Thyroid) axis as well as regulatory hormones of appetite and metabolism (leptin, ghrelin, neuropeptide NPY) were studied in the bodies of pre larvae and larvae. Different water temperature conditions (20°C and 24°C) during the first developmental stages (embryo – first feeding) were examined and temperature was regulated at 24°C in all the tanks after the first feeding. Additionally two different feeding protocols which consisted of a) rotifers and b) a combination of rotifers and copepods where the food was alive were compared. Samples from each condition were collected during the following stages/phases of the first developmental stages: first feeding (3 – 3,5 mm), flexion of notochord (5 – 6 mm), end larvae rearing (10 – 14 mm) and mid-metamorphosis (15 – 20 mm). The results showed that the regulation of the temperature at 20°C during the early developmental in the autotrophic stage (embryo – first feeding), was more ideal for the expression of most of the genes that examined, without observing differences between the two temperatures in the expression of genes that included in the GH – IGF-1 axis. In the next developmental stages where exogenous food was introduced, the consisted of rotifers & copepods gave better results. Therefore, the conclusion reached at the end of the larvae rearing was that the reduced temperature during the autotrophic stage and the addition of copepods in the diet of the fish larvae improved their growth and development, as well as minimized the phenomenon of variability.

Key words: greater amberjack, variability, genes, hormones

## Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1 Εισαγωγικά για το Μαγιάτικο ( <i>Seriola dumerili</i> Risso, 1810) .....	1
1.2 Τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του μαγιάτικου .....	3
1.3 Ορμονικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης .....	6
1.3.1 Αυξητική Ορμόνη (GH) .....	6
1.3.2 Ινσουλινομιμητικοί αυξητικοί παράγοντες (IGFs).....	6
1.4 Ενδοκρινικοί ρυθμιστές της όρεξης .....	8
1.4.1 Γκρελίνη.....	8
1.4.2 Λεπτίνη .....	9
1.4.3 Νευροπεπτίδιο Υ (NPY).....	9
1.5 Θυρεοειδικές ορμόνες .....	10
1.6 Σκοπός της εργασίας .....	12
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	13
2.1 Σχεδιασμός του πειράματος .....	13
2.1.1 Πείραμα 1: Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης.....	13
2.1.2 Πείραμα 2: Επίδραση της χορήγησης ζωντανής τροφής .....	14
2.2 Δειγματοληψίες.....	14
2.3 Μοριακή ρύθμιση .....	15
2.3.1 Εξαγωγή RNA.....	15
2.3.2 Ποσοτικοποίηση του ολικού RNA .....	16
2.3.3 Σύνθεση cDNA-Real Time PCR (qPCR).....	16
2.3.4 Σχεδιασμός ειδικών εκκινήτων .....	17
2.3.5 Ποσοτική PCR Real Time PCR (qPCR).....	18
2.4 Ενδοκρινική ρύθμιση.....	19
2.4.1 Προετοιμασία των δειγμάτων (εκχύλιση ορμονών) .....	20
2.4.2 Αναλύσεις.....	21
2.5 Στατιστική ανάλυση.....	22
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	23
3.1 Αύξηση.....	23
3.2 Μοριακές αναλύσεις .....	24
3.2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στην έκφραση γονιδίων στο πρώτο τάισμα. .....	24
3.2.2 Επίδραση ζωντανής τροφής.....	26

3.3 Ενδοκρινικές Αναλύσεις.....	42
3.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη συγκέντρωση των ορμονών στο πρώτο τάισμα .....	42
3.3.2 Επίδραση ζωντανής τροφής.....	43
3.4 Μη παραμετρική ανάλυση συσχέτισης των γονιδίων (Spearman's Rank-Order Correlation) .....	47
3.5 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA) .....	48
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	52
4.1 Επίδραση της θερμοκρασίας και της διατροφής στην αύξηση των νυμφών.....	52
4.2 Μεταβλητότητα μήκους.....	53
4.3 Γονιδιακή και ορμονική ρύθμιση .....	53
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	58

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Εισαγωγικά για το Μαγιάτικο (*Seriola dumerili*, Risso, 1810)

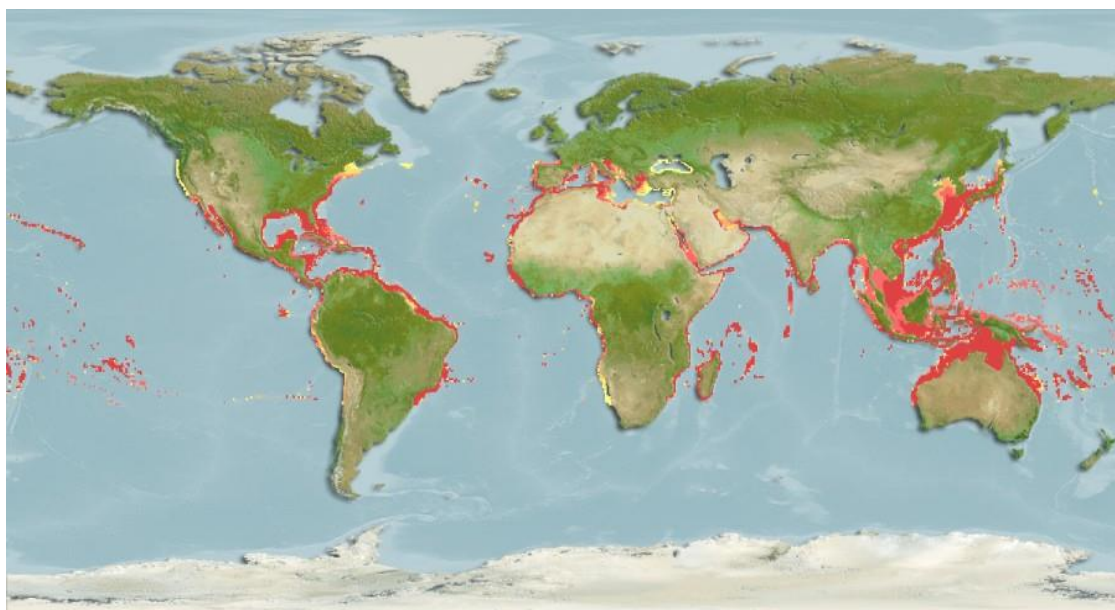
Φύλο:	Χορδωτά
Κλάση:	Οστειχθύες
Υφομοταξία:	Ακτινοπτερύγιοι
Υπέρταξη:	Τελεόστεοι
Τάξη:	Περκόμορφα
Οικογένεια:	Carangidae
Γένος:	<i>Seriola</i>
Είδος:	<i>Seriola dumerili</i>



Εικόνα 1. Μαγιάτικο (*Seriola dumerili*), [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

Το μαγιάτικο (*Seriola dumerili*, Εικόνα 1) είναι ένα είδος το οποίο κατανέμεται σε αρκετές περιοχές και σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών οι οποίες κυμαίνονται από 17 έως 27°C (Nakada, 2000) (Εικόνα 2). Έχει έντονη παρουσία στη Μεσόγειο, όπου ευνοείται από το μεσογειακό κλίμα, αλλά μπορεί να βρεθεί και σε περιοχές όπου το κλίμα είναι τροπικό, υποτροπικό και εύκρατο (Ατλαντικός, Ινδο-Ειρηνικός ωκεανός) (Manooch III and Potts, 1997).





**Εικόνα 2.** Χάρτης της παγκόσμιας κατανομής για το Μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) [www.aquamaps.org](http://www.aquamaps.org), version of Aug. 2016.

Στην ενήλική του μορφή είναι μοναχικό είδος και σπάνια σχηματίζει ομάδες των 2-3 ατόμων, ενώ τα νεότερα ψάρια δημιουργούν κοπάδια. Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO) των Ηνωμένων Εθνών, το μαγιάτικο αποτελεί βενθοπελαγικό είδος της υποτροπικής ζώνης, εντοπίζεται τόσο σε βαθιές παράκτιες περιοχές, όσο και στην ανοιχτή θάλασσα και κατανέμεται συνήθως σε βάθη από 18 έως 360 μέτρα. Το μέγιστο μήκος που έχει καταγραφεί είναι 180 εκατοστά, ενώ το μέγιστο βάρος είναι 80,6 κιλά, συνήθως όμως κυμαίνεται στα 110 εκατοστά και 25-40 κιλά (Fischer, 1987). Η διατροφή του κατά τα νεαρά στάδια στηρίζεται στο ζωοπλαγκτόν, στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια τα θηράματά του είναι μεγαλύτεροι βενθικοί οργανισμοί και τελικώς τα ενήλικα άτομα τρέφονται με πελαγικά ψάρια και κεφαλόποδα. (FAO, 2016)

Το μαγιάτικο είναι γονοχωριστικό είδος και δεν εμφανίζει σεξουαλικό διμορφισμό. Στην Μεσόγειο τα μαγιάτικα ωριμάζουν σεξουαλικά σε ηλικία των 4 και 5 ετών και σε μήκος 109 - 113cm, αλλά σε διαφορετικά γεωγραφικά πλάτη η σεξουαλική ωρίμανση μπορεί να επέλθει νωρίτερα, στα 2 - 5 έτη. Η φωτοκία του μαγιάτικου διαρκεί 3 - 5 μήνες και ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος αρχίζει τον Φεβρουάριο και ολοκληρώνεται τον Σεπτέμβρη. Στην Μεσόγειο τα ενήλικα γεννούν

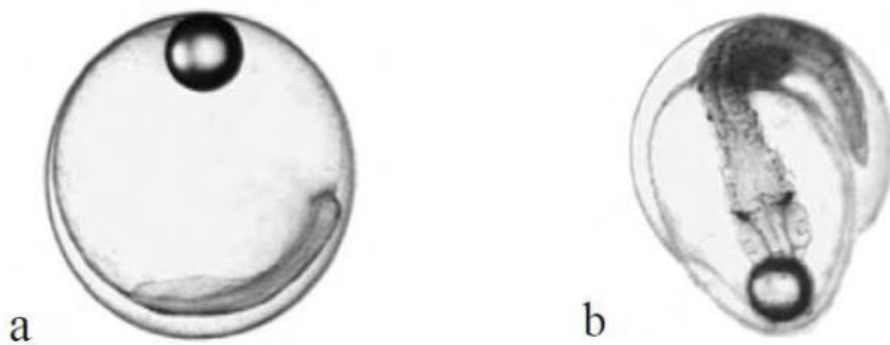
από Μάιο έως Ιούλιο (Marino et al., 1995). Αποτελεί πολλαπλό εναποθέτη αυγών με υψηλή γονιμότητα και απελευθερώνει πελαγικά αυγά. (FAO, 2016)

Επιπροσθέτως έχει μεγάλη οικονομική σημασία, διότι έχει ταχεία ανάπτυξη με καλή ποιότητα σάρκας και εμφανίζει μεγάλη ζήτηση στην παγκόσμια αγορά (Nakada, 1999, Thompson et al., 1999). Το γεγονός αυτό το καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο είδος για τις ιχθυοκαλλιέργειες. Η εκτροφή του μαγιάτικου ξεκίνησε το 1970 στην Ιαπωνία, με την Μεσόγειο να ακολουθεί μια δεκαετία αργότερα (Sicuro and Luzzana, 2016). Αν και η Ιαπωνία είναι κυρίαρχη στην εκτροφή του μαγιάτικου, οι απαντήσεις για την αναπαραγωγή του είδους με ποιοτικά αυγά δόθηκαν από την Μεσόγειο (Fakriadis et al., 2020, Mylonas et al., 2004, Zupa et al., 2017).

Το μαγιάτικο είναι ένα είδος που προσαρμόζεται εύκολα σε συνθήκες αιχμαλωσίας και παρουσιάζει μεγάλο ποσοστό επιβίωσης (García and Díaz, 1995, Jerez et al., 2006). Ωστόσο στο συγκεκριμένο είδος εμφανίζεται μεγάλη ποικιλότητα μεγεθών (παραλλακτικότητα), η οποία ξεκινάει από τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια και μπορεί να φτάσει σε ποσοστό (CV%) 200 έως 300% κατά τη διάρκεια της προπάχυνσης και πάχυνσης αντίστοιχα (N. Παπανδρουλάκης, προσωπική επικοινωνία). Το γεγονός αυτό επιφέρει προβλήματα στην υγεία και στην αναπαραγωγική ικανότητα του ζώου, στην ποιότητα των προϊόντων και τελικώς στο κόστος παραγωγής. Η παραλλακτικότητα στο μέγεθος μπορεί να προκαλείται από φυσιολογικές διεργασίες (π.χ. μεταβολισμός, πρόσληψη και αξιοποίηση της τροφής, στρες), από περιβαλλοντικούς, διατροφικούς και διαχειριστικούς παράγοντες καθώς και από σχέσεις ιεραρχίας και ανταγωνισμού.

## **1.2 Τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του μαγιάτικου**

Τα αυγά του μαγιάτικου έχουν σχήμα σφαιρικό και είναι διαφανή με άχρωμη και τμηματοποιημένη λέκιθο. Αποτελούνται από μια σταγόνα λιπιδίου, η οποία αφού πραγματοποιηθεί η γονιμοποίηση κατανέμεται περιφερειακά του αυγού. Σε πειραματικές συνθήκες εκτροφής το έμβρυο εμφανίζεται συνήθως 10 ώρες μετά τη γονιμοποίηση (Εικόνα 3) και η εκκόλαψη του γίνεται μετά από 30 - 34 ώρες σε θερμοκρασία  $23,5 \pm 1,0$  °C (Papandroulakis et al., 2005).

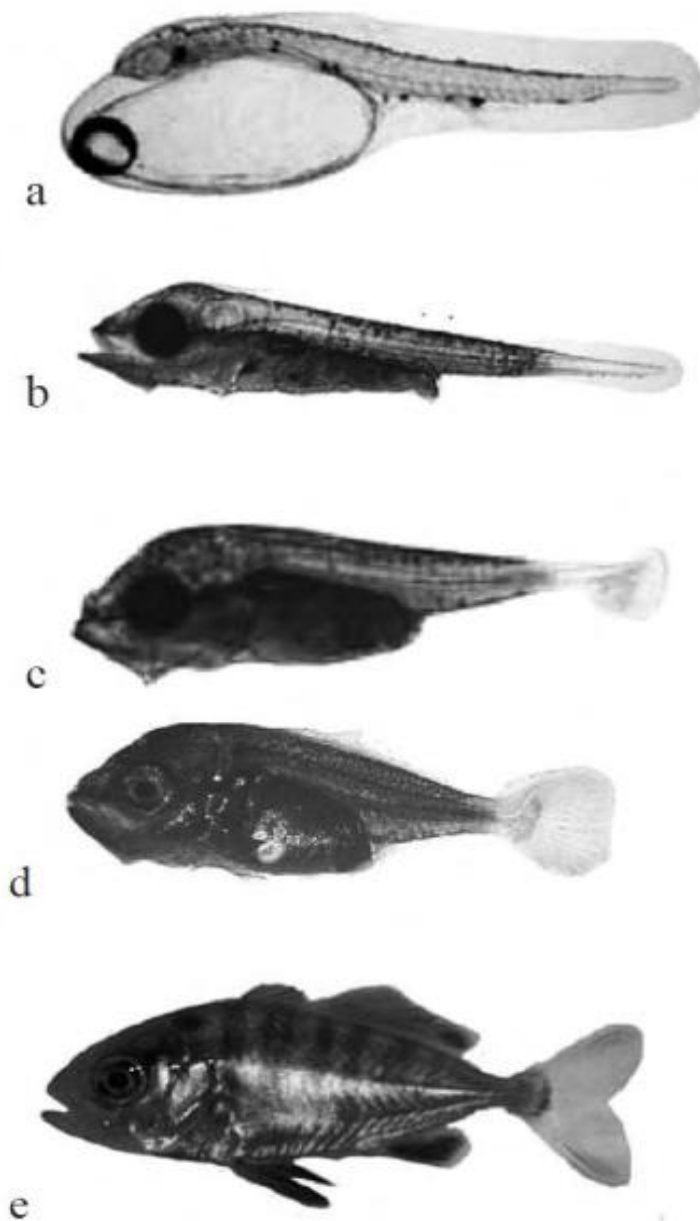


**Εικόνα 3.** Εμβρυϊκή ανάπτυξη στο μαγιάτικο. a) Εμφάνιση του εμβρύου b) εκκόλαψη (Papandroulakis et al., 2005)

Μετά την εκκόλαψη ξεκινάει το αυτότροφο στάδιο κατά το οποίο οι προνύμφες τρέφονται αποκλειστικά από το λεκιθικό σάκο και λιγότερο από τη σταγόνα ελαίου έως ότου καταναλωθούν πλήρως τα ενεργειακά αποθέματα. Η διαδικασία αυτή στο μαγιάτικο ολοκληρώνεται περίπου την τρίτη ημέρα, όπου και παρατηρείται το άνοιγμα του στόματος και ξεκινάει η έναρξη του ετερότροφου σταδίου, η κατανάλωση δηλαδή εξωγενούς διατροφής (Papandroulakis et al., 2005).

Το επόμενο στάδιο που ακολουθεί ονομάζεται ετερότροφο στάδιο και περιλαμβάνει τη φάση της μεταμόρφωσης κατά την οποία οι νύμφες μετατρέπονται σε ιχθύδια (ανήλικα άτομα). Κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης συμβαίνουν αρκετές μορφολογικές και φυσιολογικές αλλαγές, όπως σχηματισμός λεπιών, πτερυγίων και αρκετών οργάνων. Το γέμισμα της νυκτικής κύστης, η οποία βρίσκεται στο νωτιαίο τμήμα της κοιλιακής περιοχής, γίνεται περίπου την πέμπτη ημέρα μετά την εκκόλαψη (Papandroulakis et al., 2005). Όσο προχωράει το νυμφικό στάδιο παρατηρείται ανοδική κάμψη της νωτοχορδής (flexion) με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ακτινών και υποουρικών οστών για τον σχηματισμό του ουραίου πτερυγίου. Οδεύοντας προς το τέλος του νυμφικού σταδίου παρατηρείται ο σχηματισμός των λεπιών και το σώμα της ιχθυονύμφης έχει καλυφθεί πλήρως από χρωματοφόρα κύτταρα, με αποτέλεσμα η ιχθυονύμφη να μην είναι διαφανής (Kendall Jr, 1984)

Οι μορφολογικές αλλαγές κατά τη διάρκεια των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων της παρουσιάζονται παρακάτω (Εικόνα 4).



**Εικόνα 4.** Αλλαγές στην μορφολογία του μαγιάτικου (*Seriola dumerili*) κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (a) Προνύμφη αμέσως μετά την εκκόλαψη (συνολικό μήκος  $2.87 \pm 0,17$  mm), (b) Ιχθυονύμφη προ-κάμψης (5 ημερών) (συνολικό μήκος  $3,87 \pm 0,23$  mm), (c) Ιχθυονύμφη στο στάδιο της κάμψης της νωτοχορδής (12 ημερών) (συνολικό μήκος  $5,29 \pm 0,24$  mm), (d) Ιχθυονύμφη στο στάδιο που έπεται της κάμψης (20 ημερών) (συνολικό μήκος  $8,55 \pm 0,83$  mm), (e) Ιχθύδιο μαγιάτικου 40 ημέρες μετά την εκκόλαψη ( $35,63 \pm 6,52$  mm) (Papandroulakis et al., 2005).

### **1.3 Ορμονικοί ρυθμιστές της ανάπτυξης**

Η σωματική ανάπτυξη στα ψάρια, όπως και σε όλα τα σπονδυλωτά, ρυθμίζεται από τον άξονα GH/IGF, ο οποίος περιλαμβάνει την αυξητική ορμόνη (GH, Growth Hormone) που παράγεται στην υπόφυση, καθώς και τους ινσουλινομιμητικούς αυξητικούς παράγοντες (IGFs, Insulin like Growth Factors) (Wood et al., 2005).

#### **1.3.1 Αυξητική Ορμόνη (GH)**

Πρόκειται για έναν ενδοκρινικό ρυθμιστή που συμμετέχει σε αρκετές φυσιολογικές διεργασίες των ψαριών, μεταξύ αυτών στην ωσμωρύθμιση, στον μεταβολισμό πρωτεϊνών, λιπών και υδατανθράκων, καθώς και στην ανάπτυξη και αναπαραγωγή (Bertucci et al., 2019). Η αυξητική ορμόνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που παράγεται στην αδενούποφυση και της οποίας η έκκριση ρυθμίζεται με τη βοήθεια υποθαλαμικών παραγόντων, απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης (Growth Hormone Releasing Hormone, GHRH) και αναστολής της αυξητικής ορμόνης ή σωματοστατίνης (Growth Hormone Inhibiting Hormone). Στην συνέχεια με τη βοήθεια των υποδοχέων της αυξητικής ορμόνης (Growth Hormone Receptors), ξεκινάει η παραγωγή και απελευθέρωση του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1) στο ήπαρ, το οποίο είναι το κύριο όργανο που ευθύνεται για την παραγωγή και κυκλοφορία του IGF-1 στο πλάσμα (Mathews et al., 1986). Ο IGF-1 ενισχύει περαιτέρω την αύξηση και την ανάπτυξη των ψαριών. Η παραγωγή της αυξητικής ορμόνης και κατ' επέκταση η σύνθεση των IGFs επηρεάζονται από περιβαλλοντικούς, διατροφικούς και ορμονικούς παράγοντες, καθώς επίσης εξαρτώνται και από το στάδιο ανάπτυξης (Reinecke, 2010, Sruthi et al., 2018)

#### **1.3.2 Ινσουλινομιμητικοί αυξητικοί παράγοντες (IGFs)**

Οι ινσουλινομιμητικοί αυξητικοί παράγοντες 1 και 2 (IGF-1, IGF-2) είναι πρωτεϊνικές ορμόνες και έχουν δομή παρόμοια με την προϊνσουλίνη. Για να ασκήσουν την βιολογική τους δράση, συνδέονται με ειδικούς υποδοχείς (υποδοχείς του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα, IGF - receptors, 1 και 2) οι οποίοι

κατανέμονται στην επιφάνεια σχεδόν όλων των κυττάρων. Ο υποδοχέας του IGF-1 παρουσιάζει δομή παρόμοια με τον υποδοχέα της ινσουλίνης και έχει την ικανότητα να δεσμεύει και τους δυο IGFs καθώς και σε μικρό βαθμό την ινσουλίνη, ενώ ο υποδοχέας του IGF-2 δεσμεύει κυρίως τον IGF-2, λιγότερο τον IGF-1 και δεν έχει παρατηρηθεί να δεσμεύει την ινσουλίνη (Katz et al., 1995). Στα ψάρια αναφέρεται ότι ο υποδοχέας του IGF-1, υπάρχει σε αφθονία σε όλους τους ιστούς σε σχέση με τους υποδοχείς της ινσουλίνης όπου είναι λιγότεροι (Parrizas et al., 1995). Οι IGFs έχουν αυξητικές ιδιότητες καθώς συμμετέχουν στην ανάπτυξη και στην διαφοροποίηση αρκετών οργάνων, οστών και μυών και η έκφραση των επιπέδων τους ρυθμίζεται από την πρόληψη της τροφής (Duan, 1998, Moriyama et al., 2000). Όπως προαναφέρθηκε ο IGF-1 παράγεται κυρίως στο ήπαρ και από εκεί μεταφέρεται στους ιστούς στόχους με τον κλασσικό ενδοκρινικό τρόπο, ενώ ο IGF-2 εκτός από το ήπαρ, έχει βρεθεί σε αρκετά όργανα όπως για παράδειγμα στα βράγχια, στα μάτια, στον εγκέφαλο και πιστεύεται ότι δρα με παρακρινικό ή αυτοκρινικό τρόπο (Codina et al., 2008, Wood et al., 2005). Σύμφωνα με έρευνες έχει δείχθει ότι σε αρκετά είδη ιχθύων ο IGF-2 συμμετέχει και σε μεταβολικές διεργασίες ως μεταβολική ορμόνη (Peterson and Waldbieser, 2009). Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η παραγωγή του IGF-2 ρυθμίζεται επίσης από την GH στους τελεόστεους ιχθύες, ενώ στα υπόλοιπα σπονδυλωτά η GH ρυθμίζει πιθανότατα μόνο την παραγωγή του IGF-1 (Triantaphyllopoulos et al., 2020).

