



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

Τμήμα Βιολογίας

**Πρότυπα αλλομετρικής αύξησης του σχήματος του σώματος
στην τσιπούρα (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758)**

Φυσιολογικός φαινότυπος και σκελετικές παραμορφώσεις

Διδακτορική Διατριβή

Φραγκούλης Στέφανος

Ηράκλειο 2020

Η παρούσα διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος Horizon2020 (No. 727610, PerformFISH)



Επιβλέπων Καθηγητής

Κουμουνδούρος Γεώργιος (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Συμβουλευτική Επιτροπή

Κουμουνδούρος Γεώργιος (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Κεντούρη Μαρουδιώ (Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης)

Σωμαράκης Στυλιανός (Ερευνητής Α΄, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.)

Εξεταστική Επιτροπή

Κουμουνδούρος Γεώργιος (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Κεντούρη Μαρουδιώ (Καθηγήτρια Πανεπιστημίου Κρήτης)

Σωμαράκης Στυλιανός (Ερευνητής Α΄, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.)

Γρηγοράκης Κρίτων (Ερευνητής Α΄, ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.)

Καρακάσης Ιωάννης (Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης)

Λεονάρδος Ιωάννης (Καθηγητής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων)

Μπαταργιάς Κωνσταντίνος (Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Πατρών)

στο Νίκο και τη Δώρα...

*“Γηράσκω αεί διδασκόμενος”
Σόλων (640 - 560 π.Χ.)*

Πρόλογος

Η διεκπεραίωση διδακτορικής διατριβής είναι μια επίπονη και δύσκολη διαδικασία για οποιονδήποτε έχει (ή θέλει να) πραγματοποιήσει. Αποτελεί ένα ορόσημο για όλους εμάς που προσπαθούμε να ασχοληθούμε επαγγελματικά με την έρευνα. Μέσα από αυτήν την διαδικασία μαθαίνουμε αρκετά πράγματα για τον εαυτό μας, για τις δυνατότητες που "κρύβουμε" μέσα μας, ενώ προσπαθούμε να γίνουμε καλύτεροι και πιο δυνατοί, και να αποκτήσουμε γνώσεις και εμπειρίες που θα επιτρέψουν στο μέλλον να γίνουν απαραίτητα εργαλεία για την εξέλιξη μας.

Κατ' αρχήν θα ήθελα να ευχαριστήσω (για ακόμη μια φορά) τον επιβλέποντα καθηγητή μου Γεώργιο Κουμουνδούρο. Όντας φοιτητής του από το προπτυχιακό επίπεδο, μπορώ να πω αρκετά πράγματα για αυτήν την συνεργασία που έχει διαρκέσει (τουλάχιστον) μια δεκαετία. Θεωρώ ότι είμαι τυχερός που είχα για μέντορα έναν άνθρωπο που έχει τόση αγάπη για το αντικείμενο του. Παρόλες τις διαφορές, ασυμφωνίες και διαμάχες που είχαμε αυτά τα χρόνια, το τελικό αποτέλεσμα ήταν πάντα θετικό και για τους δύο.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της συμβουλευτικής μου επιτροπής. Την καθηγήτρια Κεντούρη Μαρουδιώ και τον ερευνητή Σωμαράκη Στυλιανό για τις διορθώσεις του τελικού κειμένου, αλλά και τις συμβουλές τους όσον αφορά την επίλυση ορισμένων προβλημάτων που προέκυψαν στην πορεία του διδακτορικού.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ για τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς επιτροπής μου, Γρηγοράκη Κρίτων, Καρακάση Ιωάννη, Λεονάρδο Ιωάννη και Μπαταργιά Κωνσταντίνο για τις παρατηρήσεις τους επί του τελικού κειμένου.