Ένα ξεχωριστό χαρακτηριστικό των IGFs που τους κάνει να διαφέρουν από την ινσουλίνη, είναι η κυκλοφορία στον ορό του πλάσματος αρκετών δεσμευτικών πρωτεϊνών (IGFBPs). Στα θηλαστικά έχουν αναγνωριστεί έξι δεσμευτικές πρωτεΐνες, IGFBP1-IGFBP6 (Oh et al., 1996). Η σύνθεσή τους γίνεται σε διάφορους ιστούς και κύτταρα και ρυθμίζουν τις τοπικές δράσεις των IGFs (Duan, 2002). Η δομή των έξι IGFBPs είναι παρόμοια, αλλά εμπλέκονται σε διαφορετικές λειτουργίες και ιδιότητες, όπως στην αναστολή ή διέγερση των βιολογικών δράσεων των IGFs (Fansa et al., 2002). Στα ψάρια έχει γίνει αναφορά δεσμευτικών πρωτεϊνών σε διάφορους ιστούς, καθώς υπάρχουν τουλάχιστον τρεις IGFBPs στο πλάσμα των ψαριών (Anderson et al., 1993, Niu et al., 1993).

## 1.4 Ενδοκρινικοί ρυθμιστές της όρεξης

Η πρόσληψη και ο μεταβολισμός της τροφής είναι απαραίτητοι παράγοντες για την ομαλή ανάπτυξη των ψαριών. Η διαθεσιμότητα της τροφής επηρεάζει πέραν της ανάπτυξης, την υγεία των ψαριών, τις καθημερινές τους δραστηριότητες καθώς και την αναπαραγωγή. Τα κύρια όργανα που εκκρίνουν ορμόνες που σχετίζονται με την ρύθμιση της όρεξης βρίσκονται στον εγκέφαλο καθώς και σε γαστρεντερικούς ιστούς.

### 1.4.1 Γκρελίνη

Πρόκειται για μια πεπτιδική ορμόνη με ορεξιογόνες δράσεις που ρυθμίζει την πρόσληψη της τροφής και συνεπώς, την ενεργειακή ισορροπία, την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή (Castaneda et al., 2010, Kaiya et al., 2008). Η γκρελίνη ασκεί τις φυσιολογικές της διεργασίες δεσμεύοντας τον υποδοχέα 1a που εκκρίνει την αυξητική ορμόνη (GHS-R1a) ο οποίος έχει βρεθεί σε αρκετά είδη ψαριών (Kaiya et al., 2009a, Rønnestad et al., 2010, Angotzi et al., 2013, Gong et al., 2013, Jönsson, 2013). Στα περισσότερα είδη η σύνθεση της γκρελίνης γίνεται στο γαστρεντερικό σύστημα με την κύρια έκφραση να παρουσιάζεται στο στομάχι, με εξαιρέσεις ωστόσο να υπάρχουν σε είδη που δεν διαθέτουν πλήρες στομάχι, όπως είναι το χρυσόψαρο (*Carassius auratus*), όπου εντοπίζεται στο έντερο (Unniappan et al., 2002). Έχει ανιχνευτεί σε διάφορα όργανα και ιστούς, μεταξύ αυτών το πάγκρεας και η καρδιά, ενώ η έκφραση του mRNA της γκρελίνης στον εγκέφαλο και στον υποθάλαμο αρκετών ειδών υποδηλώνει τον ρόλο της ως ρυθμιστής της πρόσληψης τροφής. Σύμφωνα με μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η γκρελίνη που παράγεται στο στομάχι-έντερο ασκεί δράση στην υπόφυση ρυθμίζοντας την απελευθέρωση ορμονών της υπόφυσης, όπως είναι η αυξητική ορμόνη (GH) (Unniappan and Peter, 2005). Μια έρευνα που πραγματοποιήθηκε στα χέλια τα οποία ήταν εγκλιματισμένα σε θαλασσινό νερό, έδειξε ότι η γκρελίνη ανέστειλε την κατανάλωση νερού οπότε πιθανότατα συμβάλλει στα ψάρια και στην ωσμωρύθμιση (Kozaka et al., 2003). Ωστόσο, απαιτείται περισσότερη έρευνα για την πλήρη κατανόηση του ρόλου της γκρελίνης στα ψάρια, ιδιαίτερα στον τρόπο με τον οποίο αλληλεπιδρά με άλλες ορμόνες και παράγοντες για τη ρύθμιση της ενεργειακής ισορροπίας και του μεταβολισμού.

## 1.4.2 Λεπτίνη

Η λεπτίνη είναι μια πεπτιδική ορμόνη που κωδικοποιείται από το γονίδιο (*ob*) που σχετίζεται με την παχυσαρκία και βρέθηκε για πρώτη φορά στα θηλαστικά, σε παχύσαρκα ποντίκια *ob/ob* περίπου πριν από 30 χρόνια (Zhang et al., 1994). Στα ψάρια το γονίδιο της λεπτίνης εντοπίστηκε το 2005 στο *pufferfish* (*Takifugu rubripes*) και αυτή η καθυστέρηση οφείλεται στο γεγονός ότι τα ψάρια έχουν χαμηλό ποσοστό αλληλουχίας αμινοξέων πανομοιότυπη με την λεπτίνη των θηλαστικών (13 - 25%). (Kurokawa et al., 2005). Τα θηλαστικά έχουν ένα μόνο γονίδιο λεπτίνης, σε αντίθεση με πολλά είδη ψαριών που έχουν πολλά παράλογα λεπτίνης (π.χ., *lepA* και *lepB*) (Birsoy et al., 2013). Η σύνθεση της λεπτίνης στα θηλαστικά πραγματοποιείται από τα κύτταρα του λιπώδους ιστού και στη συνέχεια εκκρίνεται στο αίμα (Flier and Maratos-Flier, 2010). Ωστόσο η λεπτίνη στα ψάρια παρουσιάζει έλλειψη έκφρασης στο λιπώδη ιστό, με την κυριότερη πηγή έκφρασης του mRNA της λεπτίνης να είναι το ήπαρ (Kurokawa et al., 2005, Yuan et al., 2014). Η λεπτίνη είναι μια ορμόνη που συμμετέχει σε πολλές λειτουργίες, τόσο στα θηλαστικά, όσο και στα ψάρια, όπως στην πρόσληψη τροφής, στη ρύθμιση του σωματικού βάρους, στην ανάπτυξη, στην αναπαραγωγή καθώς και στην απόκριση στην καταπόνηση (stress). Μια από τις κυριότερες δράσεις που φαίνεται να έχει η λεπτίνη, είναι ότι μειώνει την όρεξη και συνεπώς την πρόσληψη τροφής σε αρκετά είδη ψαριών, ενδεχομένως ενεργοποιώντας τα ανορεξιογονικά νευροπεπτίδια POMC και CART (Gong et al., 2016, Volkoff, 2016). Ωστόσο οι δράσεις της λεπτίνης μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ειδών στα ψάρια.

## 1.4.3 Νευροπεπτίδιο Υ (NPY)

Το NPY είναι ένα νευροπεπτίδιο με ορεξιογόνες δράσεις και μαζί με τα πεπτίδια YY (PYY) και το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (PP), κατατάσσονται στην οικογένεια των παγκρεατικών πεπτιδίων (Holzer et al., 2012). Όλα τα είδη ψαριών παράγουν μόνο το νευροπεπτίδιο Υ (NPY) και το πεπτίδιο YY (PYY). Ωστόσο κάποια είδη ψαριών μπορούν να παράξουν και το παγκρεατικό πολυπεπτίδιο (PP) (Cerdá-Reverter et al., 2000). Το NPY των ψαριών έχει ευρεία κατανομή και έχει βρεθεί στον εγκέφαλο, στην υπόφυση, στον εντερικό σωλήνα, στο πάγκρεας καθώς και σε



νευρικές ίνες που περιβάλλουν τα αιμοφόρα αγγεία (Cerdá-Reverter et al., 2000, Chiba et al., 1996). Όπως προαναφέρθηκε δρα ως ένας ισχυρός ορεξιογόνος παράγοντας και η έκφρασή του επηρεάζεται από την πρόσληψη ή όχι της τροφής.

## 1.5 Θυρεοειδικές ορμόνες

Σε όλα τα σπονδυλωτά ο άξονας του θυρεοειδούς είναι ένα ενδοκρινικό σύστημα που επιδρά στην ανάπτυξη, στη διαφοροποίηση, στον μεταβολισμό και στην αναπαραγωγή και γενικότερα στη διατήρηση της ομοιόστασης (McAninch and Bianco, 2014). Στα ψάρια λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας που παρατηρείται, υπάρχουν σημαντικές διαφορές στη μορφολογία, τη ρύθμιση και τη φυσιολογία του θυρεοειδούς. Οι θυρεοειδικές ορμόνες (TH) παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στα ψάρια, τόσο για την ανάπτυξη τους στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, όσο και μεταγενέστερα ως ενήλικα. Συμμετέχουν σε σημαντικές διεργασίες, όπως η μεταμόρφωση των τελεόστεων ψαριών όπου συμβαίνει η μετάβαση από την νύμφη στο ιχθύδιο (Yamano, 2005).

Η παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών γίνεται μέσω του θυρεοειδή αδένος και περιλαμβάνει δύο ορμόνες, την θυροξίνη ή τετραϊωδοθυρονίνη ( $T_4$ ) και την τριϊωδοθυρονίνη ( $T_3$ ) σε όλες τις τάξεις των σπονδυλωτών, με την  $T_3$  να είναι πιο βιολογικά ενεργή. Η έκκριση αυτών των ορμονών ρυθμίζονται από τον άξονα υποθάλαμος - υπόφυση - θυρεοειδής (hypothalamic – pituitary - thyroid axis, HPT). Ο εγκέφαλος αφού δεχτεί εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα απελευθερώνει από τα κύτταρα του υποθαλάμου τον παράγοντα θυρεοεκλυτίνη (TRF, thyrotropin releasing factor), ο οποίος ρυθμίζει την έκκριση της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) στον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης. Η σύνθεση και έκκριση της TSH εξαρτάται από την αρνητική ανάδραση (negative feedback) των κυκλοφορούντων στο αίμα θυρεοειδικών ορμονών και από την TRF. Αν και είναι ξεκάθαρο ότι στα θηλαστικά η TRF εντείνει την απελευθέρωση της TSH από τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης, στα ψάρια ο ρόλος της TRF για την ενεργοποίηση του άξονα του θυρεοειδούς δεν έχει πλήρως διαλευκανθεί (Blanton and Specker, 2007). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η TRF μπορεί να συμβάλει στην έκκριση της αυξητικής ορμόνης (GH), της προλακτίνης (PRL) και της

αδρενοκορτικοτροπικής ορμόνης ACTH, οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την TSH (Galas et al., 2009).

Η σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών πραγματοποιείται στον θυρεοειδή αδένα, ο οποίος στους ιχθείς μπορεί να είναι είτε ενθυλακωμένος (κυρίως στους χονδριχθύες), είτε διατεταγμένος, με τα θυρεοειδικά θυλάκια να βρίσκονται γύρω από διάφορες θέσεις ανάλογα με τις ομάδες των ιχθύων. Τα θυρεοειδικά θυλάκια αποτελούνται από ένα στρώμα επιθηλιακών κυττάρων που περιβάλλονται από κολλοειδές και σε αυτά τελικώς γίνεται η σύνθεση των TH (Power et al., 2001). Για την παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών απαιτείται ιώδιο και για τους ιχθείς αυτό δεν αποτελεί πρόβλημα διότι το προσλαμβάνουν με τη διατροφή, αλλά και από το νερό μέσω των βραγχίων (Eales, 2019). Ο θυρεοειδής είναι ο μοναδικός ιστός που απορροφά ενεργητικά το ιώδιο και στη συνέχεια το οργανοποιεί, με τελικό αποτέλεσμα τη σύνθεση της  $T_3$  και  $T_4$ .

Μόλις συντεθούν οι θυρεοειδικές ορμόνες στα θυρεοειδικά θυλάκια, μεταβολίζονται για να ασκήσουν τις δράσεις τους ή για να αδρανοποιηθούν μέσω γλυκουρονιδίωσης, θειώσης και αποϊωδίωσης, με την δεύτερη να αποτελεί το σημαντικότερο μεταβολικό μονοπάτι. Μέχρι σήμερα έχουν αναγνωριστεί τρία ένζυμα που καταλύουν την αποϊωδίωση των θυρεοειδικών ορμονών, γνωστά ως αποϊωδινάσες ιωδοθυρονίνης τύπου I (DIO1), II (DIO2), III (DIO3) (St. Germain et al., 2009). Το κύριο εκκριτικό προϊόν που συντίθεται από τον θυρεοειδή αδένα είναι η  $T_4$ . Μέσω αποϊωδίωσης, η  $T_4$  μετατρέπεται στην βιολογικά ενεργή και υπεύθυνη για τις κύριες δράσεις του θυρεοειδή  $T_3$ . Πιο συγκεκριμένα, η παραγωγή της  $T_3$  πραγματοποιείται σε κεντρικούς και περιφερειακούς ιστούς μέσω ενζυμικής απομάκρυνσης μιας μονάδας ιωδίου από τον εξωτερικό δακτύλιο της  $T_4$  (outer ring deiodination, ORD). Σε αυτή τη διαδικασία, την ιδιότητα αυτή έχουν κυρίως τα ένζυμα DIO1 και DIO2 (Bianco and Conceição, 2018). Αντιθέτως η DIO3 καταλύει την αποϊωδίωση του εσωτερικού δακτυλίου της  $T_4$  (inner ring deiodination, IRD) με αποτέλεσμα η  $T_3$  και  $T_4$  να μετατρέπονται σε ανενεργή ανάστροφη  $T_3$  (reverse  $T_3$ ,  $rT_3$ ) και σε 3,3'-διωδοθυρονίνη ( $T_2$ ) (St. Germain et al., 2009, Luongo et al., 2019). Γενικότερα το DIO1 καταλύει τόσο την ORD όσο και την IRD, ενώ το DIO2 και το DIO3 εμπλέκονται μόνο στις διαδικασίες που προαναφέρθηκαν. Αυτό ισχύει τόσο στα θηλαστικά όσο και στα ψάρια, αν και οι DIOs στα ψάρια μπορεί να διαφέρουν σε

κάποιες περιπτώσεις από αυτές των θηλαστικών (Bianco et al., 2002, Orozco and Valverde-R, 2005).

## **1.6 Σκοπός της εργασίας**

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν να διερευνηθεί η μοριακή και ενδοκρινική βάση της παραλλακτικότητας στην αύξηση στο μαγιάτικο κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια. Η μοριακή προσέγγιση περιλάμβανε την μελέτη, σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια, της έκφρασης γονιδίων που εμπλέκονται στο μονοπάτι της όρεξης, του μεταβολισμού και της αύξησης. Η ενδοκρινική προσέγγιση περιλάμβανε τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της αυξητικής ορμόνης, του IGF-1, της λεπτίνης και της  $T_3$  σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία εκκόλαψης και προνυμφικής ανάπτυξης και τη διατροφή κατά τη νυμφική εκτροφή.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 2.1 Σχεδιασμός του πειράματος

Το πείραμα διεξήχθη στις εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (ΙΘΑΒΥΚ) του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) στο Ηράκλειο Κρήτης. Τα αυγά προμηθεύτηκαν από την εταιρία Αργοσαρωνικός Α.Ε στις 10 και 19 Ιουνίου 2021 και στη συνέχεια μοιράστηκαν σε δεξαμενές επώασης με μια αρχική συγκέντρωση περίπου 80 αυγά L<sup>-1</sup>. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα κυκλώματα από δύο κυλινδρικών δεξαμενές των 500L που ήταν συνδεδεμένες σε μηχανικό – βιολογικό φίλτρο. Οι δεξαμενές ήταν εφοδιασμένες με εσωτερικό κάλυμμα λευκού χρώματος και με αδιάβροχο υποβρύχιο φωτισμό καθώς οι συνθήκες αυτές έχουν αποδειχτεί κατάλληλες για την εκτροφή του είδους (Tsalafouta et al., 2017). Ο έλεγχος της θερμοκρασίας, της έντασης του φωτός και της φωτοπερίόδου πραγματοποιήθηκε μέσω ηλεκτρονικού πίνακα για κάθε δεξαμενή ξεχωριστά. Η φωτοπερίοδος ρυθμίστηκε σε 0L:24D κατά τη διάρκεια του αυτότροφου σταδίου, σε 24L:0D μετά το πρώτο τάισμα και από την 21 dph (days post hatching – ημέρες μετά την εκκόλαψη) και μετά σε 18L:6D.

Η εκτροφή των ιχθυονυμίων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική του ψευδοπράσινου νερού (Papandroulakis et al., 2001) με καθημερινή προσθήκη φυτοπλαγκτού (2 L *Chlorella sp.* και 1 L *Isochrysis sp.*) στις δεξαμενές. Η χορήγηση βιομηχανικής τροφής ξεκίνησε περίπου την 13 ημέρα, ταΐζοντας με το χέρι χρησιμοποιώντας το μικρότερο διαθέσιμο μέγεθος (100-200 μ). Μετά το πέρας τριών ημερών, τοποθετήθηκαν αυτόματες ταΐστρες ξηράς τροφής σε όλες τις δεξαμενές.

#### 2.1.1 Πείραμα 1: Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης

Το πείραμα διεξήχθη από το τεχνικό προσωπικό του ΙΘΑΒΥΚ. Για την διεξαγωγή του πειράματος εφαρμόστηκαν δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, 20°C ή 24°C, καθ' όλη τη διάρκεια της εμβρυϊκής ανάπτυξης και του αυτότροφου σταδίου (μέχρι το πρώτο τάισμα- first feeding). Μετά το πρώτο τάισμα η θερμοκρασία σε όλες τις δεξαμενές σταθεροποιήθηκε στους 24°C. Η εκκόλαψη έγινε δύο μέρες μετά την

εισαγωγή των αυγών στις δεξαμενές σε όλες τις συνθήκες και το πρώτο τάισμα πραγματοποιήθηκε την 2 dph στους 24°C και την 5 dph στους 20°C.

### 2.1.2 Πείραμα 2: Επίδραση της χορήγησης ζωντανής τροφής

Επί προσθέτως για κάθε θερμοκρασία εξετάστηκαν δυο διαφορετικά διατροφικά πρωτόκολλα ζωντανής τροφής, τα οποία αποτελούνταν α) από χορήγηση μόνο τροχοζώων ή β) από έναν συνδυασμό τροχοζώων και κωπηπόδων.

Στον **Πίνακα 1** φαίνονται οι περίοδοι χορήγησης των σιτηρεσίων ανάλογα με τις συνθήκες εκτροφής. Η νυμφική εκτροφή έληξε την 30-35 dph και τα ψάρια στην συνέχεια μεταφέρθηκαν στον χώρο της προπάχυνσης.

**Πίνακας 1.** Πειραματικά πρωτόκολλα χορήγησης ζωντανής τροφής

Πειραματικές ομάδες	Τροχόζωα (R)	Κοπήποδα (C)	Artemia AF	Artemia EG	Βιομηχανική τροφή
R	2-17 dph		9-19 dph	12-35 dph	13-λήξη εκτροφής
C/R	2-17 dph	2-8 dph	9-19 dph	13-35 dph	13-λήξη εκτροφής

### 2.2 Δειγματοληψίες

Δείγματα από κάθε πειραματική συνθήκη συλλέχθηκαν στα ακόλουθα στάδια/φάσεις πρώτης ανάπτυξης: πρώτο τάισμα (First Feeding, FF), κάμψη νωτοχορδής (Flexion, FLX), τέλος νυμφικής εκτροφής (End Larvae Rearing, ELR) και μέσο μεταμόρφωσης, όπου αρχίζουν να περνούν στο στάδιο του ιχθυδίου (Mid-Metamorphosis, MM). Οι μοριακές και ενδοκρινολογικές αναλύσεις έλαβαν χώρα στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ιχθύων, Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστήμιο Κρήτης. Στον **Πίνακα 2** παρουσιάζονται τα στάδια των δειγματοληψιών καθώς και οι ποσότητες που πάρθηκαν. Η συντήρηση των δειγμάτων έγινε στους -80°C.

**Πίνακας 2.** Αναπτυξιακά στάδια στα οποία πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες για μοριακές και ορμονικές αναλύσεις.

<b>Στάδια</b>	<b>Μήκος σώματος (mm)</b>	<b>Μέγεθος δείγματος</b>
Πρώτο τάισμα (FF)	3 - 3,5	0,5 - 1g
Κάμψη της νωτοχορδής (FLX)	5 - 6	0,5 - 1g
Τέλος νυμφικής εκτροφής (ELR)	10 - 14	3 - 5g
Μέσο-μεταμόρφωσης (MM)	15 - 20	3 - 5g

## **2.3 Μοριακή ρύθμιση**

### **2.3.1 Εξαγωγή RNA**

Για την απομόνωση και την εξαγωγή του RNA χρησιμοποιήθηκε το Nucleospin™ RNA Plus kit (Macherey-Nagel), το οποίο αφαιρεί σε υψηλό ποσοστό το γονιδιωματικό DNA (gDNA). Κατά την απομόνωση του RNA απαιτείται πρόληψη, ώστε να μην πραγματοποιηθεί αποικοδόμηση του RNA από τις RNases. Πάρθηκε ιστός από διάφορα αναπτυξιακά στάδια του μαγιάτικου και τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα erpendorfs. Αρχικά σε κάθε δείγμα προστέθηκε ένα χαστροπικό ρυθμιστικό διάλυμα λύσης των ιόντων, έγινε ομογενοποίηση με ομογενοποιητή χειρός και το προϊόν λύσης προστέθηκε σε στήλη αφαίρεσης του gDNA (κίτρινη κολώνα). Έπειτα η κίτρινη κολώνα απορρίφθηκε και έγινε προσθήκη δεσμευτικού διαλύματος στο υπερκείμενο διάλυμα και αυτό μεταφέρθηκε σε στήλη δέσμευσης του RNA (μπλε κολώνα). Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκαν βήματα πλύσεων με σκοπό την αφαίρεση αλάτων, μεταβολιτών και μακρομοριακών κυτταρικών συστατικών. Μετά το πέρας των πλύσεων, διεξήχθη έκλυση του RNA με νερό χωρίς RNases. Τα δείγματα αποθηκεύθηκαν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  μέχρι την περαιτέρω επεξεργασία τους.

### 2.3.2 Ποσοτικοποίηση του ολικού RNA

Χρησιμοποιήθηκε συγκεκριμένη ποσότητα RNA (2  $\mu$ l) για αναλύσεις σε ειδικό φασφατοφωτόμετρο (NanoDrop ND-1000, Thermo Fisher Scientific). Το NanoDrop δείχνει τον ποσοτικό προσδιορισμό των νουκλεικών οξέων, καθώς και τη συγκέντρωση του RNA σε κάθε δείγμα, η οποία μετριέται σε  $\text{ng } \mu\text{l}^{-1}$ . Τα δείγματα ελέγχθηκαν με την μέτρηση της υπεριώδους ακτινοβολίας σε μήκος κύματος 260nm. Οι απορροφήσεις σε μήκος κύματος 280 nm και 230 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ,  $A_{260}/A_{230}$ ) δείχνουν αν το δείγμα είναι καθαρό από πρωτεΐνες και οργανικά στοιχεία αντίστοιχα. Ιδανικά οι αναλογίες θα πρέπει να έχουν τιμή  $\approx 2.0$ . Συμπληρωματικά η ποιότητα του RNA ελέγχθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% σε διάλυμα 10X MOPS και 37% φορμαλδεΐδη. Η φθορίζουσα χρωστική που χρησιμοποιήθηκε ήταν η GelRed. Η παρουσία του 28s και 18s ριβοσωμικού (rRNAs) διαβεβαίωσε την υψηλή ποιότητα και ακεραιότητα (integrity) του ολικού RNA.

### 2.3.3 Σύνθεση cDNA-Real Time PCR (qPCR)

Για την μελέτη των επιπέδων της γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real Time PCR), η οποία ονομάζεται και ποσοτική PCR (quantitative PCR, qPCR) δύο σταδίων, όπου το RNA μεταγράφεται σε συμπληρωματικό προς το mRNA DNA (cDNA). Στην μέθοδο των δύο σταδίων, το RNA μεταγράφεται πρώτα σε cDNA σε μια αντίδραση, χρησιμοποιώντας το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcription, RT). Στην συνέχεια ένα κλάσμα του cDNA χρησιμοποιείται για την Real Time PCR, qPCR.

Για την σύνθεση του cDNA χρησιμοποιήθηκε το PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), όπου 1000 ng του ολικού RNA κάθε δείγματος μεταγράφηκε αντίστροφα σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή. Για την αντίδραση εξάλειψης του γονιδιωματικού DNA φτιάχτηκε ένα μείγμα που περιείχε συγκεκριμένη ποσότητα του RNA, gDNA Eraser Buffer, gDNA Eraser και απιονισμένο νερό απαλλαγμένο από τις RNAses και επώαστηκε στους 42°C για 2 λεπτά (βήμα 1). Ακολούθως, η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής

πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το μείγμα από το βήμα 1, το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (PrimeScript RT Enzyme Mix I), διάλυμα 5X PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) και RT Primer Mix καθώς και απιονισμένο νερό χωρίς RNασες. Η αντίδραση έγινε στους 37°C για 15 λεπτά με τελική επώαση στους 85°C για 5 δευτερόλεπτα. Το cDNA αποθηκεύτηκε στους -20°C μέχρι την χρήση του.

### 2.3.4 Σχεδιασμός ειδικών εκκινήτων

Για την ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης σχεδιάστηκαν ειδικοί εκκινήτες από το προσωπικό του Εργαστηρίου Φυσιολογίας Ιχθύων για το μαγιάτικο (*Seriola dumerili*), μέσω του εργαλείου Primer-BLAST του National Center for Biotechnology Information (NCBI) ([Primer designing tool \(nih.gov\)](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Primer)). Ωστόσο για την αποφυγή πολλαπλασιασμού του γονιδιωματικού DNA, όπου ήταν εφικτό, σχεδιάστηκαν οι εκκινήτες σε περιοχές ένωσης των εξονίων (exon-exon junction), τα οποία είναι τα μόνα που συμμετέχουν στη δημιουργία του ώριμου αγγελιοφόρου RNA (mRNA), για κάθε γονίδιο. Το μέγεθος του τελικού προϊόντος περιορίστηκε από 100 έως 200 νουκλεοτίδια για τη διευκόλυνση της αντίδρασης στην πραγματικού χρόνου ποσοτικής PCR (Real-Time quantitative PCR). Οι εκκινήτες επιλέχθηκαν με βάση το μέγεθος τους, όπου κυμαινόταν από 18 έως 22 νουκλεοτίδια, την θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ , melting temperature) από 58 έως 62°C, την υψηλή περιεκτικότητα σε γουανίνη και κυτοσίνη (GC%, 50-60%), αποφυγή συμπληρωματικότητας μεταξύ του ζευγαριού εκκινήτη, κλπ. Με αυτόν τον τρόπο είναι δυνατόν να αποφευχθεί η ενίσχυση του γονιδιωματικού DNA. Οι εκκινήτες που προμηθεύτηκαν είχαν αρχική συγκέντρωση 100 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$  (100  $\mu\text{M}$ ) και ένα μέρος αυτών αραιώθηκε ώστε να επιτευχθεί τελική συγκέντρωση 10 pmol  $\mu\text{L}^{-1}$  (10  $\mu\text{M}$ ). Στην συνέχεια η αποθήκευση τους έγινε στους -20°C.

Στον **Πίνακα 3** παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των ειδικών εκκινήτων που χρησιμοποιήθηκαν, όπου GH: αυξητική ορμόνη, GHRH: ορμόνη απελευθέρωσης της αυξητικής ορμόνης, GHR: γκρελίνη, LPX: λεπτινη, NPY: νευροπεπτίδο Y, IGF-(1,2): ινσουλομιμητικός αυξητικός παράγοντας (1,2), IGF BP-(1,2): δεσμευτική πρωτεΐνη του IGF-(1,2), TRH: ορμόνη απελευθέρωσης θυρεοτροπίνης, THR (A,B): υποδοχέας θυρεοειδικών ορμονών (A,B), DIO (1,2,3): αποϊωδινάση τύπου (1,2,3). Ως γονίδιο



αναφοράς (reference gene) χρησιμοποιήθηκε το GAPDH: αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκεραλδεΐδης (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

**Πίνακας 3.** Αλληλουχίες ειδικών εκκινητών

Γονίδιο	Εκκινητής F (5'->3')	Εκκινητής R (5'->3')
GAPDH (1)	CCAACCCAGGCAAAATGGTG	CCTTGACCTCACCGTGGAAG
GAPDH (2)	ATCATCCCCGCTTCAACTGG	CGTCGTATTTGGCGGGTTTC
GH	TCAGGACGGAGCAGAGATGT	GGTACGTCTCCACCTTGTGC
GHRH	GGCCAAATCTCTGCCAGGAA	GTCCCCTCGTAGATGCCTGA
GHRH	ACCCATCCATTAGGTTCCGGC	CCTGAGCGTAACTCTGTCTG
GHR	AGTGCTGGCTCCAGTTATCTC	AAGGGGGCACTTACTGTGATG
LPX	GATGGAGCCTAACAGTGGCA	GACTTCCGTTGGCAGAGGAG
NPY	GGAGGGATACCCGGTCAAAC	ATCTCAGGGCTGGACCTCTT
IGF-1	GATGTCTTCAAGAGTGCAGTGTG	CCGTCCGAGTCAGGGTGAGG
IGF-2	GCCCGCACTAAAACAGGAAG	GCCTGTGGAAGATTGCTTGC
IGF BP-1	CCCTTTGACCACCATGACACT	GGGTCCCTGTTGTTCCAGTTT
IGF BP-2	CACCAGGCAACAAATGAGGTG	TGGTTTTGCGCTCGTTCAAG
TRH	GATGAGACGGACCGAAGGAC	TCGCTTCTCCAAATCCTCGC
TRH	TCTGCAACTTGACCGTGTGT	ATCCCTCGTCTTCATCCTGC
THRA	GAGCCAATGTCCAACAAGCAG	TAGCTGGGGATGTACCCTGG
THRA	TGCTCTTAGCGTCTCTGTCCA	TCTGGATGGTCCCTGCGGAAG
THRB	TGTGTCCCGTCCAGTTAGC	CCCGAGAGAAACACCGCATA
THRB	AGTGTGCCCGTTTTCAAGG	CGCTAGTGCAAATCAGGCGA
DIO1	TGCCCGAGAGGCTTTATGTG	CCCTCCCATCCCCTACTGA
DIO1	CGAGGCACATTCAACAGATGG	AGCACATAAAGCCTCTCGGG
DIO2	AGCAGGTGAAACTTGGCTGT	CAAAATCCAGAAGGCGGCAC
DIO3	GCAAAGGACAAGAGACCGCT	GCTATGTCCGCGTTTTGCTG

### 2.3.5 Ποσοτική PCR Real Time PCR (qPCR)

Για την Real Time PCR χρησιμοποιήθηκε ο θερμικός κυκλοποιητής Bio-Rad CFX Connect™, που περιλαμβάνει μια μονάδα οπτικής ανίχνευσης για τη μέτρηση του σήματος φθορισμού που διέπεται κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου ενίσχυσης σε πραγματικό χρόνο. Η φθορίζουσα χρωστική ουσία που επιλέχθηκε ήταν η SYBR Green, η οποία δεσμεύει όλα τα δίκλιωνα μόρια DNA (dsDNA) εκπέμποντας ένα φθορίζον κυανό σήμα κατά τη σύνδεση. Το σήμα που εκπέμπεται σε κάθε κύκλο είναι ανάλογο με την ποσότητα του συντιθέμενου προϊόντος .

Συγκεκριμένα επιλέχθηκε το KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X) kit, το οποίο είναι ένα μίγμα έτοιμο για χρήση περιέχοντας όλα τα συστατικά, εκτός από τους εκκινητές και το πρότυπο cDNA. Η εκτέλεση της PCR για όλα τα γονίδια

πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 10 μl KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2X), 1 μl από κάθε εκκινήτη αντίστοιχα (Forward Primer, Reverse Primer), 1 μl cDNA και αποστειρωμένο νερό έως ότου η τελική συγκέντρωση της αντίδρασης να φτάσει 20 μl. Οι συνθήκες της αντίδρασης για όλα τα γονίδια που δοκιμάστηκαν ήταν οι ακόλουθες: 95°C για 3 λεπτά (ενεργοποίηση των ενζύμων), ακολούθησαν 40 κύκλοι με θερμοκρασία 95°C για 10 δευτερόλεπτα (αποδιάταξη), 60°C για 30 δευτερόλεπτα (υβριδισμός) και 72° C για 10 δευτερόλεπτα (επιμήκυνση). Η ποιότητα των προϊόντων που προέκυψαν, ελέγχθηκαν με τη μελέτη της καμπύλης τήξης (melting curve). Για την κανονικοποίηση των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο αναφοράς GAPDH.

Κατά την εκτέλεση της PCR δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις του cDNA οι οποίες ήταν 20 ng (2 μl), 15 ng (1,5 μl), 10 ng (1 μl) και 5 ng (0,5 μl) και τελικώς επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 10 ng (1 μl). Οι συγκεντρώσεις των Forward και Reverse ζευγαριών εκκινήτων που δοκιμάστηκαν από την τελική τους συγκέντρωση των 10 μM, ήταν 200 nM (0,2 μM), 100 nM (0,1 μM) και 50 nM (0,05 μM) αντίστοιχα. Η συγκέντρωση 100 nM αποτύπωσε το καλύτερο αποτέλεσμα.

## 2.4 Ενδοκρινική ρύθμιση

Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα από ιχθυονύμφες μαγιάτικου από το αυτότροφο και ετερότροφο στάδιο, ώστε να γίνει προσδιορισμός της συγκέντρωσης της αυξητικής ορμόνης (GH), του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 1 (IGF1), της τριωδοθυρονίνης (T<sub>3</sub>) και της λεπτίνης, με την εφαρμογή ανοσο-απορροφητικών μεθόδων συνδεδεμένου ενζύμου ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay).

Η ELISA είναι μια ανοσοβιοχημική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ουσιών όπως, πεπτιδίων, αντισωμάτων, πρωτεϊνών και ορμονών σε ένα δείγμα. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη μέτρηση ενός αντιγόνου με ανίχνευση παρεμβολής σήματος. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται μια πλαστική πλάκα η οποία αποτελείται από 96 μικρο - δοχεία (micro - wells) τα οποία είναι επικαλυμμένα με συγγενικά αντισώματα έναντι της κάθε ουσίας που πρόκειται να μελετηθεί. Στην ανταγωνιστική ELISA, το αντιγόνο του δείγματος ανταγωνίζεται ένα σημασμένο αντιγόνο (antigen conjugate) για μια θέση στο

αντίσωμα που βρίσκεται στο πηγαδάκι. Κατά συνέπεια το σήμα της απορρόφησης που παράγεται είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του αντιγόνου, δηλαδή όσο περισσότερο αντιγόνο υπάρχει στο δείγμα τόσο λιγότερο σημασμένο αντιγόνο κατακρατείται στο πηγαδάκι και συνεπώς προκύπτει ασθενέστερο σήμα.

#### **2.4.1 Προετοιμασία των δειγμάτων (εκχύλιση ορμονών)**

Για την εξαγωγή της αυξητικής ορμόνης, του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 1, καθώς και της λεπτίνης, 100 mg νυμφών και προνυμφών ομογενοποιήθηκαν σε 1ml 1X PBS και αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  όλη τη νύχτα. Στη συνέχεια ακολούθησαν δύο κύκλοι ψύξης-απόψυξης για τη διάσπαση των κυτταρικών μεμβρανών και τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φυγόκεντρο για 5 λεπτά 5.000g, σε θερμοκρασία  $2-8^{\circ}\text{C}$ . Το υπερκείμενο διάλυμα που προέκυψε, αφαιρέθηκε και τοποθετήθηκε στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για τις περαιτέρω αναλύσεις.

Για την εξαγωγή των θυρεοειδικών ορμονών και συγκεκριμένα της  $T_3$  χρησιμοποιήθηκαν πλαστικοί σωλήνες με στρογγυλό πάτο στους οποίους προστέθηκαν 100  $\mu\text{l}$  φωσφορικού ρυθμιστικού διαλύματος και ένα σφαιρίδιο μεγέθους 3 mm. Στην συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κάθε σωλήνα μεμονωμένα τα δείγματα των νυμφών και προνυμφών και ομογενοποιήθηκαν για 2 λεπτά στα 30 Hz στο μύλο σφαιριδίων. Το ομογενοποιημένο προϊόν κάθε δείγματος (περίπου 100  $\mu\text{l}$ ) μεταφέρθηκε σε γυάλινο σωλήνα και ανακατεύθηκε με 1 ml διαιθυλαιθέρα. Οι γυάλινοι σωλήνες αφού καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο, προστέθηκαν για 2 λεπτά στους  $-80^{\circ}\text{C}$  ώστε να διαχωριστεί ο διαιθυλαιθέρας και το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε καινούριους σωλήνες. Έπειτα αυτοί μεταφέρθηκαν σε υδατόλουτρο στους  $45^{\circ}\text{C}$  μέχρι να εξατμιστεί πλήρως το υγρό. Η ανασύσταση των δειγμάτων έγινε με την προσθήκη 100  $\mu\text{l}$  ενζυμικού ρυθμιστικού διαλύματος εξαγωγής, κατάλληλο για την ανοσοδοκιμασία και αυτά αποθηκεύτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη χρήση τους.

## 2.4.2 Αναλύσεις

- Για τον προσδιορισμό της GH, του IGF-1 και της λεπτίνης (LEP) χρησιμοποιήθηκαν, ειδικές για χρήση σε ψάρια, εμπορικές συσκευασίες ανοσοπροσδιορισμού της εταιρίας CUSABIO<sup>®</sup>. Παρακάτω γίνεται η περιγραφή της διαδικασίας του πρωτοκόλλου για τον προσδιορισμό της αυξητικής ορμόνης.

Η πλάκα μικροτιτλοδότησης (96 wells) που χρησιμοποιήθηκε ήταν επικαλυμμένη με ένα ειδικό αντίσωμα για την GH. Έγινε η προετοιμασία των αντιδραστηρίων και των δειγμάτων σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κατασκευαστή και τοποθετήθηκαν, 50 μl των πρότυπων διαλυμάτων (Standards, S0 - S5) με δύο επαναλήψεις το καθένα, ενώ στα υπόλοιπα προστέθηκαν τα δείγματα χωρίς επανάληψη. Έπειτα προστέθηκαν 50 μl συζευγμένης με βιοτίνη GH (Conjugate) σε όλα τα πηγαδάκια, όπου σε αυτό το στάδιο ξεκινά μια ανταγωνιστική αντίδραση μεταξύ της GH των δειγμάτων και των προτύπων, σε σχέση την συζευγμένη με βιοτίνη GH για την δέσμευση μια θέσης στο ειδικό αντίσωμα της GH. Αφού έγινε η ανάδευση της πλάκας, τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Σε επόμενο στάδιο έγινε απόρριψη των περιεχομένων και η πλάκα πλύθηκε τρεις φορές με ειδικό διάλυμα (Wash Buffer). Μετά το πλύσιμο, προστέθηκε στα πηγαδάκια συζευγμένη με αβιδίνη υπεροξειδάση χρένου (Horseradish Peroxidase, HRP Avidin) η οποία συνδέεται με την βιοτίνη με υψηλή συγγένεια και έγινε επώαση της πλάκας για 30 λεπτά στους 37°C. Πραγματοποιήθηκαν βήματα πλύσεων και στη συνέχεια προστέθηκαν διαλύματα υποστρώματος (Substrates) με την βοήθεια των οποίων αναπτύσσεται χρώμα αντίθετο με την ποσότητα της GH στα δείγματα. Το τελικό βήμα περιλάμβανε την προσθήκη διαλύματος που σταματάει την αντίδραση παραγωγής χρώματος (Stop Solution) και εν συνεχεία μέτρηση της απορρόφησης σε ειδικό φασματοφωτόμερο, (mindray MR-96A) σε μήκος κύματος 450 nm.

Όσον αφορά τον IGF-1 και την λεπτίνη η φιλοσοφία της διαδικασίας που ακολουθήθηκε είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω, μόνο που σε κάθε περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλες πλάκες μικροτιτλοδότησης και τα κατάλληλα αντίστοιχα αντιδραστήρια.

- Για τον προσδιορισμό της T<sub>3</sub> χρησιμοποιήθηκε kit ανοσοπροσδιορισμού της εταιρίας Cloud-Clone<sup>®</sup> το οποίο είναι κατάλληλο για όλα τα είδη.

Αφού έγινε η προετοιμασία όλων των αντιδραστηρίων, των δειγμάτων και των προτύπων σύμφωνα με το πρωτόκολλο, έγινε προσθήκη 50 μl στην πλάκα μικροτιτλοδότησης των προτύπων (2 επαναλήψεις) και των δειγμάτων (1 επανάληψη) και αμέσως προστέθηκαν 50 μl από το αντιδραστήριο ανίχνευσης A (Detection Reagent A). Στην συνέχεια έγινε ανάδευση της πλάκας και τοποθετήθηκε για επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Τα περιεχόμενα απορρίφθηκαν και πραγματοποιήθηκαν τρία βήματα πλύσεων (Wash Buffer). Σε επόμενο στάδιο προστέθηκαν 100 μl από το αντιδραστήριο ανίχνευσης B (Detection Reagent B) και επώαση στους 37°C για 30 λεπτά. Επαναλήφθηκαν πέντε βήματα πλύσεων και αμέσως τοποθετήθηκαν 90 μl διαλύματος υποστρώματος (Substrate) και επώαστηκαν στους 37°C για 15 λεπτά. Τελικώς προστέθηκε το διάλυμα που σταματάει την αντίδραση παραγωγής χρώματος (Stop Solution) και η απορρόφηση μετρήθηκε στα 450 nm.

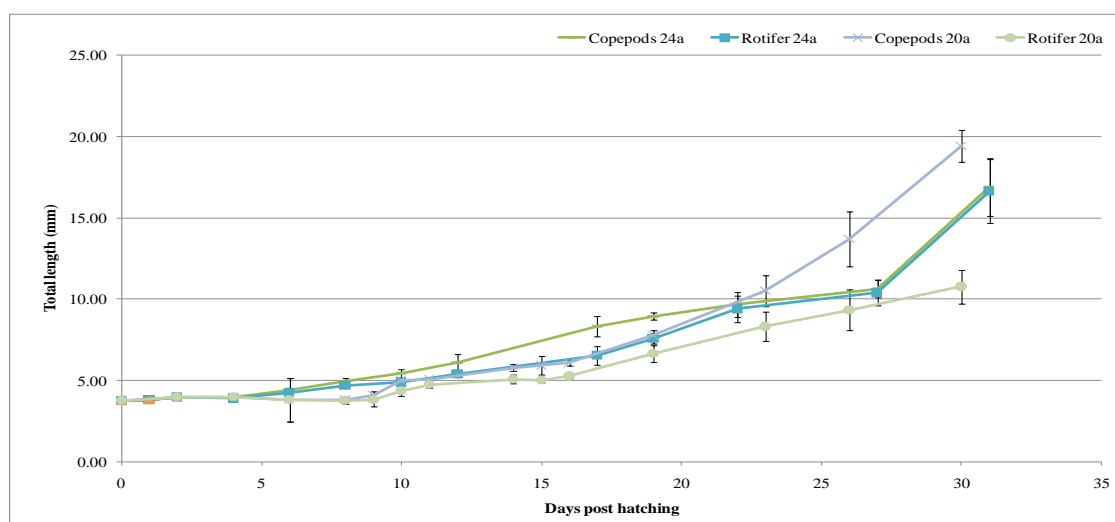
## 2.5 Στατιστική ανάλυση

Για όλα τα γονίδια και ορμόνες που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν 3 - 4 δείγματα από κάθε πειραματική ομάδα. Στο στάδιο του πρώτου ταΐσματος (FF) η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με παραμετρικό t-test. Στα στάδια κάμψη της νωτοχορδής (FLX), τέλος νυμφικής εκτροφής (ELR) και μέσο-μεταμόρφωσης (MM) εφαρμόστηκε ανάλυση διασποράς δύο παραγόντων (Two-way ANOVA) ξεχωριστά για κάθε θερμοκρασία (20°C ή 24°C), όπου και εξετάστηκε η επίδραση της διατροφής (τροχόζωα ή τροχόζωα & κωπήποδα) και του αναπτυξιακού σταδίου. Εφόσον βρέθηκαν διαφορές πραγματοποιήθηκαν συγκρίσεις κατά ζεύγη με Tukey's test. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του λογισμικού SigmaStat. Επίσης εφαρμόστηκε μη παραμετρική ανάλυση συσχέτισης Spearman (nonparametric Spearman rank order correlation test) για να εξεταστεί αν υπάρχει στατιστικά σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων. Τέλος εφαρμόστηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών Principal Component Analysis (PCA) ώστε να μελετηθεί η μεταβλητότητα (variability) των γονιδίων που συμμετέχουν στην ανάπτυξη κατά τη νυμφική εκτροφή. Οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο λογισμικό STATISTICA StatSoft.

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

#### 3.1 Αύξηση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που δόθηκαν από το προσωπικό του ΙΘΑΒΥΚ ως προς την εξέλιξη του μήκους των ιχθυονυμφών, καλύτερη εικόνα εμφάνισε η ομάδα που είχε τραφεί με τον συνδυασμό τροχοζώων & κωπηπόδων και η εμβρυική και προνυμφική ανάπτυξη πραγματοποιήθηκε στους 20°C. Εν αντιθέσει χειρότερη εικόνα ως προς την αύξηση παρουσίασε η ομάδα που η διατροφή στηριζόταν αποκλειστικά σε τροχόζωα και η θερμοκρασία κατά το εμβρυικό και αυτότροφο στάδιο ήταν στους 20°C (Διάγραμμα 1).