Μετά από τόσα χρόνια στον ίδιο εργαστηριακό και επαγγελματικό χώρο, δεν θα μπορούσα να παραλείψω τους πολύτιμους συνεργάτες μου από το εργαστήριο Θαλάσσιας Βιολογίας – Βιολογίας Ιχθύων. Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω να δώσω στο Γιώργο Γελαδάκη. Μαζί ξεκινήσαμε τα διδακτορικά μας, μαζί τα τελειώσαμε. Χωρίς τη βοήθειά σου GELAX, αυτή η δουλειά δεν θα γινόταν. Ερχόσουν στις δειγματοληψίες και φωτογραφίζαμε τα «μοντέλα». Και τα βράδια...στην «Τρελή Γαρίδα»! Η ευχάριστη και (σχεδόν) ξέγνοιαστη πλευρά της έρευνας. Επιπλέον ένα μεγάλο ευχαριστώ και στην Αλίκη Πρίντζη, που είχε μεγάλη συμμετοχή στις αρχικές δειγματοληψίες του διδακτορικού. Καλή δύναμη στο δικό σου διδακτορικό (θα την χρειαστείς). Τέλος ένα τεράστιο ευχαριστώ στη Χαρά Κουρκούτα και στη Νατάσσα Δημητριάδη. Αυτές οι χαλαρές κουβέντες «περί ανέμων και υδάτων» που πλανιόντουσαν σχεδόν καθημερινά στο εργαστήριο θα τις θυμάμαι και θα γελάω!

Δεν θα μπορούσα να ξεχάσω ωστόσο τα στελέχη και το προσωπικό της ΑΝΔΡΟΜΕΔΑΣ Α.Ε., Κώστα Τζόκα και Αλέξη Γλαρόπουλε. Κώστα έμαθα αρκετά πράγματα για τη φιλοσοφία και τη λογική της ιχθυοκαλλιέργειας στις κουβέντες που

κάναμε κατά την επιστροφή από τις δειγματοληψίες. Μακάρι να συνεργαστούμε ξανά στο μέλλον (εγγύς ή απώτερο). Αλέξη μπορεί η συνεργασία μας στο project του διδακτορικού μου να ήταν κατά τις τελευταίες δειγματοληψίες, ωστόσο πάντα ήσουν πρόθυμος να βρίσκεις λύση στα προβλήματα που προκύπταν στην πορεία, ενώ η βοήθεια σου σε διάφορα ζητήματα ήταν ανεκτίμητης αξίας. Σε ευχαριστώ και σου στέλνω τις ευχές μου, τώρα που έγινες πατέρας.

Μαρία...μου τα έλεγες να μην κάνω διδακτορικό, αλλά εγώ ήμουν αποφασισμένος να το τολμήσω. Ευτυχώς ήσουν πάντα εκεί (ως πιο έμπειρη) για να με βοηθάς και να με εκλογικεύεις. Χαίρομαι που είχα κάποιον στον πλευρό μου ανά πάσα ώρα και στιγμή, που με καταλάβαινε και ήξερε τι περνούσα. Χωρίς εσένα θα τα είχα «παίξει».

Σάρα...κορίτσι μου...μπορεί στην αρχή να ήμουν αρνητικός όταν σε γνώρισα, ωστόσο στην πορεία κατάλαβα πόσο πολύ σε αγαπάω. Μπορεί να γκρινιάζεις όταν σε φιλάω ενώ κοιμάσαι, μπορεί να φοβάσαι και να γαβγίζεις όταν πέφτουν οι κερανοί, αλλά πάντα θα είσαι εκεί όταν θα έχω τις μαύρες μου για να μου φτιάχνεις το κέφι. Πιστεύω πως όσα χρόνια και να περάσουν, εσύ θα παραμείνεις κουτάβι στην καρδιά, γεμάτη όρεξη και ενέργεια για παιχνίδι. Καμία δεν συγκρίνεται μαζί σου.

Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην αδερφή μου Στέλλα (ή αλλιώς Στυλιανή-Χριστίνα Φραγκούλη). Ξέρω πως τα τελευταία χρόνια ήταν αρκετά δύσκολα για τους δύο μας. Μέσα σε όλο αυτό που ζει ο καθένας μας ξεχωριστά, προσπαθούμε να γίνουμε πιο δυνατοί και να σταθούμε στα πόδια μας. Αλλά πάντα ήσουν εκεί για εμένα, όποτε χρειάστηκα βοήθεια. Θέλω να ξέρεις ένα πράγμα...ό,τι και να γίνει, όση απόσταση και αν μας χωρίζει, ο *Oniiiiiiiiiiii-CHAN* θα είναι πάντα δίπλα σου με οποιοδήποτε μέσο και τρόπο. Γιατί μπορεί πλέον να είμαστε μόνο δύο, αλλά εσύ αξίζεις όσο τίποτα άλλο στον κόσμο και μακάρι όλοι να είχαν μια αδερφή σαν εσένα.