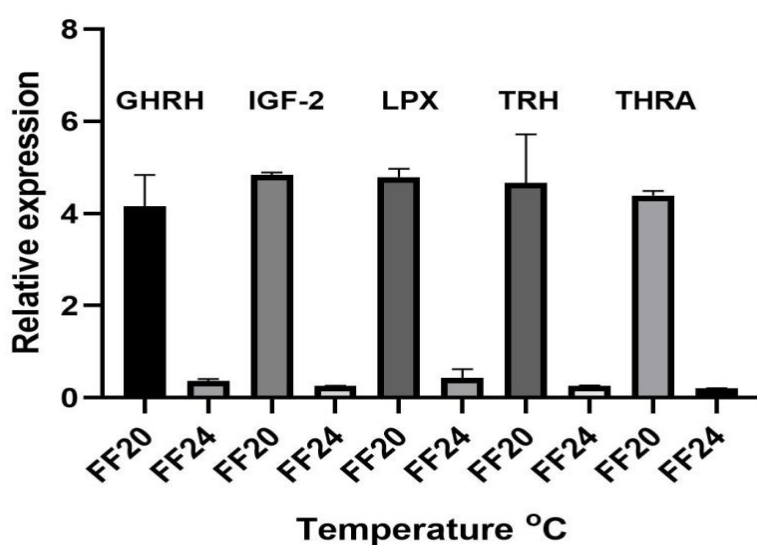
**Διάγραμμα 1.** Εξέλιξη του ολικού μήκους (μέση τιμή και τυπική απόκλιση) κατά την πορεία του πειράματος.

Αναλυτικότερα οι στατιστικές αναλύσεις που εφάρμοσαν έδειξαν ότι τα ψάρια που τράφηκαν με τροχόζωα σε θερμοκρασία 20°C είχαν σημαντικά μικρότερο ρυθμό αύξησης μήκους σε σχέση με τον ρυθμό αύξησης των ψαριών σε άλλες συνθήκες διατροφής και θερμοκρασίας. Πιο συγκεκριμένα, ο ρυθμός αύξησης των ψαριών που τράφηκαν με τροχόζωα σε θερμοκρασία 20°C ήταν 0,22 mm d<sup>-1</sup>, ενώ ο ρυθμός αύξησης των υπολοίπων ομάδων ήταν 0,33 mm d<sup>-1</sup> για τα ψάρια που τρεφόταν με τροχόζωα στους 24°C, 0,35 mm day<sup>-1</sup> για τα ψάρια που τρεφόταν με κωπήποδα - τροχόζωα στους 24°C και 0,42 mm day<sup>-1</sup> για τα ψάρια που τρεφόταν με κωπήποδα - τροχόζωα στους 20°C.

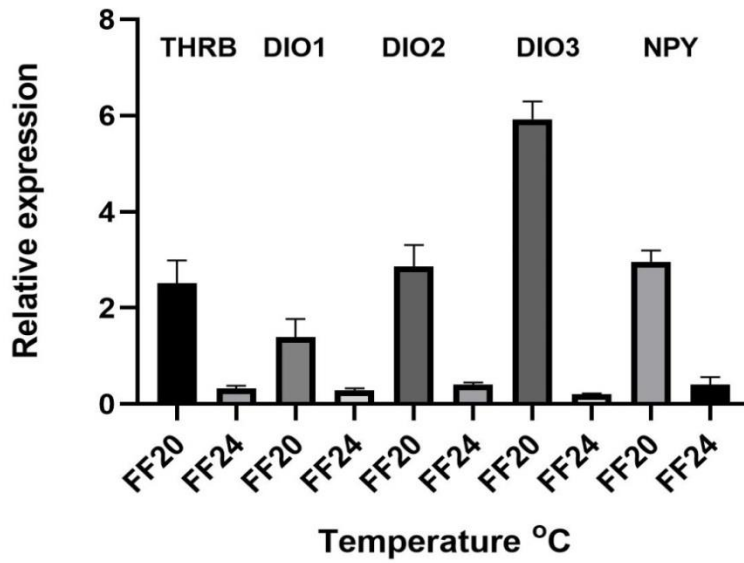
## 3.2 Μοριακές αναλύσεις

### 3.2.1 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στην έκφραση γονιδίων στο πρώτο τάισμα.

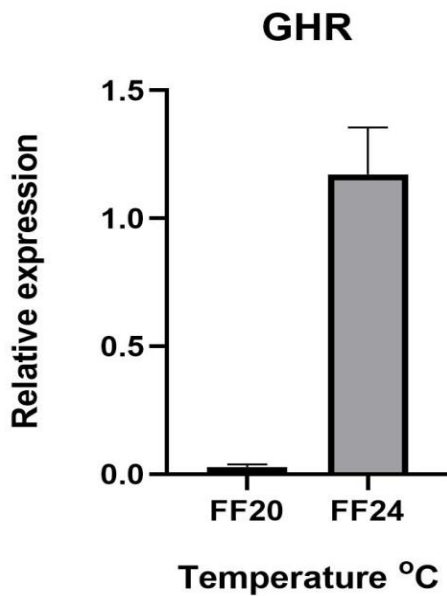
Στο συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο τα περισσότερα γονίδια που εξετάστηκαν, εμφάνισαν στατιστικά μεγαλύτερη έκφραση στις προνύμφες που προέρχονταν από τους 20°C σε σχέση με αυτές που βρίσκονταν στους 24°C κατά την εκκόλαψη (Διαγράμματα 2, 3, 4). Τα μόνα γονίδια που δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο θερμοκρασιών ήταν τα ακόλουθα: GH ( $P = 0,896$ ), IGF-1 ( $P = 0,215$ ), IGF BP-1 ( $P = 0,5$ ) και IGF BP-2 ( $P = 0,065$ ).



**Διάγραμμα 2.** Σχετική έκφραση των γονιδίων GHRH, IGF-2, LPX, TRH, THRA. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος αποτυπώνουν το τυπικό σφάλμα των μέσων ( $n = 3$ ). Σε όλα τα γονίδια παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ( $P < 0,05$ ) υψηλότερη έκφραση γονιδίων στους 20°C σε σχέση με τους 24°C.



**Διάγραμμα 3.** Σχετική έκφραση των γονιδίων THRβ, DIO1,DIO2,DIO3,NPY. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος αποτυπώνουν το τυπικό σφάλμα των μέσων (n = 3). Σε όλα τα γονίδια παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ( $P < 0,05$ ) υψηλότερη έκφραση γονιδίων στους 20°C σε σχέση με τους 24°C.



**Διάγραμμα 4.** Σχετική έκφραση του γονιδίου GHR. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος αποτυπώνουν το τυπικό σφάλμα των μέσων (n = 3). Στο συγκεκριμένο γονίδιο παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική ( $P < 0,05$ ) υψηλότερη έκφραση στους 24°C σε σχέση με τους 20°C.



### 3.2.2 Επίδραση ζωντανής τροφής

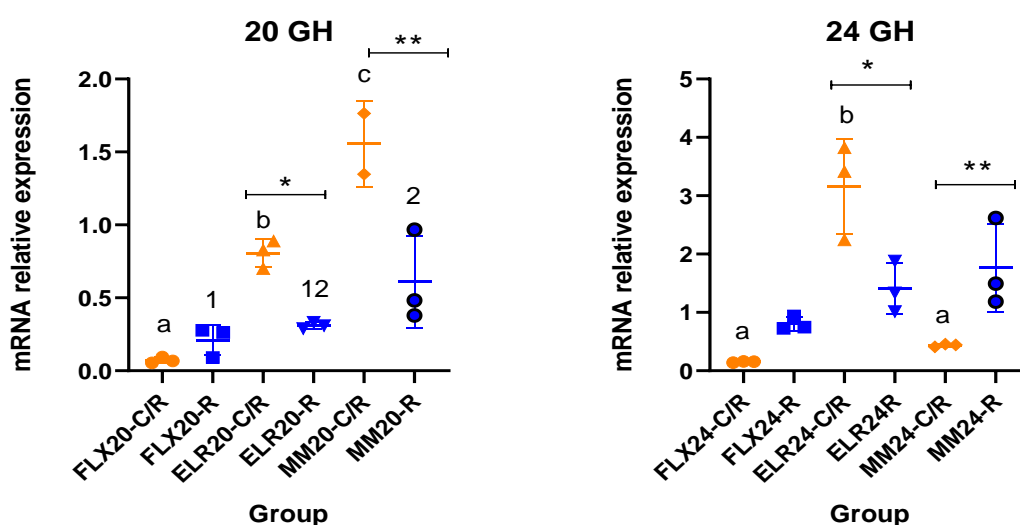
Με βάση τα αποτελέσματα του προηγούμενου πειράματος, η ανάλυση της επίδρασης των διαφορετικών πρωτοκόλλων χορήγησης ζωντανής τροφής (μόνο τροχόζωα, R ή κωπήποδα και τροχόζωα, C/R) στην έκφραση των γονιδίων πραγματοποιήθηκε ξεχωριστά για την ομάδα μαγιάτικων όπου η θερμοκρασία επώασης εμβρύων και προνυμφών πραγματοποιήθηκε στους 20°C ή στους 24°C.

#### Αυξητική ορμόνη (GH)

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης στους 20°C έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση τόσο της διατροφής, ( $P < 0,001$ ) όσο και του σταδίου ανάπτυξης ( $P < 0,001$ ). Η εξαγωγή όμως ενός κοινού συμπεράσματος δεν είναι εφικτή καθώς η επίδραση της μιας παραμέτρου, δηλαδή των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων, εξαρτάται από το επίπεδο διατροφής που υπάρχει. Στο αναπτυξιακό στάδιο FLX δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων διατροφής. Αντίθετα στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια παρατηρήθηκε υπέρ-έκφραση του γονιδίου στην ομάδα C/R σε σύγκριση με την ομάδα R. Στην ομάδα C/R παρατηρήθηκε μια βαθμιαία αύξηση της έκφρασης του γονιδίου με βάση το αναπτυξιακό στάδιο ( $MM > ELR > FLX$ ), ενώ στη ομάδα R παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μόνο μεταξύ του σταδίου MM και FLX (Διάγραμμα 5).

Στους 24°C δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο διατροφών ( $P = 0,74$ ) ωστόσο υπήρχαν μεταξύ των σταδίων ( $P < 0,001$ ). Επιπλέον όμως υπήρχε αλληλεπίδραση μεταξύ του σταδίου και της διατροφής ( $P < 0,001$ ) που σημαίνει ότι η επίδραση των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων εξαρτάται από την διατροφή που υπάρχει. Συγκεκριμένα εμφανίστηκαν διαφορές μέσα στο στάδιο ELR, όπου στην διατροφή C/R παρατηρήθηκε σχεδόν διπλάσια έκφραση του γονιδίου σε σύγκριση με την ομάδα R, καθώς επίσης και στο στάδιο MM, με την υπέρ-έκφραση να παρατηρείται στην ομάδα R. Τελικώς υπήρξαν διαφορές μεταξύ των σταδίων στην διατροφή C/R, με τις διαφορές να εντοπίζονται μεταξύ ELR με FLX και ELR με MM, όπου στο στάδιο ELR η έκφραση του γονιδίου ήταν τριπλάσια σε σχέση με τις

υπόλοιπες ομάδες. Δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μεταξύ των σταδίων με την διατροφή των τροχοζώων (Διάγραμμα 5).



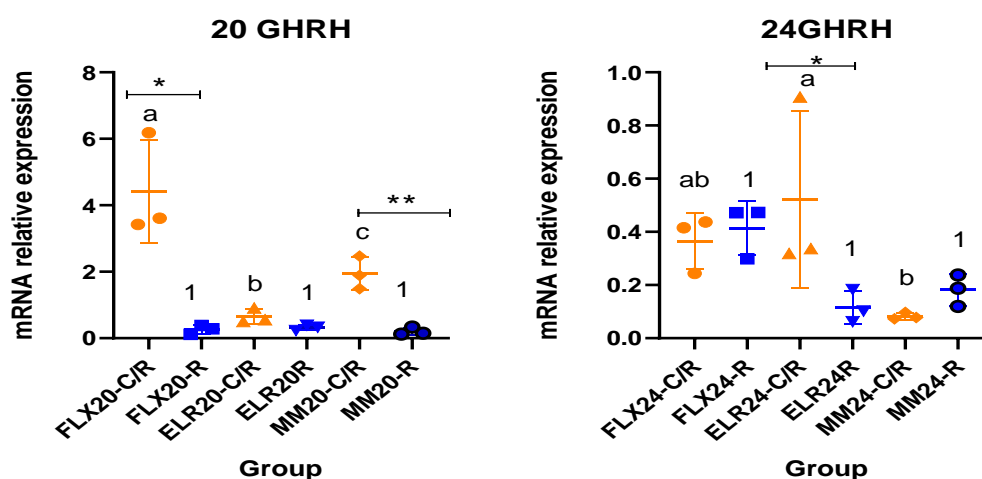
**Διάγραμμα 5.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου GH κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (FLX: κάμψη της νωτοχορδής, ELR: τέλος νυμφικής εκτροφής, MM: μέσο μεταμόρφωσης) σε νύμφες μαγιάτικου οι οποίες κατά το αυτότροφο στάδιο ήταν στους 20°C (αριστερά) ή στους 24°C (δεξιά) και οι οποίες ταΐστηκαν με δυο διαφορετικές ζωντανές τροφές (κωπήποδα-τροχοζώα: C/R ή μόνο τροχοζώα: R) από το πρώτο τάισμα μέχρι και το στάδιο FLX. Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ).

### Ορμόνη απελευθέρωσης της αυξητική ορμόνης (GHRH)

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης στους 20°C εντόπισαν στατιστικά σημαντική επίδραση τόσο στην διατροφή, ( $P < 0,001$ ) όσο και στο στάδιο ανάπτυξης, ( $P = 0,001$ ) με κοινό πρότυπο μεταβολών. Βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των διαφορετικών διατροφών ως προς την έκφραση του γονιδίου, στα στάδια FLX και MM, με την διατροφή C/R να εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου σε σχέση με τη διατροφή R. Στην ομάδα διατροφής C/R διέφεραν μεταξύ τους τα στάδια FLX με ELR, FLX με MM και MM με ELR, με την υψηλότερη έκφραση να παρατηρείται στο στάδιο FLX (FLX > MM > ELR). Δεν παρατηρήθηκε κάποια στατιστικά

σημαντική διαφορά μεταξύ των σταδίων στην διατροφή που αποτελούνταν από R (Διάγραμμα 6).

Στους 24°C δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο διατροφών ( $P = 0,257$ ), υπήρχαν όμως μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων ( $P = 0,034$ ). Η επίδραση των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων όμως, εξαρτάται από το επίπεδο διατροφής που υπάρχει με αποτέλεσμα να υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση ( $P = 0,027$ ). Οι διαφορές αυτές βρέθηκαν μεταξύ των διαφορετικών διατροφών στο στάδιο ELR, όπου στην διατροφή C/R υπήρχε υπερ-έκφραση του γονιδίου σε σχέση με την R. Επιπλέον βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των σταδίων ELR και MM μέσα στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφορά μεταξύ των σταδίων στην διατροφή που αποτελούνταν από R (Διάγραμμα 6).



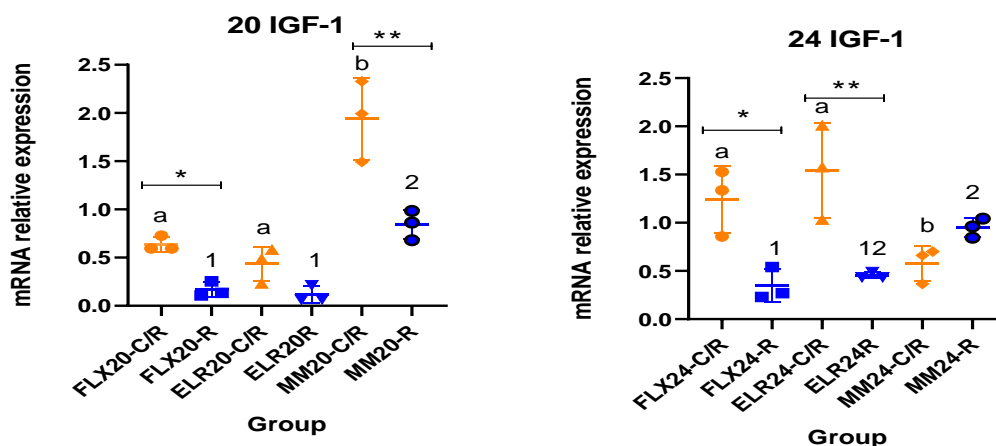
**Διάγραμμα 6.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου της GHRH κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

### Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1)

Στους 20°C βρέθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση τόσο στην διατροφή ( $P < 0,001$ ), όσο και στο στάδιο ανάπτυξης ( $P < 0,00$ ), με κοινό πρότυπο μεταβολών ( $P =$

0,015). Συγκεκριμένα με συγκρίσεις που έγιναν κατά ζεύγη βρέθηκαν διαφορές στον παράγοντα της τροφής μέσα στα στάδια FLX καθώς και στο στάδιο MM, όπου το γονίδιο είχε μεγαλύτερη έκφραση στην ομάδα διατροφής C/R. Επίσης όσον αφορά την διατροφή C/R βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των σταδίων MM με ELR και MM με FLX, με την υψηλότερη έκφραση να παρατηρείται στο στάδιο MM. Στην διατροφή R οι διαφορές εντοπίστηκαν στα ίδια στάδια (Διάγραμμα 7).

Στους 24°C η στατιστική ανάλυση έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο διαφορετικών διατροφών ( $P = 0,001$ ), χωρίς όμως να υπάρχει κάποια διαφορά μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων ( $P = 0,300$ ). Η επίδραση όμως των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων εξαρτάται από την διατροφή που υπάρχει ( $P < 0,001$ ). Οι διατροφές διέφεραν στα στάδια FLX και ELR, με την ομάδα C/R να εμφανίζει μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου από την ομάδα R. Στην διατροφή C/R βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των σταδίων ELR με MM και FLX με MM, με το στάδιο MM να έχει την μικρότερη έκφραση. Στην διατροφή R βρέθηκαν διαφορές μεταξύ MM με FLX (Διάγραμμα 7).

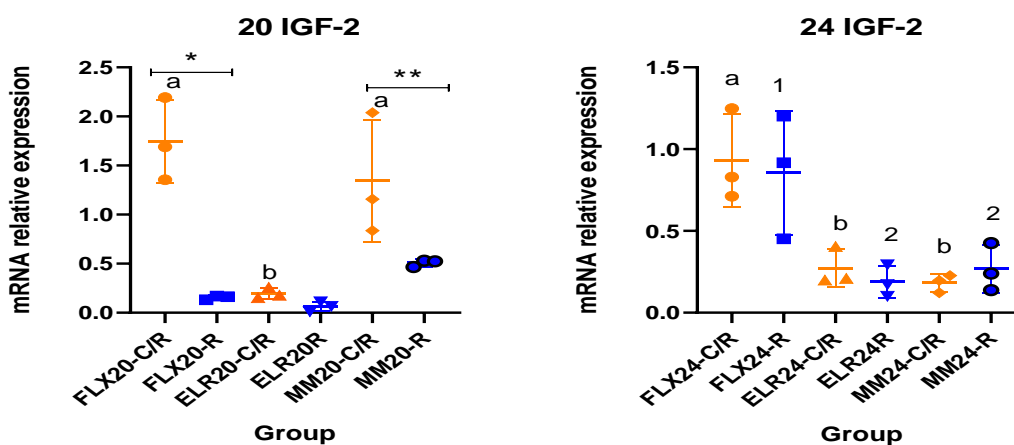


**Διάγραμμα 7.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου IGF-1 κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

## Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας 2 (IGF-2)

Η στατιστική ανάλυση στους 20°C έδειξε σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ αναπτυξιακών σταδίων ( $P < 0,001$ ), όσο και μεταξύ των διαφορετικών διατροφών ( $P < 0,001$ ), καθώς υπήρχε και αλληλεπίδραση αυτών στην έκφραση του γονιδίου, ( $P = 0,005$ ). Αναλυτικότερα οι διαφορές βρέθηκαν μεταξύ των διατροφών στο στάδιο FLX και στο στάδιο MM, όπου παρατηρήθηκε υπερ-έκφραση της ομάδας C/R συγκριτικά με την R. Επίσης υπήρξαν διαφορές μεταξύ των σταδίων στην διατροφή C/R και συγκεκριμένα εντοπίστηκαν μεταξύ FLX με ELR και MM με ELR, με το στάδιο ELR να εμφανίζει τη χαμηλότερη έκφραση. Δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα στάδια στη διατροφή R (Διάγραμμα 8).

Στους 24°C βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μόνο μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων ( $P < 0,001$ ), ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές στα διαφορετικά πρωτόκολλα διατροφής ούτε μεταξύ τους αλληλεπίδραση. Συγκεκριμένα και στις δύο διατροφές, οι διαφορές εντοπίστηκαν μεταξύ των σταδίων FLX με ELR και FLX με MM, με το στάδιο FLX να παρουσιάζει την υψηλότερη έκφραση και στις διατροφές (Διάγραμμα 8).

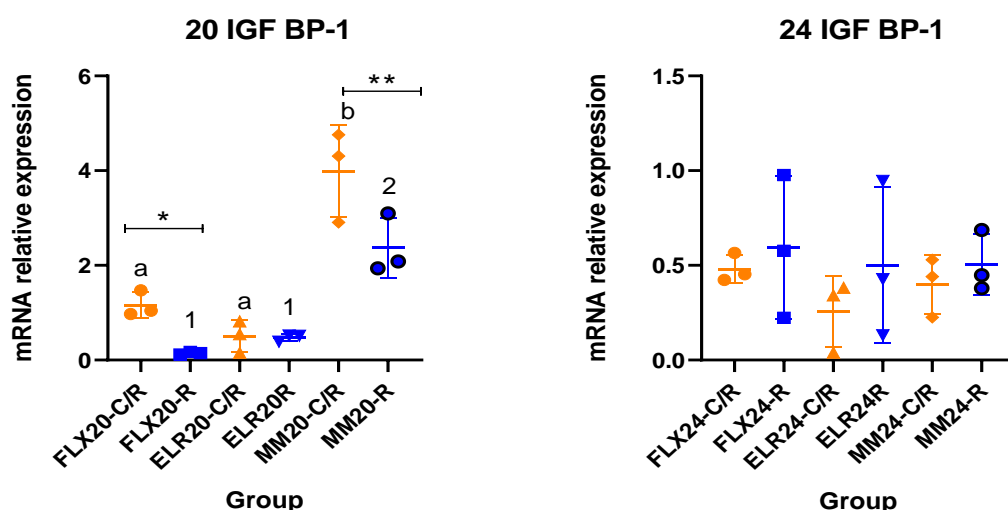


**Διάγραμμα 8.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου IGF-2 κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

### Δεσμεντική πρωτεΐνη IGF-1 (IGF BP-1)

Στους 20°C ανιχνεύθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο μεταξύ των σταδίων ανάπτυξης ( $P < 0,001$ ), όσο και στα διαφορετικά πρωτόκολλα διατροφής ( $P = 0,003$ ) με κοινό πρότυπο μεταβολών. Οι διαφορές εντοπίστηκαν μεταξύ των σταδίων MM με ELR και MM με FLX, με υψηλότερη έκφραση στο στάδιο MM και στις δύο διατροφές. Όσον αφορά την διατροφή μέσα σε κάθε στάδιο, βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μέσα στο στάδιο FLX και στο MM, όπου στην ομάδα C/R υπήρξε μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου (Διάγραμμα 9).