Λίστα συντομογραφιών

BD	Body Depth	Ύψος σώματος
CS	Centroid Size	Κεντροειδές μέγεθος
CVA	Canonical Variate Analysis	Ανάλυση κανονικών συνιστωσών
DPH	Days Post Hatching	Μέρες μετά την εκκόλαψη
DPT	Days Post Tagging	Μέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση
HL	Head Length	Μήκος κεφαλής
PD	Procrustes Distances	Προκρούστειες αποστάσεις
RWA	Relative warp analysis	Ανάλυση κύριων συνιστωσών
SL	Standard Length	Τυπικό μήκος
TL	Total Length	Ολικό μήκος

Περιεχόμενα

Κεφάλαιο 1^ο. Γενική Εισαγωγή.	1
1.1. Η ιχθυοκαλλιέργεια.	2
1.2. Φαινότυπος του σχήματος του σώματος.	6
1.2.1. Οντογένεση και οντογενετικό τροχιακό.	6
1.2.2. Πρότυπα οντογένεσης των ακτινοπτερύγιων ιχθύων.	6
1.2.3. Διακύμανση φυσιολογικού φαινοτύπου.	7
1.2.4. Αλλομετρικά τροχιακά.	9
1.2.5. Οι σκελετικές παραμορφώσεις ως παράγοντας διακύμανσης της εξωτερικής μορφολογίας.	10
1.3. Στόχοι διδακτορικής διατριβής.	16
Κεφάλαιο 2^ο. Αλλομετρικά τροχιακά του σχήματος του σώματος.	18
2.1. Εισαγωγή.	19
2.2. Υλικά και μέθοδοι.	22
2.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός και προέλευση πληθυσμού ιχθύων.	22
2.2.2. Μορφομετρική ανάλυση.	23
2.3. Αποτελέσματα.	26
2.3.1. Συσχέτιση του σχήματος του σώματος μεταξύ διαφορετικών σταδίων.	26
2.3.2. Οντογένεση του σχήματος του σώματος κατά την περίοδο της πάχυνσης.	28
2.3.3. Αλλομετρικά τροχιακά του σχήματος του σώματος.	33
2.4. Συζήτηση.	37
Κεφάλαιο 3^ο. Εξέλιξη της αιματικής λόρδωσης.	42
3.1. Εισαγωγή.	43
3.2. Υλικά και μέθοδοι.	45
3.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.	45
3.2.2. Μορφομετρική ανάλυση.	46
3.2.3. Σχέση της εσωτερικής γωνίας της αιματικής λόρδωσης με την γωνία που σχηματίζεται στην εξωτερική μορφολογία των ψαριών.	48
3.2.4. Σχέση της αιματικής λόρδωσης με το ρυθμό σωματικής αύξησης.	50
3.3. Αποτελέσματα.	52
3.3.1. Φαινοτυπική κατηγοριοποίηση της εξωτερικής μορφολογίας.	52
3.3.2. Εξέλιξη της αιματικής λόρδωσης κατά την περίοδο της πάχυνσης.	53
3.3.3. Επιδιόρθωση της αιματικής λόρδωσης κατά την περίοδο της πάχυνσης (1 - 434 dpt, days post-tagging).	54
3.3.4. Επίδραση της αιματικής λόρδωσης στο σχήμα του σώματος στην αρχή και στο τέλος της περιόδου πάχυνσης.	56
3.3.5. Μορφομετρική ανάλυση των ατόμων με επιδιόρθωση της λόρδωσης.	57
3.3.6. Σχέση της εσωτερικής γωνίας της αιματικής λόρδωσης με την γωνία που σχηματίζεται στην εξωτερική μορφολογία των ψαριών.	60
3.3.7. Σχέση της αιματικής λόρδωσης με το ρυθμό σωματικής αύξησης.	63
3.4. Συζήτηση.	68
Κεφάλαιο 4^ο. Εξέλιξη της κρανιακής μορφολογίας.	75
4.1. Εισαγωγή.	76
4.2. Υλικά και μέθοδοι.	79
4.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός.	79

4.2.2. Κατηγοριοποίηση της εξωτερικής μορφολογίας.	79
4.2.3. Μορφομετρική ανάλυση.	80
4.2.3.1. Σκελετικές παραμορφώσεις κεφαλής.	80
4.2.3.2. Οντογένεση της κεφαλής των φυσιολογικών ατόμων.	81
4.3. Αποτελέσματα.	84
4.3.1. Κρανιακές παραμορφώσεις.	84
• Εξέλιξη των κρανιακών παραμορφώσεων κατά την περίοδο της πάχυνσης	
• Επίδραση των σκελετικών παραμορφώσεων στο σχήμα της κεφαλής	
4.3.2. Φυσιολογική μορφολογία της κεφαλής.	89
• Συσχέτιση του σχήματος της κεφαλής μεταξύ των ιχθυδίων και των ενηλίκων	
• Οντογένεση της κεφαλής των φυσιολογικών ατόμων	
4.4. Συζήτηση.	92
Κεφάλαιο 5°. Γενική συζήτηση.	96
Κεφάλαιο 6°. Συμπεράσματα.	104
Περίληψη.	108
Abstract.	111
Βιβλιογραφία.	114
Παράρτημα.	125

Κεφάλαιο 1^ο

Γενική εισαγωγή

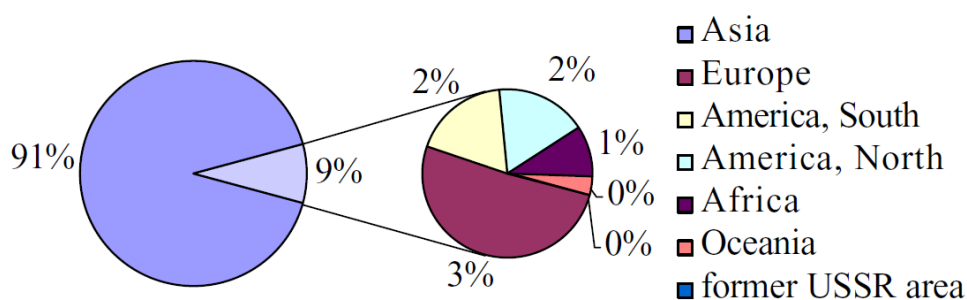
1.1. Η ιχθυοκαλλιέργεια

Η βιομηχανία της υδατοκαλλιέργειας ασχολείται με την εκτροφή οργανισμών των υδρόβιων οικοσυστημάτων (ιχθύες, μαλάκια, οστρακόδερμα, φύκη κ.α.). Τα τελευταία τριάντα χρόνια η παγκόσμια παραγωγή σε εκτρεφόμενα είδη σημείωσε ραγδαία ανάπτυξη, γεγονός που ενέταξε την υδατοκαλλιέργεια στον κατάλογο των πιο αναπτυσσόμενων βιομηχανιών τροφίμων, με ετήσιο ρυθμό ανάπτυξης 5,8% την περίοδο 2000-2016 (FAO 2018). Μάλιστα η ανάπτυξη ήταν πολύ μεγαλύτερη ακόμα και από την κτηνοτροφική παραγωγή, που παρουσίασε δείκτες ανάπτυξης 4,6% για τα πουλικά, 2,2% για τα χοιροειδή και 1% για τα βοοειδή (Troell *et al.* 2014). Σήμερα, περισσότερα από 600 είδη υδρόβιων οργανισμών εκτρέφονται σε συστήματα υδατοκαλλιέργειας (Troell *et al.* 2014). Αυτή η μεγάλη αύξηση έχει θετικές κοινωνικές και οικονομικές επιπτώσεις (Quansah *et al.* 2007, Paul and Vogl 2011, Chen and Qiu 2014), καθώς έχει δημιουργηθεί μια τεράστια αγορά εργασίας με περισσότερα από 23 εκατομμύρια ανθρώπους να εργάζονται με πλήρη απασχόληση (Whitmarsh and Palmieri 2008, Valderrama *et al.* 2010).