Η στατιστική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στους 24°C δεν βρήκε στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε ως προς τον παράγοντα της διατροφής, αλλά και στον παράγοντα των διαφορετικών σταδίων ( $P > 0,05$ ) (Διάγραμμα 9).



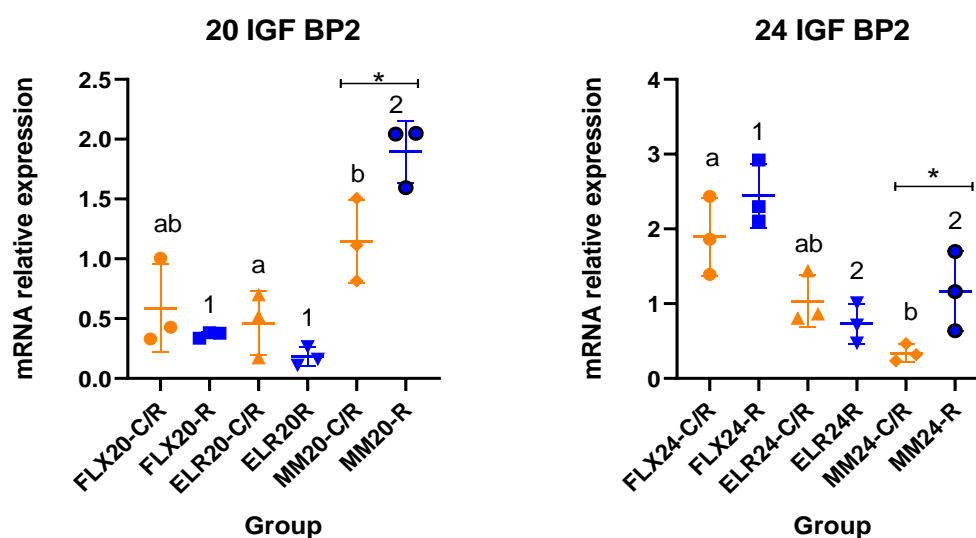
**Διάγραμμα 9.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου IGF BP-1 κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

### Δεσμεντική πρωτεΐνη IGF-2 (IGF BP-2)

Η στατιστική ανάλυση στους 20°C εντόπισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων ( $P < 0,001$ ), χωρίς όμως να βρεθούν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο διατροφών ( $P = 0,513$ ). Ωστόσο η διαφορά ανάμεσα στα

στάδια εξαρτάται από την διατροφή που υπάρχει με αποτέλεσμα να υπάρχει αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων ( $P = 0,007$ ). Οι διαφορές μέσα στα αναπτυξιακά στάδια βρέθηκαν μεταξύ MM με ELR στην διατροφή C/R, ενώ στην διατροφή R εντοπίστηκαν μεταξύ των σταδίων MM με ELR και MM με FLX. Επιπλέον βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο διατροφών μέσα στο στάδιο MM, όπου στην διατροφή R υπήρχε υψηλότερη έκφραση του γονιδίου (Διάγραμμα 10).

Στους 24°C βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα αναπτυξιακά στάδια ( $P < 0,001$ ), ενώ μεταξύ των διατροφών δεν εντοπίστηκε κάποια διαφορά ( $P = 0,081$ ). Οι συγκρίσεις κατά ζεύγη στην διατροφή C/R, έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων FLX με MM (FLX > ELR > MM), ενώ στην διατροφή R τα στάδια που διέφεραν ήταν FLX με ELR και FLX με MM, με την υψηλότερη έκφραση να παρατηρείται στο στάδιο FLX. Επίσης βρέθηκε διαφορά μεταξύ των διατροφών μόνο μέσα στο στάδιο MM, (R > C/R) (Διάγραμμα 10).

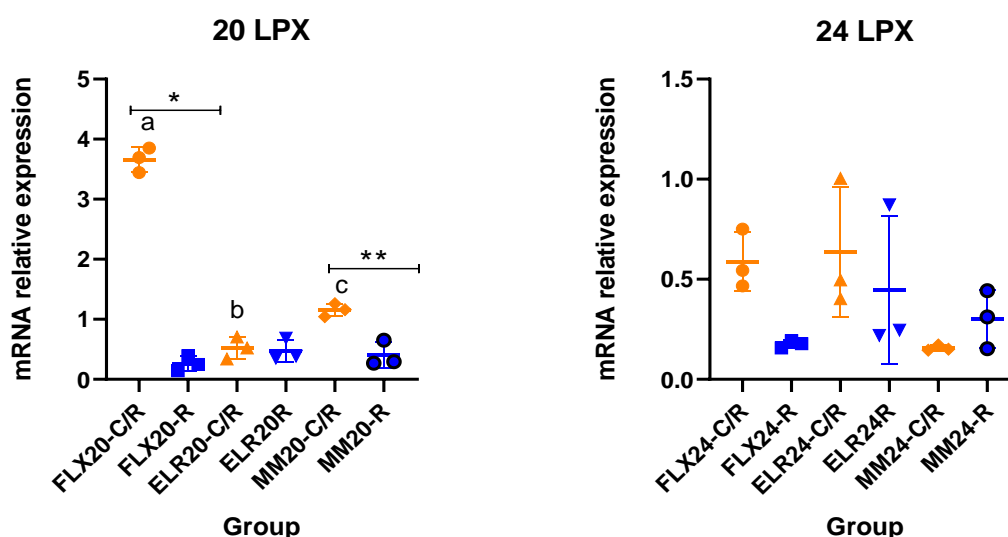


**Διάγραμμα 10.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου IGF BP-2 κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

## Λεπτίνη (LPX)

Για το γονίδιο της λεπτίνης η στατιστική ανάλυση στους 20°C έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές τόσο στα στάδια ανάπτυξης ( $P < 0,001$ ), όσο και στην διαφορετική διατροφή ( $P < 0,001$ ) με κοινό πρότυπο μεταβολών. Οι διαφορές μεταξύ των διατροφών βρέθηκαν στα στάδια FLX και MM, όπου στην διατροφή C/R υπήρχε υψηλότερη έκφραση του γονιδίου σε σχέση με την R. Στην ομάδα διατροφής C/R εντοπίστηκαν διαφορές σε όλα τα στάδια ανάπτυξης (FLX > MM > ELR), ενώ στην διατροφή R δεν υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων (Διάγραμμα 11).

Στους 24°C δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ούτε στον παράγοντα της διατροφής, αλλά και ούτε μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων,  $P > 0,05$  (Διάγραμμα 11).



**Διάγραμμα 11.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου LPX κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

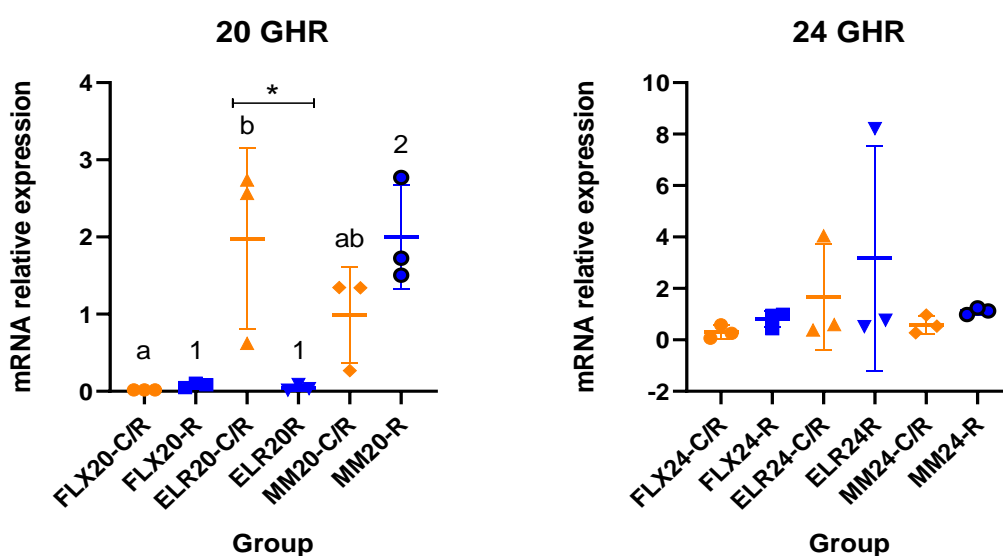
## Γκρελίνη (GHR)

Στους 20°C βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές μόνο μεταξύ των σταδίων ( $P = 0,005$ ), καθώς επίσης βρέθηκε στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση της διατροφής



και των αναπτυξιακών σταδίων για την έκφραση του γονιδίου. Μόνο μέσα στο στάδιο ELR διέφεραν οι δύο διατροφές, όπου στην ομάδα διατροφής C/R βρέθηκε υπερ-έκφραση του γονιδίου σε σχέση με την R. Στην διατροφή C/R διέφεραν μεταξύ τους τα στάδια ELR με FLX, με την μεγαλύτερη έκφραση να υπάρχει στο στάδιο ELR, ενώ στην διατροφή R οι διαφορές βρέθηκαν μεταξύ των σταδίων MM με ELR και MM με FLX, με υψηλότερη έκφραση στο στάδιο MM (Διάγραμμα 12).

Η στατιστική ανάλυση στους 24°C δεν εντόπισε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στην διαφορετική διατροφή, αλλά ούτε και στα αναπτυξιακά στάδια, ( $P > 0,05$ ) (Διάγραμμα 12).



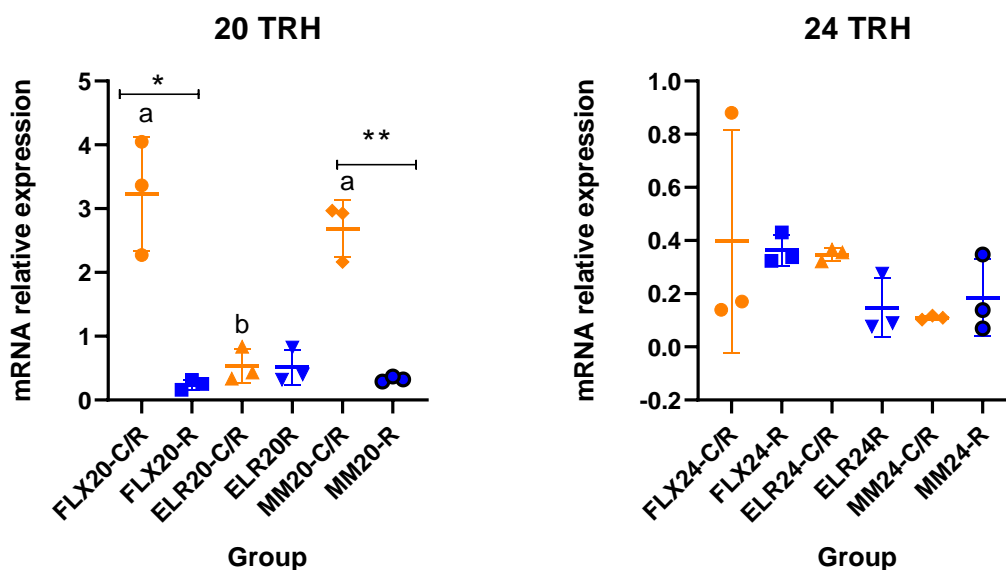
**Διάγραμμα 12.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $\bar{x} \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου GHR κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

### Ορμόνη απελευθέρωσης θυρεοτροπίνης (TRH)

Η στατιστική ανάλυση στους 20°C έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές και στους δύο παράγοντες που εξετάστηκαν με ( $P < 0,001$ ) και στις δύο περιπτώσεις αντίστοιχα, με κοινό πρότυπο μεταβολών. Οι διατροφές διέφεραν στα στάδια FLX και MM, με μεγαλύτερη έκφραση να παρατηρείται στην ομάδα C/R, ενώ όσον αφορά

τη διατροφή, στην C/R υπήρξαν διαφορές μεταξύ των σταδίων FLX με ELR και MM με ELR. Στην διατροφή R δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων (Διάγραμμα 13).

Δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στην θερμοκρασία των 24°C σε κανέναν από τους παράγοντες που ελέγχθηκαν, ( $P > 0,05$ ) (Διάγραμμα 13).

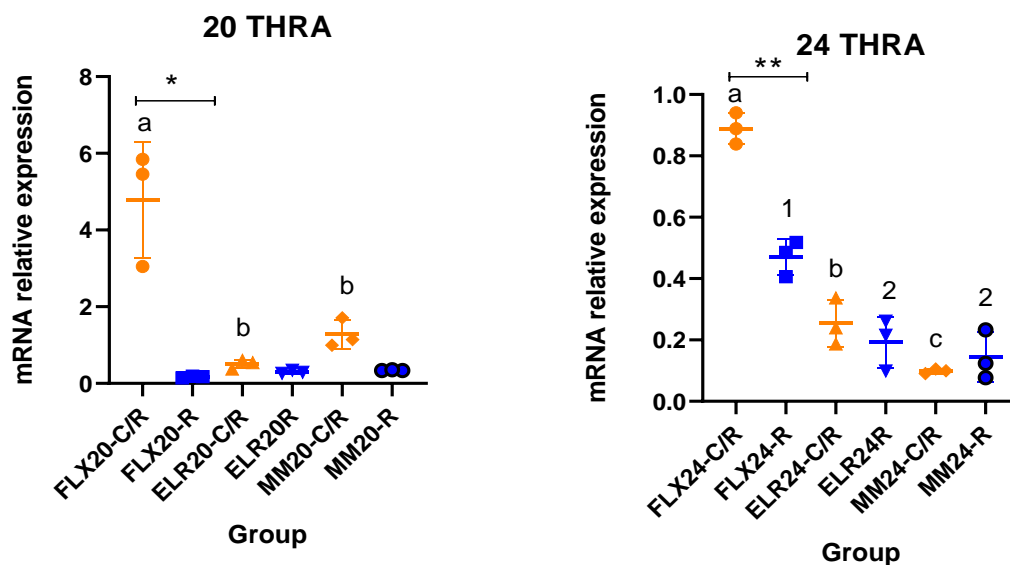


**Διάγραμμα 13.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $\bar{x} \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου TRH κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

### Υποδογέας θυρεοειδικών ορμονών Α (THRA)

Έπειτα από την στατιστική ανάλυση στους 20°C, βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο διατροφών, αλλά και στα αναπτυξιακά στάδια με ( $P < 0,001$ ) και στις δύο περιπτώσεις. Οι διατροφές διέφεραν μόνο στο στάδιο FLX (C/R > R). Με την διατροφή C/R βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων FLX με ELR και FLX με MM, ενώ στην διατροφή R δεν ανιχνεύτηκαν σημαντικές διαφορές (Διάγραμμα 14).

Στους 24°C βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων, αλλά και μεταξύ των διατροφών με ( $P < 0,001$ ) αντίστοιχα. Συγκεκριμένα βρέθηκαν στο στάδιο FLX μεταξύ των δύο διατροφών (C/R > R) Υπήρξαν διαφορές μεταξύ όλων των σταδίων στην διατροφή C/R με βαθμιαία μείωση της έκφρασης του γονιδίου (FLX > ELR > MM), ενώ στην διατροφή R, διέφεραν τα στάδια FLX με MM και FLX με ELR (Διάγραμμα 14).

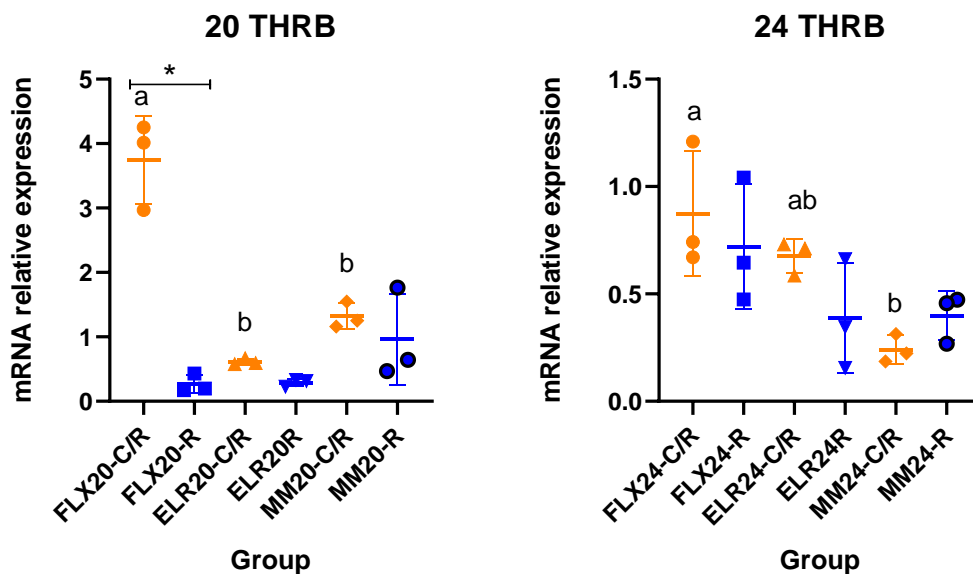


**Διάγραμμα 14.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου THRA κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

### Υποδογέας θυρεοειδικών ορμονών Β (THRB)

Στους 20°C υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές και στον παράγοντα της διατροφής αλλά και μεταξύ των σταδίων με ( $P < 0,001$ ) και στις δύο περιπτώσεις. Οι διαφορές βρέθηκαν μεταξύ των δύο πρωτοκόλλων διατροφής μέσα στο στάδιο FLX, με υψηλότερη έκφραση του γονιδίου να υπάρχει στην ομάδα C/R, αλλά και μεταξύ των σταδίων FLX με ELR και FLX με MM στην διατροφή C/R. Όσο για τα στάδια μέσα στην διατροφή R, δεν βρέθηκαν κάποιες διαφορές (Διάγραμμα 15).

Η ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στους 24°C εντόπισε στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων ( $P = 0,006$ ), χωρίς να υπάρχουν διαφορές στις δύο διατροφές ( $P = 0,353$ ) και στην αλληλεπίδραση αυτών. Αναλυτικότερα οι διαφορές βρέθηκαν μεταξύ των σταδίων FLX με MM στην διατροφή C/R (Διάγραμμα 15).



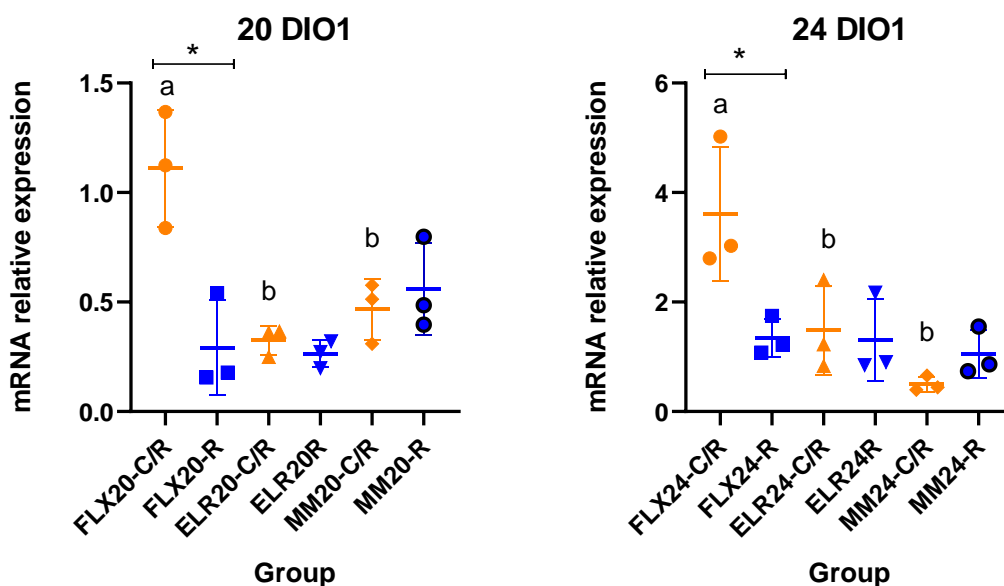
**Διάγραμμα 15.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $\bar{x} \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου THRβ κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

### Αποϊωδινάση τύπου 1 (DIO1)

Οι διαφορές που βρέθηκαν στους 20°C έπειτα από τη στατιστική ανάλυση ήταν τόσο στα στάδια ανάπτυξης, ( $P = 0,007$ ), όσο και μεταξύ των δύο διατροφών,  $P=0,009$  με κοινό πρότυπο μεταβολών, ( $P = 0,002$ ). Αυτές ήταν μέσα στο στάδιο FLX με τις δύο διατροφές να διαφέρουν ( $C/R > R$ ), καθώς και μεταξύ των σταδίων FLX με ELR και FLX με MM μέσα στη διατροφή C/R, με υψηλότερη έκφραση του γονιδίου στο στάδιο FLX (Διάγραμμα 16).

Στους 24°C οι στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν μόνο μεταξύ των διαφορετικών σταδίων με ( $P = 0,005$ ). Δεν βρέθηκε κάποια διαφορά μεταξύ των

διατροφών ( $P = 0,085$ ), ωστόσο η αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων ήταν σημαντική, ( $P = 0,014$ ). Οι διαφορές ήταν οι ίδιες με αυτές που βρέθηκαν στους  $20^{\circ}\text{C}$  (Διάγραμμα 16).



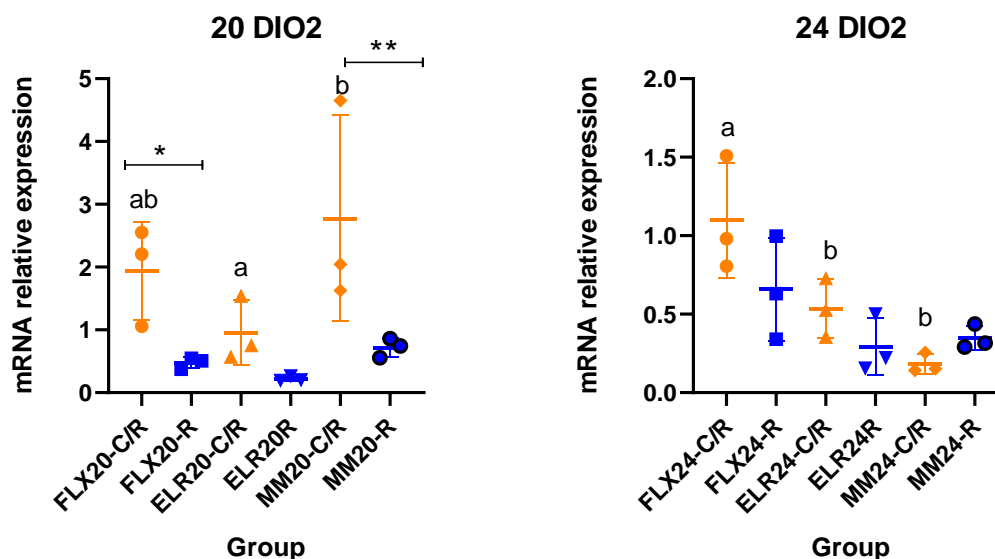
**Διάγραμμα 16.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm \text{SD}$ ) της έκφρασης του γονιδίου DIO1 κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια ( $20^{\circ}\text{C}$  αριστερά,  $24^{\circ}\text{C}$  δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

### Αποϊωδινάση τύπου 2 (DIO2)

Η στατιστική ανάλυση στους  $20^{\circ}\text{C}$  έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο στον παράγοντα της διατροφής με ( $P = 0,002$ ). Μέσα στα αναπτυξιακά στάδια δεν βρέθηκαν διαφορές, ( $P = 0,069$ ), ούτε υπήρχε αλληλεπίδραση των παραγόντων, ( $P = 0,367$ ). Οι διαφορές μεταξύ των διατροφών βρέθηκαν στα στάδια FLX και MM, όπου στην διατροφή C/R βρέθηκε μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου, καθώς εντοπίστηκαν διαφορές μεταξύ των σταδίων MM με ELR στην διατροφή C/R (Διάγραμμα 17).