Μεταξύ άλλων οργανισμών η υδατοκαλλιέργεια εξασφαλίζει μια σημαντική ποσότητα βρώσιμων ιχθύων προσβάσιμων σε όλες τις κοινωνικο-οικονομικές τάξεις. Σε μια εποχή όπου ο πληθυσμός της γης ολοένα και αυξάνεται, η ανάγκη για διαθέσιμη τροφή γίνεται όλο και πιο επιτακτική. Επειδή η παραγωγή της αλιείας σε παγκόσμιο επίπεδο έχει μείνει στάσιμη από τις αρχές του 1980 (90,9 εκατομμύρια τόνους το 2016), οι ελπίδες για την κάλυψη των ανθρώπινων αναγκών εναποτίθεται στις υδατοκαλλιέργειες (FAO 2018). Μάλιστα, τα Ηνωμένα Έθνη (United Nations 2014) αναμένουν η αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού να φτάσει τα 8,6 δισεκατομμύρια άτομα μέχρι το 2030. Εξαιτίας αυτής της εκτιμώμενης πληθυσμιακής αύξησης, αναμένεται η παγκόσμια παραγωγή της υδατοκαλλιέργειας να φτάσει τους 109 εκατομμύρια τόνους μέχρι το 2030 (FAO 2018) με την ιχθυοκαλλιέργεια να συνεισφέρει τα μέγιστα στη διατροφή του ανθρώπου και στη διαθεσιμότητα τροφής (Bene *et al.* 2016). Μέχρι σήμερα, η παραγωγή ιχθύων παρέχει σε 3,2 δισεκατομμύρια ανθρώπους το 20% της πρόσληψης σε ζωική πρωτεΐνη, ενώ η κατά κεφαλή κατανάλωση σε ψάρι έχει αυξηθεί από 9 kg το 1961 σε 20,3 kg το 2016 (1,5% μέση αύξηση ανά έτος, FAO 2018).

Σε παγκόσμιο επίπεδο η Ασία είναι πρώτη (91%), όσον αφορά την παραγωγή εκτρεφόμενων ειδών όλων των ταξινομικών ομάδων εκτός των μακροφυκών (Εικόνα

1.1). Το 2013 η Κίνα ήταν η κύρια παραγωγός χώρα σε όλες τις τρεις κατηγορίες εκτρεφόμενων υδρόβιων οργανισμών (ιχθύες, μαλάκια, οστρακόδερμα). Το 2015 κατείχε σχεδόν το 90% της παραγωγής κυπρίνου, το 40% της παραγωγής τιλάπια και το 50% της παραγωγής γαρίδας, σε παγκόσμιο επίπεδο (Cao *et al.* 2015). Όσον αφορά την Ευρώπη (3% της παγκόσμιας παραγωγής, Εικόνα 1.1), η Νορβηγία έχει την μεγαλύτερη παραγωγή σε εκτρεφόμενο σολομό, ένα είδος με τεράστια εμπορική και διατροφική αξία (FAO, 2014). Το 2016 η ετήσια παραγωγή σε σολομό ήταν μεγαλύτερη από 1,2 εκατομμύρια τόνους, αριθμός που αντιστοιχεί στο 80% της συνολικής ευρωπαϊκής ιχθυοκαλλιέργειας (FEAP 2017).

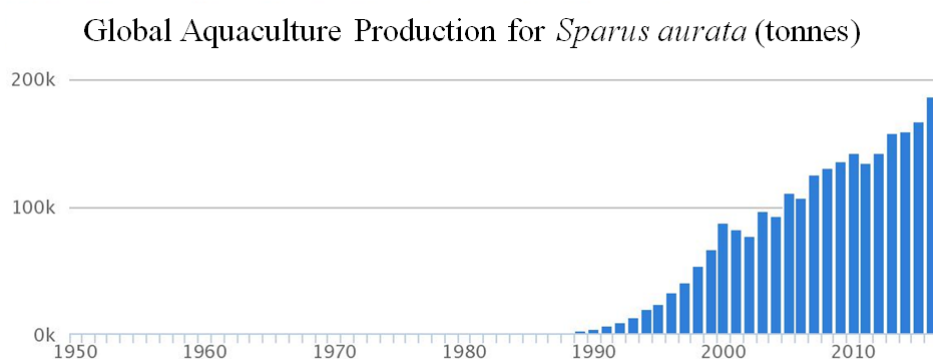


Εικόνα 1.1. Παραγωγή της υδατοκαλλιέργειας ανά ήπειρο (από Muir 2005).

Άλλα είδη της ευρωπαϊκής ιχθυοκαλλιέργειας με μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον διεθνώς είναι η ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), η γλώσσα του Ατλαντικού (*Halibut hippoglossus*), ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*), το ευρωπαϊκό χέλι (*Anguilla anguilla*), το ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) και η τσιπούρα (*Sparus aurata*). Από αυτά τόσο το λαβράκι όσο και η τσιπούρα είναι είδη που σχεδόν μονοπωλούν τη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια (FEAP 2017), καθώς το 2016 η παραγωγή σε ευρωπαϊκό λαβράκι ήταν περίπου 158 χιλιάδες τόνοι, ενώ για την τσιπούρα ήταν 160 χιλιάδες τόνοι (Εικόνα 1.2).