Στους  $24^{\circ}\text{C}$  βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, ( $P = 0,002$ ), ενώ δεν βρέθηκε κάποια σημαντική διαφορά μεταξύ των διατροφών, ( $P = 0,137$ ) καθώς ούτε αλληλεπίδραση των παραγόντων, ( $P$

= 0,109). Τα αναπτυξιακά στάδια διέφεραν μόνο μέσα στην διατροφή C/R με τις διαφορές να βρίσκονται μεταξύ FLX με MM και FLX με ELR, με μεγαλύτερη έκφραση του γονιδίου στο στάδιο FLX (Διάγραμμα 17).



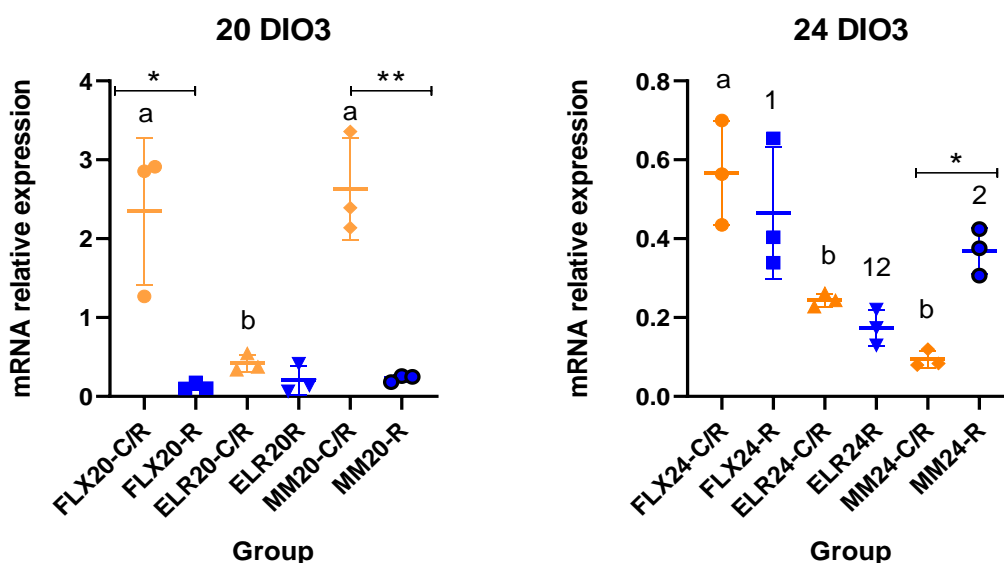
**Διάγραμμα 17.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου DIO2 κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.

### Αποϊωδινάση τύπου 3 (DIO3)

Έπειτα από την διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης στους 20°C, βρέθηκαν σημαντικές διαφορές τόσο στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια, ( $P = 0,003$ ), όσο και ανάμεσα στις δύο διατροφές, ( $P < 0,001$ ) με κοινό πρότυπο μεταβολών. Συγκεκριμένα οι δύο διατροφές διέφεραν μέσα στα στάδια FLX και MM (C/R > R) και στην διατροφή C/R βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των σταδίων MM με ELR και FLX με ELR (Διάγραμμα 18).

Στους 24°C υπήρξαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων  $P < 0,001$  και δεν βρέθηκαν διαφορές στις διατροφές, ( $P = 0,442$ ). Υπήρχε ωστόσο σημαντική αλληλεπίδραση των παραγόντων με ( $P = 0,008$ ). Εντοπίστηκαν διαφορές στις δύο διατροφές μόνο στο στάδιο MM με υψηλότερη έκφραση του γονιδίου στην ομάδα R. Στην διατροφή C/R διέφεραν μεταξύ τους τα στάδια FLX με MM και FLX

με ELR, ενώ στην διατροφή R οι διαφορές ήταν ανάμεσα σε FLX και ELR (Διάγραμμα 18).

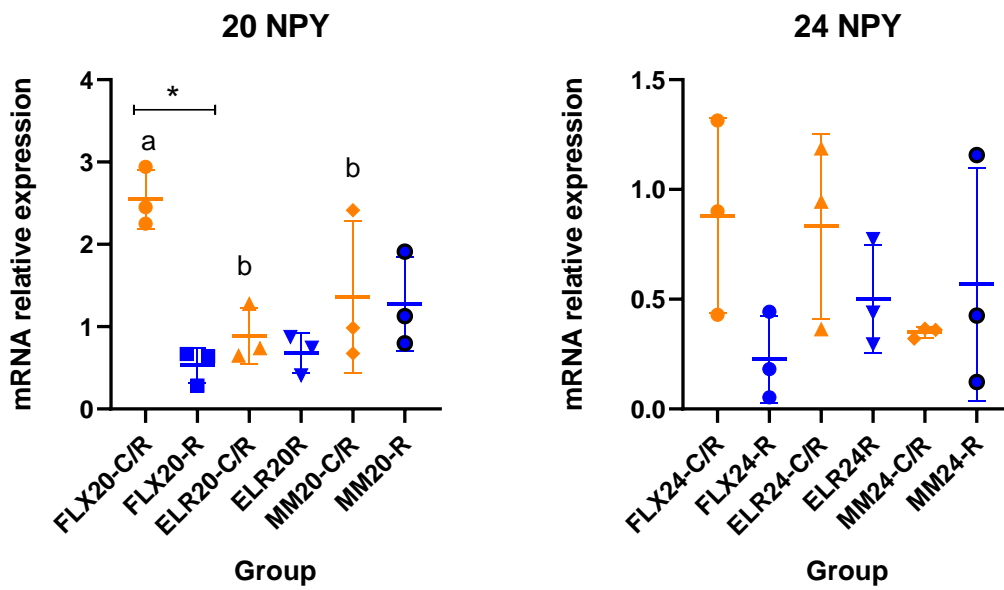


**Διάγραμμα 18.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου DIO3 κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διαγραμμα 5.

### Νευροπεπτίδιο Y (NPY)

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης στους 20°C έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση της διατροφής ( $P = 0,007$ ), χωρίς όμως να υπάρχει επίδραση μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων ( $P = 0,061$ ). Η επίδραση όμως που υπάρχει στην διατροφή εξαρτάται από τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Διαφορές στην διατροφή εμφανίστηκαν μόνο στο στάδιο FLX (C/R > R). Όσον αφορά τη διατροφή C/R βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των σταδίων FLX με ELR και FLX με MM, ενώ δεν υπήρχαν διαφορές στα στάδια στην διατροφή R (Διάγραμμα 19).

Δεν βρέθηκε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στους 24°C, τόσο μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων,  $P = 0,562$ , όσο και στις δύο διατροφές,  $P = 0,256$  (Διάγραμμα 19).



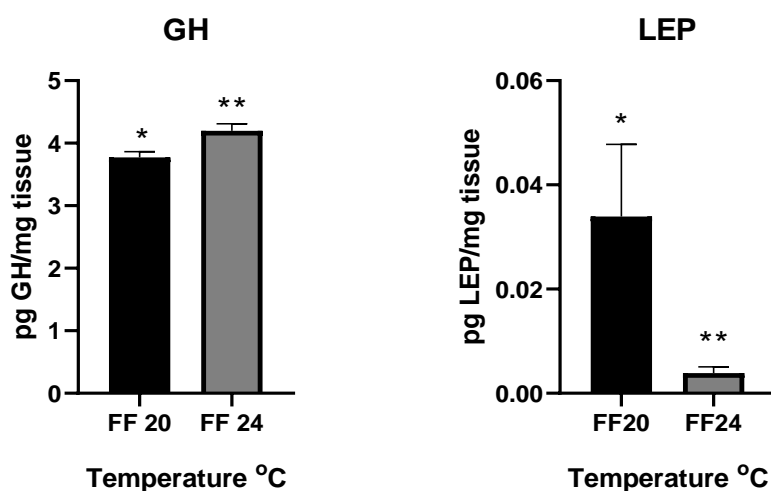
**Διάγραμμα 19.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της έκφρασης του γονιδίου IYD κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20<sup>0</sup>C αριστερά, 24<sup>0</sup>C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ). Λεπτομέρειες για τα αναπτυξιακά στάδια και τις συνθήκες διατροφής δίνονται στο Διάγραμμα 5.



### 3.3 Ενδοκρινικές Αναλύσεις

#### 3.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στη συγκέντρωση των ορμονών στο πρώτο τάισμα

Στο στάδιο του πρώτου ταΐσματος οι στατιστικά σημαντικές διαφορές που ανιχνεύτηκαν στη συγκέντρωση των ορμονών σε σχέση με τις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες από τις οποίες προέρχονταν οι προνύμφες (20°C ή 24°C), αφορούσαν την αυξητική ορμόνη (GH) ( $P = 0,026$ ), με μεγαλύτερη συγκέντρωση να παρουσιάζεται στις προνύμφες που ήταν στους 24°C, καθώς και την λεπτίνη (LEP) ( $P = 0,013$ ) η οποία είχε στατιστικά μεγαλύτερη συγκέντρωση στις προνύμφες που βρίσκονταν στους 20°C κατά την εκκόλαψη (**Διάγραμμα 20**). Οι ορμόνες IGF-1,  $T_3$  δεν εμφάνισαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο θερμοκρασιών για επίπεδο σημαντικότητας  $P = 0,05$ .



**Διάγραμμα 20.** Συγκεντρώσεις GH (αριστερά), LEP (δεξιά) σε ολόκληρο το σώμα προνυμφών κατά το στάδιο πρώτου ταΐσματος (FF). Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει τον μέσο όρο τριών επαναλήψεων και οι μπάρες σφάλματος αποτυπώνουν το τυπικό σφάλμα των μέσων. Οι αστερίσκοι δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δύο θερμοκρασιών ( $P < 0,05$ ).

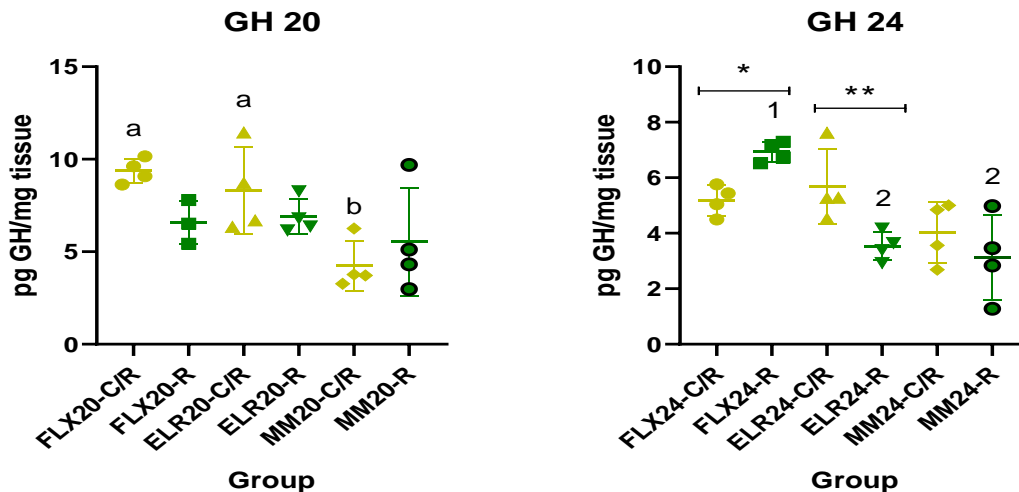
### 3.3.2 Επίδραση ζωντανής τροφής

Η ανάλυση της επίδρασης των διαφορετικών πρωτοκόλλων διατροφής (μόνο τροχόζωα R ή κωπήποδα και τροχόζωα C/R) για τον προσδιορισμό των ορμονών, διενεργήθηκε ξεχωριστά για τα επόμενα αναπτυξιακά στάδια για τις ομάδες που βρίσκονταν κατά την επώαση εμβρύων και προνυμφών στους 20°C ή στους 24°C.

#### Αυξητική ορμόνη (GH)

Τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης στους 20°C έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική επίδραση των αναπτυξιακών σταδίων ( $P = 0,007$ ), χωρίς όμως να υπάρχει επίδραση της διατροφής ( $P = 0,212$ ). Οι διαφορές εντοπίστηκαν στην διατροφή C/R μεταξύ των σταδίων FLX με MM και ELR με MM ( $FLX > ELR > MM$ ) (Διάγραμμα 21).

Στους 24°C οι στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν μόνο μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων ( $P < 0,001$ ), ενώ οι διατροφές δεν διέφεραν μεταξύ τους ( $P = 0,312$ ). Η επίδραση όμως που παρατηρείται στα αναπτυξιακά στάδια, εξαρτάται από τον παράγοντα της διατροφής που υπάρχει ( $P = 0,004$ ). Οι διαφορές μεταξύ των δύο διατροφών βρέθηκαν στα στάδια FLX, όπου υπήρχε υψηλότερη συγκέντρωση στην ομάδα διατροφής R, καθώς και στο στάδιο ELR με υψηλότερη συγκέντρωση να υπάρχει στην ομάδα διατροφής C/R. Όσον αφορά τις διαφορές μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων, αυτές βρέθηκαν μόνο μέσα στην διατροφή R και διέφεραν μεταξύ τους τα στάδια FLX με MM και FLX με ELR ( $FLX > ELR > MM$ ). Στην ομάδα διατροφής C/R δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα στάδια (Διάγραμμα 21).



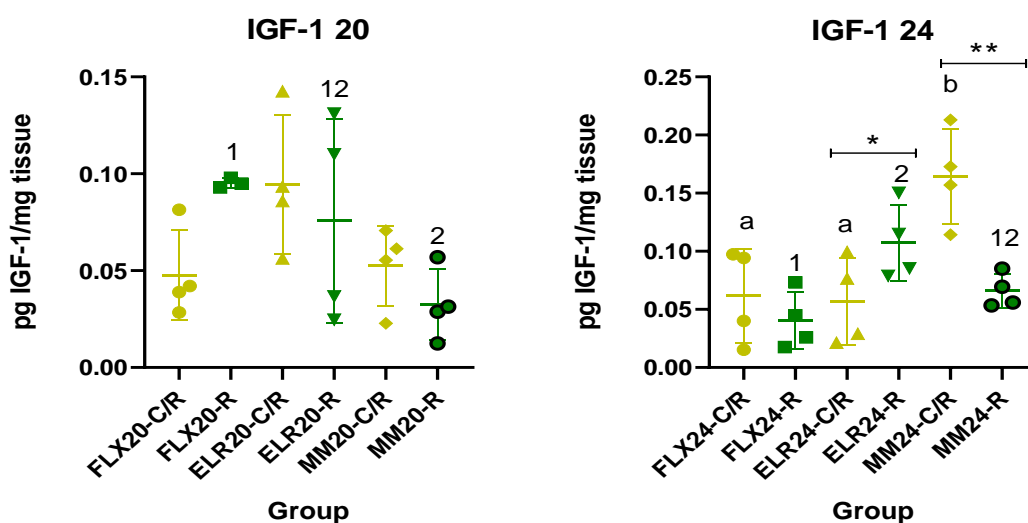
**Διάγραμμα 21.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της συγκέντρωσης της ορμόνης GH κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια ( $20^{\circ}\text{C}$  αριστερά,  $24^{\circ}\text{C}$  δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ).

### Ινσουλινομιμητικός αυξητικός παράγοντας 1 (IGF-1)

Η στατιστική ανάλυση στους  $20^{\circ}\text{C}$  έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές μόνο στον παράγοντα των αναπτυξιακών σταδίων ( $P = 0,038$ ), καθώς δεν βρέθηκαν διαφορές στον παράγοντα της διατροφής ( $P = 0,829$ ). Οι διαφορές εντοπίστηκαν μόνο στην διατροφή R μεταξύ των σταδίων ανάπτυξης FLX και MM (**Διάγραμμα 22**).

Στους  $24^{\circ}\text{C}$  υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των σταδίων ανάπτυξης ( $P = 0,004$ ), ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές ανάμεσα στις δύο διατροφές ( $P = 0,108$ ). Η επίδραση όμως των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων εξαρτάται από την τύπο διατροφής που υπάρχει ( $P = 0,001$ ). Στο αναπτυξιακό στάδιο FLX δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων διατροφής. Στο στάδιο ELR βρέθηκαν διαφορές στις δύο διατροφές όπου η συγκέντρωση ήταν μεγαλύτερη στην διατροφή R σε σχέση με τη C/R. Αντιθέτως στο στάδιο MM η διατροφή C/R εμφάνιζε υψηλότερη συγκέντρωση συγκριτικά με την R. Επίσης στη διατροφή C/R διέφεραν μεταξύ τους τα στάδια MM με ELR και MM με FLX. Στην

διατροφή R οι διαφορές στα στάδια εντοπίστηκαν μεταξύ ELR με FLX (Διάγραμμα 22).

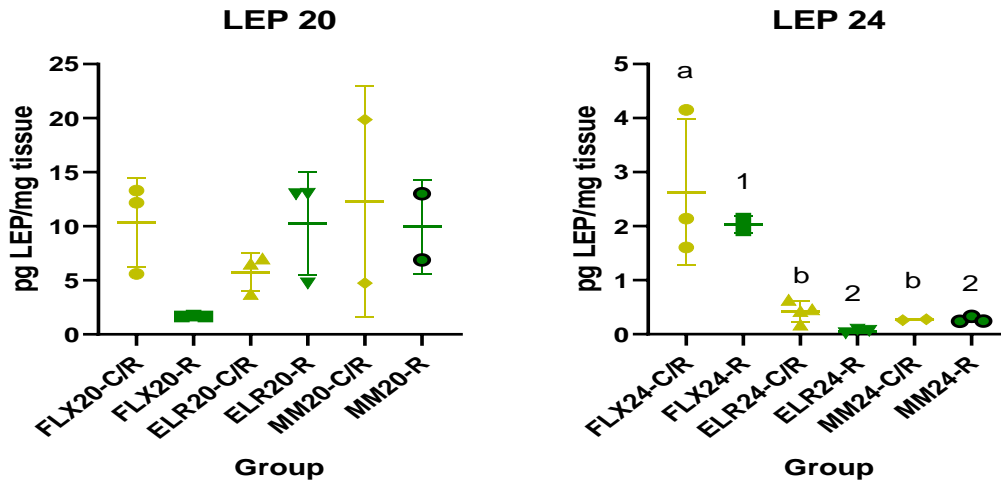


**Διάγραμμα 22.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $\bar{x} \pm SD$ ) της συγκέντρωσης του IGF-1 κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Ο αστερίσκος δηλώνει στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών τροφών μέσα σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο. Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ).

### Λεπτίνη (LEP)

Η στατιστική ανάλυση στους 20°C δεν έδειξε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά στον παράγοντα της διατροφής ( $P = 0,381$ ) και στον παράγοντα των σταδίων ανάπτυξης ( $P = 0,285$ ) (Διάγραμμα 23).

Στους 24°C η μόνη στατιστικά σημαντική επίδραση ήταν του παράγοντα των αναπτυξιακών σταδίων ( $P < 0,001$ ), ενώ δεν εντοπίστηκε καμία διαφορά στον παράγοντα της διατροφής ( $P = 0,291$ ). Συγκεκριμένα διέφεραν μεταξύ τους τα στάδια FLX με ELR και FLX με MM και στις δύο διατροφές με υψηλότερη συγκέντρωση στο στάδιο FLX (Διάγραμμα 23).

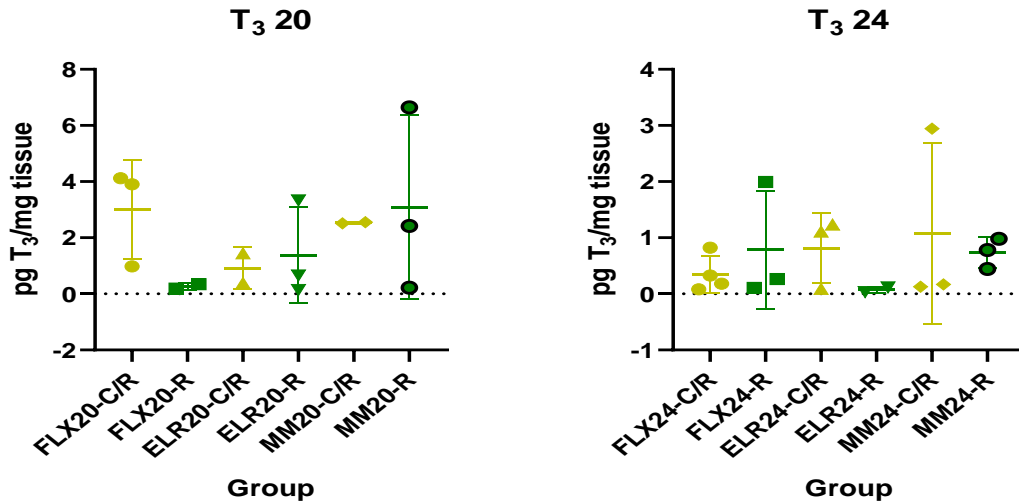


**Διάγραμμα 23.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $\bar{x} \pm SD$ ) της συγκέντρωσης της λεπτίνης κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια (20°C αριστερά, 24°C δεξιά). Τα γράμματα δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής C/R. Οι αριθμοί δηλώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στο πρωτόκολλο διατροφής R (Tukey's test,  $P < 0,05$ ).

### Τριωδοθυρονίνη (T<sub>3</sub>)

Η στατιστική ανάλυση στους 20°C δεν εντόπισε καμία στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων ( $P = 0,208$ ), αλλά ούτε και ανάμεσα στις δύο διατροφές ( $P = 0,758$ ) (**Διάγραμμα 24**)

Παρομοίως στους 24°C δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα αναπτυξιακά στάδια ( $P = 0,856$ ) και μεταξύ των δύο διατροφών ( $P = 0,606$ ) (**Διάγραμμα 24**).



**Διάγραμμα 24.** Μεταβολές (διάγραμμα διασποράς,  $x \pm SD$ ) της συγκέντρωσης της  $T_3$  κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια ( $20^\circ C$  αριστερά,  $24^\circ C$  δεξιά). Δεν εντοπίστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των παραγόντων ( $P > 0,05$ ).

### 3.4 Μη παραμετρική ανάλυση συσχέτισης των γονιδίων (Spearman's Rank-Order Correlation)

Ως μη παραμετρικό μέτρο συσχετισμού μεταξύ των μεταβλητών της γονιδιακής έκφρασης υπολογίστηκε το Nonparametric Spearman rank order correlation test, το οποίο έδειξε τη στατιστικά σημαντική θετική (positive) ή αρνητική συσχέτιση (negative correlation) στην έκφραση των γονιδίων (**Πίνακας 4**).

**Πίνακας 4.** Nonparametric Spearman rank order correlation test of fold gene expression. Η στατιστικά σημαντική συσχέτιση σημειώνεται με κόκκινα γράμματα,  $P < 0.05$ .

Variable	GH	GHRH	GHR	LPX	IGF1	IGF2	IGF-BP1	IGF-BP2	TRH	THRA	THRB	DIO1	DIO2	DIO3	NPY
GH	-														
GHRH	0.42	-													
GHR	0.13	-0.35	-												
LPX	0.38	<b>0.76</b>	-0.30	-											
IGF1	<b>0.56</b>	0.13	0.51	0.24	-										
IGF2	<b>0.80</b>	<b>0.57</b>	-0.04	0.51	<b>0.59</b>	-									
IGF-BP1	<b>0.59</b>	0.43	0.22	0.09	<b>0.62</b>	<b>0.64</b>	-								
IGF-BP2	<b>0.56</b>	0.01	<b>0.65</b>	-0.09	<b>0.70</b>	<b>0.56</b>	0.51	-							
TRH	0.38	<b>0.91</b>	-0.38	<b>0.71</b>	0.11	<b>0.66</b>	0.38	0.09	-						
THRA	0.47	<b>0.80</b>	-0.20	<b>0.76</b>	0.18	<b>0.75</b>	0.36	0.21	<b>0.89</b>	-					
THRB	<b>0.56</b>	<b>0.65</b>	-0.05	<b>0.84</b>	0.37	<b>0.71</b>	0.33	0.21	<b>0.67</b>	<b>0.88</b>	-				
DIO1	<b>0.73</b>	0.23	0.16	0.40	0.31	<b>0.62</b>	0.05	0.53	0.27	0.51	<b>0.62</b>	-			
DIO2	0.44	<b>0.77</b>	-0.25	<b>0.83</b>	0.32	<b>0.67</b>	0.31	0.21	<b>0.75</b>	<b>0.82</b>	<b>0.82</b>	0.49	-		

<b>DIO3</b>	0.77	0.75	-0.11	0.69	0.45	0.89	0.51	0.45	0.78	0.82	0.73	0.62	0.81	-
<b>NPY</b>	0.16	0.57	-0.22	0.61	0.02	0.51	0.20	-0.11	0.72	0.80	0.68	0.20	0.50	0.48

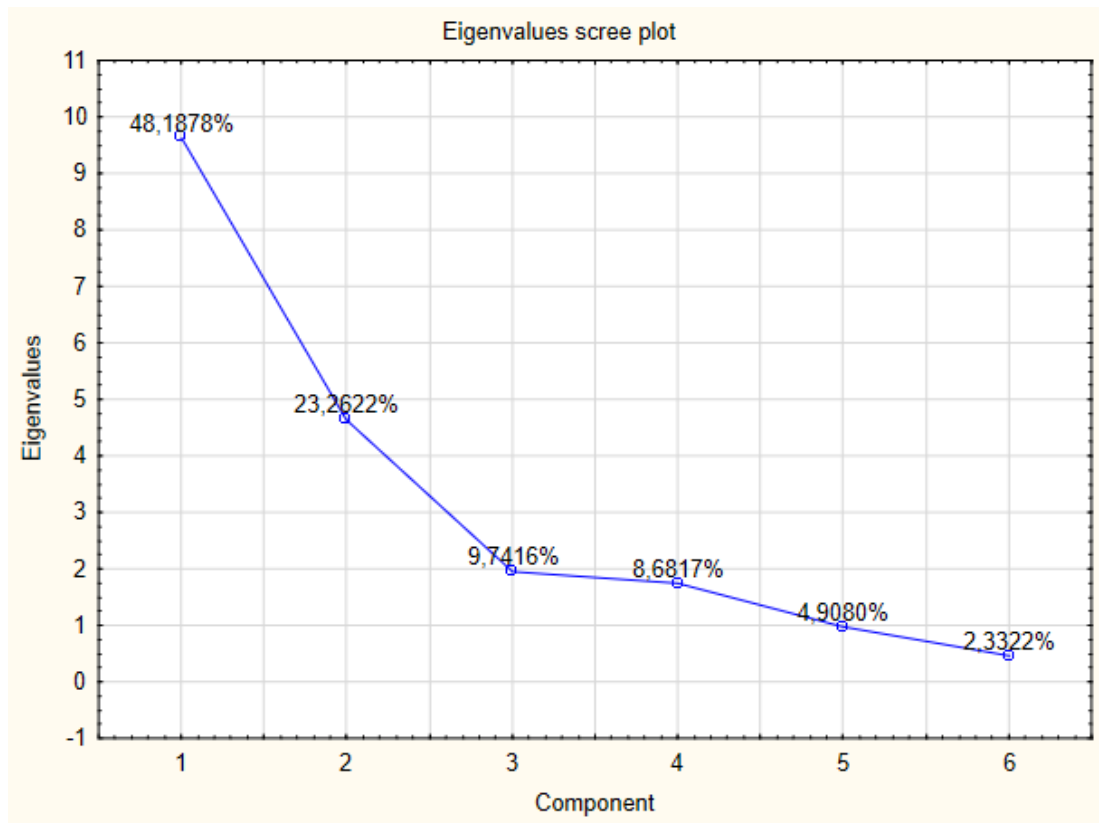
Από τον παραπάνω πίνακα προκύπτουν συσχετίσεις των γονιδίων. Για παράδειγμα η έκφραση του γονιδίου της αυξητικής ορμόνης (GH) συσχετίζεται θετικά με την έκφραση των γονιδίων IGF-1, IGF-2, IGF BP-1, IGF BP-2 κλπ.

### 3.5 Ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (Principal Components Analysis, PCA)

Η PCA είναι μια στατιστική μέθοδος που επιτρέπει την ομαδοποίηση των μεταβλητών βάσει της διακύμανσης τους σε μικρότερο αριθμό μεταβλητών διατηρώντας παράλληλα ένα μέγιστο ποσό διακύμανσης. Πρώτα υπολογίστηκαν τα χαρακτηριστικά στοιχεία γραμμικού μετασχηματισμού (Eigenvalues) που ταξινομούνται από το υψηλότερο περιεχόμενο ως προς χαμηλότερο περιεχόμενο πληροφοριών. Στον **Πίνακα 5** φαίνονται τα ποσοστά της συνολικής και αθροιστικής διακύμανσης για τη συνολική γονιδιακή έκφραση. Το πρώτο στοιχείο (Principal Component) περιέχει τη μέγιστη διακύμανση, ενώ το τελευταίο περιέχει τη μικρότερη ποσότητα διακύμανσης. Στο **Διάγραμμα 25** αποτυπώνονται τα ποσοστά της συνολικής διακύμανσης κάθε κύριου στοιχείου.

**Πίνακας 5.** Ανάλυση κύριων συνιστωσών (Eigenvalues) με τα ποσοστά της συνολικής και αθροιστικής διακύμανσης της γονιδιακής έκφρασης

	Eigenvalue	Total variance %	Cumulative Eigenvalue	Cumulative %
1	9.64	48.19	9.64	48.18
2	4.65	23.26	14.29	71.45
3	1.94	9.74	16.23	81.19
4	1.73	8.68	17.97	89.87
5	0.98	4.90	18.95	94.78
6	0.46	2.33	19.42	97.11



**Διάγραμμα 25.** Eigenvalues συνολικής διακύμανσης (total variance). Τα τρία πρώτα κύρια στοιχεία εξηγούν το 81,19% της συνολικής διακύμανσης των δεδομένων

Στον **Πίνακα 6**, βρίσκεται η ερμηνεία για τα πρώτα 6 κύρια στοιχεία (PC1 - PC6) σε σχέση με το μέγεθος και την κατεύθυνση των συντελεστών με βάση την αρχική μεταβλητότητα τους (loadings). Όσο μεγαλύτερη είναι η απόλυτη τιμή του συντελεστή (coefficient), τόσο πιο σημαντική είναι η αντίστοιχη μεταβλητότητα του για τον υπολογισμό των κύριων στοιχείων (PC1 - PC6).

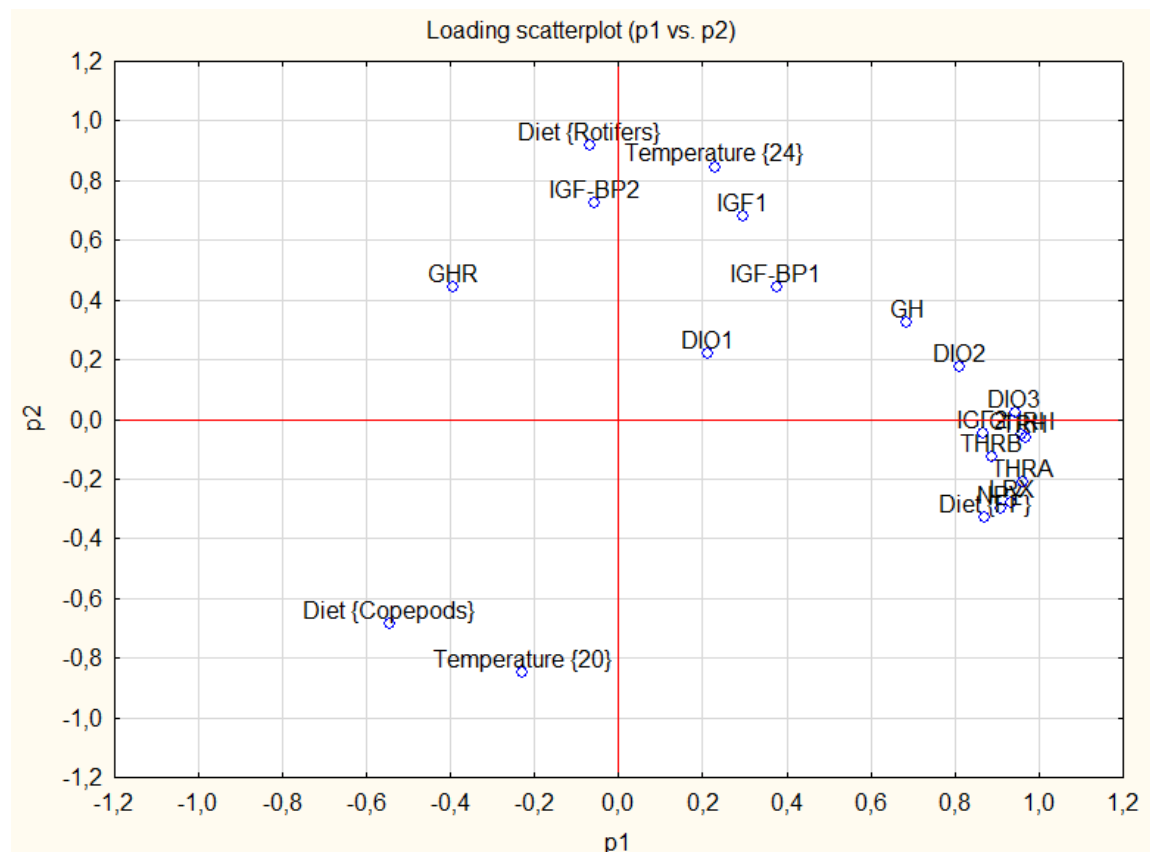
**Πίνακας 6.** Ερμηνεία κάθε κύριου στοιχείου (Principal Components) με βάση την αρχική μεταβλητότητα της γονιδιακής έκφρασης, της διατροφής και της θερμοκρασίας.

Variables	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6
<b>GH</b>	0,685836	0,326972	0,084952	0,572538	0,112671	0,094501
<b>GHRH</b>	0,958915	-0,05219	0,099862	-0,08138	0,086314	0,225413
<b>GHR</b>	-0,39303	0,442731	-0,31883	0,243517	0,622228	-0,27446
<b>LPX</b>	0,934126	-0,27671	0,143775	0,045599	0,072475	-0,12412
<b>IGF1</b>	0,294656	0,678925	-0,52693	-0,03366	-0,09254	0,030885
<b>IGF2</b>	0,868081	-0,04698	-0,31764	-0,03264	-0,21127	-0,29967
<b>IGF-BP1</b>	0,375593	0,441995	-0,67981	-0,07591	0,314135	0,178694



IGF-BP2	-0,05707	0,723779	-0,28122	0,52798	-0,17122	0,088117
TRH	0,967503	-0,06305	-0,13287	-0,12936	-0,10317	-0,00363
THRA	0,96289	-0,21015	0,119016	0,050657	0,083442	-0,01566
THRB	0,886732	-0,1244	0,24728	0,117893	0,242125	0,209247
DIO1	0,213716	0,219738	0,185928	0,854759	-0,33999	-0,05253
DIO2	0,812609	0,17546	-0,34683	-0,28753	-0,26673	0,063389
DIO3	0,942374	0,022144	-0,22923	-0,1487	-0,17921	-0,00949
NPY	0,908458	-0,29956	-0,09017	0,069022	0,203884	-0,12222
Diet {FF}	0,871192	-0,33035	0,246174	0,114219	0,155087	-0,10731
Diet {Copepods}	-0,5464	-0,68478	-0,36117	0,180594	0,006275	0,245556
Diet {Rotifers}	-0,06963	0,918369	0,187099	-0,26136	-0,11594	-0,16968
Temperature {20}	-0,22873	-0,84661	-0,421	0,182339	-0,08264	-0,09761
Temperature {24}	0,228728	0,846611	0,420997	-0,18234	0,082642	0,097611

Τέλος για την οπτικοποίηση της κατανομής των μεταβλητών στον χώρο διάταξης δημιουργήθηκε ένα διάγραμμα διασποράς (scatterplot). Στον άξονα x φαίνεται ο PC1, ενώ στο άξονα y ο PC2 (Διάγραμμα 26).



Διάγραμμα 26. PCA scatterplot για τα μελετημένα γονίδια, των θερμοκρασιών και των διατροφών.

Παρατηρώντας τον **Πίνακα 6** και το **Διάγραμμα 26** προκύπτει ότι το πρώτο κύριο συστατικό PC1 έχει μεγαλύτερους θετικούς συσχετισμούς με GH, DIO2, DIO3, TRH, THRB, THRA, NPY, IGF-2, LPX και Diet (FF), ενώ έχει αρνητική συσχέτιση με GHR και Diet (Copepods). Η θερμοκρασία στους 20°C και στους 24°C έχει χαμηλή συσχέτιση ( $\approx -0,2$  και  $0,2$  αντίστοιχα). Η μεταβλητή Diet (Rotifers) έχει σχεδόν μηδενική συσχέτιση με τον PC1. Συνεπώς ο PC1 δείχνει την επίδραση της διατροφής στην έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη. Εν αντιθέσει ο PC2 έχει ισχυρή αρνητική συσχέτιση με Temperature (20°C) και Diet (Copepods), ενώ έχει ισχυρή θετική συσχέτιση με Temperature (24°C) και Diet (Rotifers). Επομένως ο PC2 φαίνεται να αντιπροσωπεύει κυρίως την επίδραση της θερμοκρασίας στην έκφραση των γονιδίων. Ο PC1 έχει μεγαλύτερο βάρος στην συνολική μεταβλητότητα (48,18%) σε σχέση με τον PC2 (23,26%), η διατροφή συνεπώς φαίνεται ότι παίζει πιο μεγάλο ρόλο σε σχέση με τη θερμοκρασία για την έκφραση των γονιδίων και κατ' επέκταση την ανάπτυξη.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 4.1 Επίδραση της θερμοκρασίας και της διατροφής στην αύξηση των νυμφών

Οι διαφορετικές θερμοκρασίες κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια προκαλούν φαινοτυπική πλαστικότητα στα ψάρια, με αποτέλεσμα να επηρεάζονται διάφορες διεργασίες (φυσιολογικές, μοριακές, συμπεριφορικές) που σχετίζονται με την ανάπτυξη, την αναπαραγωγή και την επιβίωση τους (Hochachka and Somero, 2002· Kingsolver και Huey, 1998· Stillman, 2004). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι θερμοκρασία έχει σημαντική επίδραση στον χρόνο που συμβαίνουν οι οντογενετικές αλλαγές, όπως είναι η εκκόλαψη, η κάμψη της νωτοχορδής, η μεταμόρφωση κλπ, και αυτές μπορεί να διαφέρουν μεταξύ διαφορετικών θερμοκρασιών.

Στην συγκεκριμένη μελέτη παρατηρήθηκε ότι οι προνύμφες που προέρχονταν από τους 24°C είχαν μικρότερη διάρκεια του προνυμφικού σταδίου και έφτασαν στο στάδιο του πρώτου ταΐσματος ταχύτερα (> 50% ταχύτερη ανάπτυξη) σε σχέση με τις προνύμφες που βρίσκονταν στους 20°C κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης. Η μειωμένη διάρκεια του σταδίου με την αύξηση της θερμοκρασίας σε επιτρεπτά όρια αντοχής για το κάθε είδος, έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες, όπως στο ευρωπαϊκό χέλι (*Anguilla anguilla*) (Politis et al., 2017), στον μπακαλιάρο του Ατλαντικού (*Gadus morhua*) (Politis et al., 2014), στο ψάρι zebra (*Danio rerio*) (Villamizar et al.) καθώς και σε διάφορα άλλα είδη. Ωστόσο συνήθως οι προνύμφες που εκκολάπτονται πιο γρήγορα σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, έχουν μειωμένη αποτελεσματικότητα ως προς τη χρήση του λεκιθικού σάκου και μικρότερη ανάπτυξη καθώς δυσκολεύονται να μετατρέψουν τον λεκιθικό σάκο σε σωματικό ιστό (Politis et al., 2017, Rombough, 1997).

Σχετικά με την εξέλιξη του μήκους των ιχθυονυμφών, βρέθηκε ότι η ομάδα με τον βραδύτερο ρυθμό αύξησης ήταν αυτή που η διατροφή αποτελούνταν από τροχόζωα και όπου κατά τη διάρκεια του αυτότροφου σταδίου βρισκόταν στους 20°C. Εν αντιθέσει τον υψηλότερο ρυθμό αύξησης μήκους παρουσίασαν οι νύμφες οι οποίες είχαν τραφεί με τροχόζωα & κωπήποδα στους 20°C (C/R-20 > C/R-24 > R-24 > R-20). Στο τέλος της νυμφικής εκτροφής η επιβίωση ήταν χαμηλή σε όλες τις ομάδες με καλύτερη εικόνα να έχουν οι ομάδες που τράφηκαν με συνδυασμό

τροχοζώων και κωπηπόδων στους 20°C (6,1%) και στους 24°C (6,8%). Οι ομάδες που τράφηκαν με τροχόζωα είχαν την πιο μικρή επιβίωση και στις δύο θερμοκρασίες.

Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η προσθήκη των κωπηπόδων ως ζωντανή τροφή κατά τη νυμφική εκτροφή στο μαγιάτικο, βελτίωσε σημαντικά την επιβίωση των προνυμφών και για τις δύο θερμοκρασίες εκκόλαψης, καθώς επίσης ενίσχυσε και την ανάπτυξη. Ο εμπλουτισμός με κωπήποδα, αποκλειστικά ή σε συνδυασμό με άλλα θηράματα, έχει επιφέρει ισχυρή βελτίωση στην εκτροφή των ιχθυονυμφών σε αρκετά είδη. Για παράδειγμα οι νύμφες τσιπούρας που τράφηκαν με αποκλειστική διατροφή κωπηπόδων εμφάνισαν υψηλότερη αύξηση και επιβίωση, ακολουθούμενη από τον συνδυασμό κωπηπόδων & τροχοζώων, ενώ οι νύμφες που τράφηκαν μόνο με τροχόζωα εμφάνισαν χαμηλότερες τιμές (Mona et al., 2019). Τα κωπήποδα αποτελούν την κύρια τροφή των περισσότερων ιχθυονυμφών στο φυσικό τους περιβάλλον και είναι πλούσια σε πρωτεΐνες, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα και σε άλλα θρεπτικά συστατικά (Holt, 2003) με αποτέλεσμα να τα καθιστά ιδανική τροφή. Ωστόσο στα περισσότερα είδη ιχθύων κατά τη νυμφική εκτροφή χρησιμοποιούνται τροχόζωα και ναύπλιοι *Artemia*, τα οποία είναι επιλέξιμα διότι είναι εύκολο να εκτραφούν, εμφανίζοντας υψηλή παραγωγικότητα καθώς και οικονομική αποδοτικότητα (Van et al., 2014). Επίσης όσον αφορά τη διατροφική τους αξία, όπως περιεκτικότητα σε λιπαρά οξέα και ελεύθερα αμινοξέα, έχουν ανεπαρκείς ποσότητες και δεν μπορούν να καλύψουν τις διατροφικές ανάγκες των προνυμφών, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ανάπτυξη και η επιβίωση τους (Bell et al., 2003, Holt, 2003)

## **4.2 Μεταβλητότητα μήκους**

Η παραλλακτικότητα των μεγεθών αύξησης μήκους στις ομάδες (CV%) στο τέλος της νυμφικής εκτροφής ήταν 12% για την ομάδα που τράφηκε με τροχόζωα στους 24°C, 10,5% για την ομάδα που τράφηκε με τροχόζωα & κωπήποδα στους 24°C, 9,8% για την ομάδα που τράφηκε με τροχόζωα στους 20°C και τέλος η μικρότερη παραλλακτικότητα παρατηρήθηκε στην ομάδα που τράφηκε με τροχόζωα & κωπήποδα στους 20°C, η οποία ήταν 5%.

## **4.3 Γονιδιακή και ορμονική ρύθμιση**

Η ανάπτυξη των ψαριών είναι ένα πολυγονιδιακό και περιβαλλοντικά εξαρτώμενο χαρακτηριστικό με τα κύρια γονίδια που επηρεάζονται να είναι της αυξητικής ορμόνης (GH) και του ινσουλινομιμητικού αυξητικού παράγοντα 1 (IGF-1) καθώς βρίσκονται στην κορυφή του άξονα Υποθάλαμος - Υπόφυση - Σωματοτροπίνη (Hypothalamic - Pituitary - Somatotropic, HPS axis). Συνεπώς η θερμοκρασία, τα θρεπτικά συστατικά, η φωτοπερίοδος κλπ. μπορούν να επιφέρουν μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων (Triantaphyllopoulos et al., 2020). Σε αρκετές μελέτες έχει αναφερθεί ότι η αυξημένη θερμοκρασία κατά την εκκόλαψη έχει ως αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη (Nirkow et al., 2018)(Ahammad et al., 2021).

Στην παρούσα μελέτη, όσον αφορά την έκφραση των γονιδίων που εξετάστηκαν στις προνύμφες όταν έφτασαν στο στάδιο του πρώτου ταΐσματος (FF), βρέθηκε αυξημένη έκφραση των περισσότερων γονιδίων στους 20°C και συγκεκριμένα όλων των γονιδίων που εμπλέκονται στον άξονα Υποθάλαμος – Υπόφυση – Θυρεοειδής (TRH, THRA, THRB, DIO1, DIO2, DIO3), καθώς και των γονιδίων GHRH, IGF-2, LPX, NPY. Ωστόσο δεν βρέθηκαν διαφορές για τα γονίδια GH, IGF-1, IGF BP-1, IGF BP-2 στις δύο θερμοκρασίες, τα οποία είναι αυτά που συμμετέχουν στην αύξηση και στην ανάπτυξη. Αντιθέτως μόνο το γονίδιο της γκρελίνης (GHR) είχε υψηλότερη έκφραση στους 24°C σε σχέση με τους 20°C. Οι κύριες λειτουργίες της γκρελίνης στα ψάρια είναι η διέγερση της έκκρισης της αυξητικής ορμόνης καθώς και η ρύθμιση της όρεξης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις ορμονικές αναλύσεις για την συγκέντρωση της λεπτίνης, είχαν αυξημένη συγκέντρωση στους 20°C σε σχέση με τους 24°C. Η λεπτίνη είναι μια ορμόνη που καταστέλλει την όρεξη και έχει λειτουργία αντίθετη από αυτή της γκρελίνης, η οποία αυξάνει την όρεξη (Unniappan and Peter, 2005).

Συνεπώς σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η μειωμένη θερμοκρασία κατά το αυτότροφο στάδιο στους 20°C δεν είχε σημαντική επίδραση ως προς την έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη των προνυμφών στο συγκεκριμένο στάδιο, αλλά είχε μεγάλη επίδραση για τα γονίδια του θυρεοειδή τα οποία συμμετέχουν σε πολλές διεργασίες των ψαριών συμπεριλαμβανομένου της αύξησης και ανάπτυξης, του μεταβολισμού, της διαφοροποίησης κλπ. Στα σπονδυλωτά οι θυρεοειδικές ορμόνες είναι πολύ σημαντικές κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης

καθώς και για τον σχηματισμό των οργάνων και χωρίς αυτές δημιουργούνται προβλήματα στην ανάπτυξη και τελικώς στην επιβίωση τους (Liu et al., 2000, Power et al., 2001). Στους εξώθερμους οργανισμούς έχει αποδειχθεί ότι σε υψηλότερες θερμοκρασίες μέσα σε επιτρεπτά όρια αντοχής, αυξάνεται ο μεταβολικός ρυθμός, γεγονός που αυξάνει τις απαιτήσεις για ενέργεια και συνεπώς την ανάγκη για τροφή (Volkoff and Rønnestad, 2020). Η αυξημένη έκφραση της γκρελίνης που βρέθηκε, συγκριτικά με την μειωμένη συγκέντρωση της λεπτίνης στις νύμφες μαγιάτικου που βρίσκονταν στους 24°C, πιθανώς υποδηλώνει την ανεπάρκεια του λεκιθικού σάκου ως πηγή τροφής ή την γρηγορότερη κατανάλωση του.

Στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια έπειτα από τις αναλύσεις παρατηρήθηκε ένα πιο σταθερό πρότυπο ως προς την έκφραση των γονιδίων στις ομάδες που είχαν τραφεί με συνδυασμό τροχοζώων & κωπηπόδων και στις δύο θερμοκρασίες, ενώ δεν υπήρχε κάποιο σταθερό πρότυπο έκφρασης των γονιδίων, ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης. Συγκεκριμένα αυτό ελέγχθηκε συγκρίνοντας τις μέσες τιμές της έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των διατροφών μέσα σε κάθε θερμοκρασία, όπου ήταν υψηλότερες για τα γονίδια GH, GHRH, IGF-2, IGF BP-2, LPX, TRH, THRB, DIO2, DIO3 στις νύμφες που τράφηκαν με τροχόζωα & κωπήποδα και που προέρχονταν από τους 20°C. Τα γονίδια IGF-1, THRA εμφάνισαν υπερέκφραση (upregulation) των γονιδίων μέσα στην διατροφή των κωπηπόδων και στις δύο θερμοκρασίες. Στα γονίδια IGF BP-2, DIO1 και NPY οι διατροφές συνεισέφεραν το ίδιο ως προς την έκφραση και στις δύο θερμοκρασίες. Αυτή η εύρεση επιβεβαιώνει ότι τα κωπήποδα συνεισέφεραν σημαντικά στην έκφραση των γονιδίων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη, στον μεταβολισμό και στην όρεξη. Από την ανάλυση PCA βρέθηκε ότι κυριότερο ρόλο στην έκφραση των γονιδίων είχε η διατροφή, εκφράζοντας το 48,18% της συνολικής μεταβλητότητας και συγκεκριμένα αυτή που περιλάμβανε κωπήποδα. Η διατροφή που περιλάμβανε μόνο τροχόζωα είχε σχεδόν μηδενική επίδραση στην έκφραση των γονιδίων.

Στη Μεσόγειο η ωοτοκία του μαγιάτικου ξεκινάει το Μάιο όπου η θερμοκρασία στην επιφάνεια της θάλασσας κυμαίνεται από 18 – 20°C και φτάνει στην κορύφωση τον Ιούλιο όπου η θερμοκρασία φτάνει τους 23 – 24°C (Mandich et al., 2004, Zupa et al., 2017). Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο μαγιάτικο σε συνθήκες μεσοκόσμου η ωοτοκία και η εκκόλαψη των αυγών πραγματοποιήθηκε στους 23,5±1°C

(Papandroulakis et al., 2005). Στην παρούσα εργασία αποδείχθηκε για πρώτη φορά στο μαγιάτικο ότι η χαμηλότερη θερμοκρασία που εφαρμόστηκε ( 20°C ) κατά το αυτότροφο στάδιο απέδωσε καλύτερα ως προς την έκφραση των περισσότερων γονιδίων και συνεπώς ίσως να είναι καλύτερη για τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια.

Παρόλο που οι προνύμφες έφτασαν πιο γρήγορα στο στάδιο του πρώτου τείσματος στην υψηλότερη θερμοκρασία, δεν φαίνεται να επηρέασε σε τελικό βαθμό την ανάπτυξη τους και αντιθέτως καλύτερη εικόνα κατά τη διάρκεια της εκτροφής παρουσίασαν οι νύμφες που προέρχονταν από τους 20°C. Οι αλλαγές της διατροφής κατά το πρώτο τείσμα από τροχόζωα σε κωπήποδα έχουν επιφέρει θετικά αποτελέσματα σε αρκετά είδη ιχθύων (Conceição et al., 2010). Σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη που πραγματοποιήθηκε στο μαγιάτικο όπου η διατροφή αποτελούνταν από τροχόζωα και ναυπλίους *Artemia*, έδειξε ότι παρόλο που οι νύμφες κατανάλωσαν την τροφή, δεν αναπτύχθηκαν καλά (Papandroulakis et al., 2005). Η υψηλότερη διατροφική ποιότητα και το πιο περίπλοκο διατροφικό προφίλ των κωπηπόδων σε σύγκριση με τα τροχόζωα μπορεί να εξηγήσει τις παρατηρούμενες διαφορές στην γονιδιακή έκφραση και ανάπτυξη. Το επίπεδο της πρωτεΐνης που περιέχεται στα κωπήποδα είναι περίπου δύο φορές υψηλότερο συγκριτικά με τα τροχόζωα (Karlsen et al., 2015) και ίσως αυτός να είναι ένας λόγος που δημιουργήθηκαν διακυμάνσεις στην ανάπτυξη ανάμεσα στις ομάδες προνυμφών.

Το γενικό συμπέρασμα που προέκυψε από τα δεδομένα της αύξησης, της γονιδιακής έκφρασης και της συγκέντρωσης των ορμονών είναι, ότι κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του μαγιάτικου (έμβρυο – πρώτο τείσμα) ήταν ευνοϊκότερη η χαμηλότερη θερμοκρασία. Η αύξηση της θερμοκρασίας στους 24°C σε όλες τις ομάδες στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια επιτάχυνε τις οντογενετικές αλλαγές και την ανάπτυξη. Κυρίαρχο ρόλο στην αύξηση στα συγκεκριμένα στάδια φάνηκε να έχει ο παράγοντας της διατροφής. Ανακεφαλαιώνοντας η μειωμένη θερμοκρασία κατά το αυτότροφο στάδιο και η προσθήκη των κωπηπόδων στην διατροφή των ιχθυονυμφών βελτίωσε την αύξηση και την ανάπτυξη τους και ελαχιστοποίησε το φαινόμενο της παραλλακτικότητας.

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι απαιτούνται επιπλέον έρευνες για τις διατροφικές απαιτήσεις του μαγιάτικου κατά τη νυμφική εκτροφή, ώστε να είναι επιτυχής. Ενδιαφέρον θα ήταν ωστόσο σε επόμενες μελέτες να πραγματοποιηθεί ολική

αντικατάσταση των τροχοζώων με κωπήποδα κατά τη νυμφική εκτροφή μέσα στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών.



## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- AHAMMAD, A. S., ASADUZZAMAN, M., AHMED, M. B. U., AKTER, S., ISLAM, M. S., HAQUE, M. M., CEYLAN, H. & WONG, L. L. 2021. Muscle cellularity, growth performance and growth-related gene expression of juvenile climbing perch *Anabas testudineus* in response to different eggs incubation temperature. *Journal of thermal biology*, 96, 102830.
- ANDERSON, T., BENNETT, L., CONLON, M. & OWENS, P. 1993. Immunoreactive and receptor-active insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding protein in blood plasma from the freshwater fish *Macquaria ambigua* (golden perch). *Journal of endocrinology*, 136, 191-198.
- BELL, J., MCEVOY, L., ESTEVEZ, A., SHIELDS, R. & SARGENT, J. 2003. Optimising lipid nutrition in first-feeding flatfish larvae. *Aquaculture*, 227, 211-220.
- BERTUCCI, J. I., BLANCO, A. M., SUNDARRAJAN, L., RAJESWARI, J. J., VELASCO, C. & UNNIAPPAN, S. 2019. Nutrient regulation of endocrine factors influencing feeding and growth in fish. *Frontiers in endocrinology*, 10, 83.
- BIANCO, A. C. & CONCEIÇÃO, R. R. D. 2018. The deiodinase trio and thyroid hormone signaling. *Thyroid Hormone Nuclear Receptor*, 67-83.
- BIANCO, A. C., SALVATORE, D., GEREBEN, B., BERRY, M. J. & LARSEN, P. R. 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine reviews*, 23, 38-89.
- BIRSOY, K., FESTUCCIA, W. T. & LAPLANTE, M. 2013. A comparative perspective on lipid storage in animals. *Journal of cell science*, 126, 1541-1552.
- BLANTON, M. L. & SPECKER, J. L. 2007. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in fish and its role in fish development and reproduction. *Critical reviews in toxicology*, 37, 97-115.
- CASTANEDA, T., TONG, J., DATTA, R., CULLER, M. & TSCHÖP, M. 2010. Ghrelin in the regulation of body weight and metabolism. *Frontiers in neuroendocrinology*, 31, 44-60.
- CERDÁ-REVERTER, J. M., MARTINEZ-RODRIGUEZ, G., ZANUY, S., CARRILLO, M. & LARHAMMAR, D. 2000. Molecular evolution of the neuropeptide Y (NPY) family of peptides: cloning of three NPY-related peptides from the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Regulatory peptides*, 95, 25-34.
- CHIBA, A., OKA, S. & HONMA, Y. 1996. Ontogenetic changes in neuropeptide Y-like-immunoreactivity in the terminal nerve of the chum salmon and the cloudy dogfish, with special reference to colocalization with gonadotropin-releasing hormone-immunoreactivity. *Neuroscience letters*, 213, 49-52.
- CODINA, M., SÁNCHEZ-GURMACHES, J., MONTSERRAT, N., CHISTYAKOVA, O., NAVARRO, I. & GUTIÉRREZ, J. 2008. Metabolic and mitogenic effects of IGF-II in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) myocytes in culture and the role of IGF-II in the PI3K/Akt and MAPK signalling pathways. *General and comparative endocrinology*, 157, 116-124.
- CONCEIÇÃO, L. E., YÚFERA, M., MAKRIDIS, P., MORAIS, S. & DINIS, M. T. 2010. Live feeds for early stages of fish rearing. *Aquaculture research*, 41, 613-640.
- DUAN, C. 1998. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish. *The Journal of nutrition*, 128, 306S-314S.
- DUAN, C. 2002. Beyond carrier proteins: Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *J. Endocrinol*, 175, 41-54.
- EALLES, J. G. 2019. The relationship between ingested thyroid hormones, thyroid homeostasis and iodine metabolism in humans and teleost fish. *General and Comparative Endocrinology*, 280, 62-72.

- FAKRIADIS, I., SIGELAKI, I., PAPADAKI, M., PAPANDROULAKIS, N., RAFTOPOULOS, A., TSAKONITI, K. & MYLONAS, C. C. 2020. Control of reproduction of greater amberjack *Seriola dumerili* reared in aquaculture facilities. *Aquaculture*, 519, 734880.
- FANSA, H., SCHNEIDER, W., WOLF, G. & KEILHOFF, G. 2002. Influence of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on nerve autografts and tissue-engineered nerve grafts. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 26, 87-93.
- FISCHER, W. 1987. Fiches FAO d'identification des especes pour les besoins de la peche.(Rev 1). Mediterranee et mer Noire. Zone de Peche 37. *Vertebres*, 2.
- FLIER, J. S. & MARATOS-FLIER, E. 2010. Lasker lauds leptin. *Cell Metabolism*, 12, 317-320.
- GALAS, L., RAOULT, E., TONON, M.-C., OKADA, R., JENKS, B. G., CASTAÑO, J. P., KIKUYAMA, S., MALAGON, M., ROUBOS, E. W. & VAUDRY, H. 2009. TRH acts as a multifunctional hypophysiotropic factor in vertebrates. *General and comparative endocrinology*, 164, 40-50.
- GARCÍA, A. & DÍAZ, M. 1995. Culture of *Seriola dumerili*. *Cahiers Options Méditerranéene*, 16, 103-114.
- GONG, N., JÖNSSON, E. & BJÖRNSSON, B. T. 2016. Acute anorexigenic action of leptin in rainbow trout is mediated by the hypothalamic Pi3k pathway. *J. Mol. Endocrinol*, 56, 227-238.
- HOLT, G. J. 2003. Research on culturing the early life stages of marine ornamental fish. *Marine ornamental species—Collection, culture & conservation*, 251-254.
- HOLZER, P., REICHMANN, F. & FARZI, A. 2012. Neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide in the gut–brain axis. *Neuropeptides*, 46, 261-274.
- JEREZ, S., SAMPER, M., SANTAMARÍA, F., VILLAMANDOS, J., CEJAS, J. & FELIPE, B. 2006. Natural spawning of greater amberjack (*Seriola dumerili*) kept in captivity in the Canary Islands. *Aquaculture*, 252, 199-207.
- KAIYA, H., MIYAZATO, M., KANGAWA, K., PETER, R. E. & UNNIAPPAN, S. 2008. Ghrelin: a multifunctional hormone in non-mammalian vertebrates. *Comparative biochemistry and physiology part A: molecular & integrative physiology*, 149, 109-128.
- KARLSEN, Ø., VAN DER MEEREN, T., RØNNESTAD, I., MANGOR-JENSEN, A., GALLOWAY, T. F., KJØRSVIK, E. & HAMRE, K. 2015. Copepods enhance nutritional status, growth and development in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae—can we identify the underlying factors? *PeerJ*, 3, e902.
- KATZ, J., WEISS, H., GOLDMAN, B., KANETY, H., STANNARD, B., LEROITH, D. & SHEMER, J. 1995. Cytokines and growth factors modulate cell growth and insulin-like growth factor binding protein secretion by the human salivary cell line (HSG). *Journal of cellular physiology*, 165, 223-227.
- KENDALL JR, A. 1984. Early life history stage of fishes and their characters. *Ontogeny and systematics of fishes*, 11-22.
- KOZAKA, T., FUJII, Y. & ANDO, M. 2003. Central effects of various ligands on drinking behavior in eels acclimated to seawater. *Journal of Experimental Biology*, 206, 687-692.
- KUROKAWA, T., UJI, S. & SUZUKI, T. 2005. Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*, 26, 745-750.
- LIU, Y.-W., LO, L.-J. & CHAN, W.-K. 2000. Temporal expression and T3 induction of thyroid hormone receptors  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  during early embryonic and larval development in zebrafish, *Danio rerio*. *Molecular and cellular endocrinology*, 159, 187-195.
- LUONGO, C., DENTICE, M. & SALVATORE, D. 2019. Deiodinases and their intricate role in thyroid hormone homeostasis. *Nature Reviews Endocrinology*, 15, 479-488.

- MANDICH, A., MASSARI, A., BOTTERO, S., PIZZICORI, P., GOOS, H. & MARINO, G. 2004. Plasma sex steroid and vitellogenin profiles during gonad development in wild Mediterranean amberjack (*Seriola dumerilii*). *Marine biology*, 144, 127-138.
- MANOOCH III, C. S. & POTTS, J. C. 1997. Age, growth and mortality of greater amberjack from the southeastern United States. *Fisheries Research*, 30, 229-240.
- MARINO, G., MANDICH, A., MASSARI, A., ANDALORO, F., PORRELLO, S., FINOIA, M. & CEVASCO, F. 1995. Aspects of reproductive biology of the Mediterranean amberjack (*Seriola dumerilii* Risso) during the spawning period. *Journal of Applied Ichthyology*, 11, 9-24.
- MATHEWS, L. S., NORSTEDT, G. & PALMITER, R. D. 1986. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83, 9343-9347.
- MCANINCH, E. A. & BIANCO, A. C. 2014. Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1311, 77-87.
- MONA, M. H., RIZK, E.-S. T., EL-FEKY, M. M. & ELAWANY, M. E. 2019. Effect of nutritional quality of rotifers and copepods on sea bream (*Sparus aurata*) fry fish productivity. *Egypt. J. Exp. Biol*, 15, 135-142.
- MORIYAMA, S., AYSON, F. G. & KAWAUCHI, H. 2000. Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64, 1553-1562.
- MYLONAS, C. C., PAPANDROULAKIS, N., SMBOUKIS, A., PAPADAKI, M. & DIVANACH, P. 2004. Induction of spawning of cultured greater amberjack (*Seriola dumerilii*) using GnRH implants. *Aquaculture*, 237, 141-154.
- NAKADA, M. 1999. Yellowtail and related species culture. *Encyclopedia of aquaculture*.
- NIU, P.-D., PEREZ-SANCHEZ, J. & LE BAIL, P.-Y. 1993. Development of a protein binding assay for teleost insulin-like growth factor (IGF)-like: relationships between growth hormone (GH) and IGF-like in the blood of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 11, 381-391.
- OH, Y., NAGALLA, S. R., YAMANAKA, Y., KIM, H.-S., WILSON, E. & ROSENFELD, R. G. 1996. Synthesis and characterization of insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP)-7: recombinant human mac25 protein specifically binds IGF-I and-II. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 30322-30325.
- OROZCO, A. & VALVERDE-R, C. 2005. Thyroid hormone deiodination in fish. *Thyroid*, 15, 799-813.
- PAPANDROULAKIS, N., MYLONAS, C., MAINGOT, E. & DIVANACH, P. 2005. First results of greater amberjack (*Seriola dumerilii*) larval rearing in mesocosm. *Aquaculture*, 250, 155-161.
- PÁRRIZAS, M., PLISETSKAYA, E. M., PLANAS, J. & GUTIÉRREZ, J. 1995. Abundant insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor binding in fish skeletal muscle. *General and comparative endocrinology*, 98, 16-25.
- PETERSON, B. & WALDBIESER, G. 2009. Effects of fasting on IGF-I, IGF-II, and IGF-binding protein mRNA concentrations in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology*, 37, 74-83.
- POLITIS, S. N., DAHLKE, F. T., BUTTS, I. A., PECK, M. A. & TRIPPEL, E. A. 2014. Temperature, paternity and asynchronous hatching influence early developmental characteristics of larval Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 459, 70-79.
- POLITIS, S. N., MAZURAS, D., SERVILI, A., ZAMBONINO-INFANTE, J.-L., MIEST, J. J., SØRENSEN, S. R., TOMKIEWICZ, J. & BUTTS, I. A. 2017. Temperature effects on gene expression and morphological development of European eel, *Anguilla anguilla* larvae. *PLoS One*, 12, e0182726.

- POWER, D. M., LLEWELLYN, L., FAUSTINO, M., NOWELL, M. A., BJÖRNSSON, B. T., EINARSDÓTTIR, I. E., CANARIO, A. V. & SWEENEY, G. E. 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130, 447-459.
- REINECKE, M. 2010. Insulin-like growth factors and fish reproduction. *Biology of reproduction*, 82, 656-661.
- ROMBOUGH, P. J. The effects of temperature on embryonic and larval development. Seminar series-society for experimental biology, 1997. Cambridge University Press, 177-224.
- SICURO, B. & LUZZANA, U. 2016. The state of *Seriola* spp. other than yellowtail (*S. quinqueradiata*) farming in the world. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 24, 314-325.
- SRUTHI, M., NAIR, A. B., ARUN, D., THUSHARA, V., SHEEJA, C., VIJAYASREE, A. S., OOMMEN, O. V. & DIVYA, L. 2018. Dietary curcumin influences leptin, growth hormone and hepatic growth factors in *Tilapia* (*Oreochromis mossambicus*). *Aquaculture*, 496, 105-111.
- ST. GERMAIN, D. L., GALTON, V. A. & HERNANDEZ, A. 2009. Defining the roles of the iodothyronine deiodinases: current concepts and challenges. *Endocrinology*, 150, 1097-1107.
- THOMPSON, B., BEASLEY, M. & WILSON, C. 1999. Age distribution and growth of greater amberjack, *Seriola dumerili*, from the north-central Gulf of Mexico. *Fishery Bulletin*, 97, 362-371.
- TRIANANTAPHYLLOPOULOS, K. A., CARTAS, D. & MILIOU, H. 2020. Factors influencing GH and IGF-I gene expression on growth in teleost fish: how can aquaculture industry benefit? *Reviews in Aquaculture*, 12, 1637-1662.
- TSALAFOUTA, A., PAVLIDIS, M. & PAPANDROULAKIS, N. 2017. EFFECT OF BACKGROUND COLOR AND EXPRESSION OF GENES RELATED TO THE GH/IGF GROWTH AXIS AT EARLY DEVELOPMENT OF GREATER AMBERJACK (*Seriola dumerili*). October.
- UNNIAPPAN, S., LIN, X., CERVINI, L., RIVIER, J., KAIYA, H., KANGAWA, K. & PETER, R. E. 2002. Goldfish ghrelin: molecular characterization of the complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinology*, 143, 4143-4146.
- UNNIAPPAN, S. & PETER, R. E. 2005. Structure, distribution and physiological functions of ghrelin in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140, 396-408.
- VILLAMIZAR, N., RIBAS, L., PIFERRER, F., VERA, L. M. & JAVIER, F. EFFECT OF DAILY THERMOCYCLES ON EMBRYONIC AND LARVAL DEVELOPMENT, SURVIVAL, BEHAVIOUR AND SEX DIFFERENTIATION OF ZEBRAFISH (*Danio rerio*). *Dña. Natalia Villamizar Villamizar*, 127.
- VOLKOFF, H. 2016. The neuroendocrine regulation of food intake in fish: a review of current knowledge. *Frontiers in neuroscience*, 10, 540.
- VOLKOFF, H. & RØNNESTAD, I. 2020. Effects of temperature on feeding and digestive processes in fish. *Temperature*, 7, 307-320.
- WOOD, A. W., DUAN, G. & BERN, H. A. 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish. *International review of cytology*, 243, 215-285.
- YUAN, D., WANG, T., ZHOU, C., LIN, F., CHEN, H., WU, H., WEI, R., XIN, Z. & LI, Z. 2014. Leptin and cholecystokinin in *Schizothorax prenanti*: molecular cloning, tissue expression, and mRNA expression responses to periprandial changes and fasting. *General and comparative endocrinology*, 204, 13-24.

- ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L. & FRIEDMAN, J. M. 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372, 425-432.
- ZUPA, R., RODRÍGUEZ, C., MYLONAS, C. C., ROSENFELD, H., FAKRIADIS, I., PAPADAKI, M., PÉREZ, J. A., POUSIS, C., BASILONE, G. & CORRIERO, A. 2017. Comparative study of reproductive development in wild and captive-reared greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *PLoS One*, 12, e0169645.