Η Ελλάδα είναι από τις σημαντικότερες παραγωγικές χώρες της Μεσογείου, αφού η παραγωγή του λαβρακιού και της τσιπούρας για το 2016 είχε συνολική οικονομική αξία 553 εκατομμυρίων ευρώ (FGM 2017). Οικονομικά στοιχεία της ίδιας χρονιάς έδειξαν ότι η Ελλάδα κάλυψε το 59% της συνολικής ζήτησης σε λαβράκι και τσιπούρα μέσα στην Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ παρείχε το 31% της παγκόσμιας ζήτησης για αυτά τα δύο είδη. Εξάγει σε περισσότερες από τριάντα δύο χώρες παγκοσμίως, με τις κύριες χώρες εξαγωγής να είναι η Γαλλία, η Ιταλία και η Ισπανία (το 57% της συνολικής παραγωγής διανέμεται σε αυτές τις χώρες). Όσον αφορά το εργατικό δυναμικό, η

Ελλάδα έχει το μεγαλύτερο ποσοστό εργαζομένων στην ιχθυοκαλλιέργεια στην Ευρωπαϊκή Ένωση αφού απασχολεί, άμεσα και έμμεσα, σχεδόν δώδεκα χιλιάδες ανθρώπους σε επιστημονικό, τεχνικό και διοικητικό επίπεδο (FGM 2017). Οι θέσεις εργασίας βρίσκονται ως επί το πλείστον σε παράκτιες περιοχές, συνεισφέροντας σημαντικά στην οικονομική και κοινωνική ανάπτυξη των τοπικών κοινωνιών (FGM 2017). Μάλιστα υπολογίζεται ότι μέχρι το 2030 η Ελλάδα θα διπλασιάσει την παραγωγή της φτάνοντας τους 230 χιλιάδες τόνους, αξίας 1,2 δισεκατομμυρίων ευρώ, γεγονός που θα επιτρέψει τη δημιουργία τριών χιλιάδων νέων θέσεων εργασίας.



Εικόνα 1.2. Παγκόσμια παραγωγή τσιπούρας ανά έτος (Πηγή: FAO FishStat).

Λόγω της συνεχώς αυξανόμενης ζήτησης, σημαντική προτεραιότητα της βιομηχανίας της ιχθυοκαλλιέργειας είναι η παραγωγή αξιόπιστου και ποιοτικού τελικού προϊόντος. Χαρακτήρες, όπως η ποιότητα της σάρκας, η φρεσκάδα, η γεύση, αλλά και δείκτες όπως η ποσόστωση του λίπους και των μυών πάντα απασχολούσαν τον κλάδο της ιχθυοκαλλιέργειας (Grigorakis *et al.* 2002). Μάλιστα σε βιβλιογραφική ανασκόπηση του 2007 (Grigorakis), παρουσιάστηκαν οι διαφορές μεταξύ εκτρεφόμενων ατόμων τσιπούρας και ατόμων που προέρχονται από φυσικούς πληθυσμούς. Σε αντίθεση με τα άγρια άτομα, οι εκτρεφόμενες τσιπούρες έχουν χειρότερη γεύση και άρωμα, ενώ ο λόγος των λιπαρών οξέων $\omega 3$ και $\omega 6$ ($\omega 3/\omega 6$) είναι χειρότερος, λόγω της σύστασης της τροφής (παρόλο που τα εκτρεφόμενα άτομα έχουν υψηλότερα επίπεδα των $\omega 3$ λιπαρών οξέων). Για το λόγο αυτό, κρίνεται αναγκαία η μελέτη της βιολογίας των εκτρεφόμενων ειδών κατά τη διάρκεια της εκτροφής τους. Παράγοντες όπως η διατροφή των ιχθύων ανάλογα με το στάδιο του κύκλου ζωής, η ανάπτυξη μορφο-ανατομικών ανωμαλιών αλλά και η εξωτερική μορφολογία, θεωρούνται κρίσιμοι για τη βελτίωση του τελικού προϊόντος (ανασκόπηση από Boglione *et al.* 2013). Δημιουργείται έτσι η ανάγκη για τη συνεχή διερεύνηση των

συνθηκών που συμβάλλουν στη βελτίωση των επιθυμητών χαρακτηριστικών, μεγιστοποιώντας τοιούτοτρόπως την παραγωγή και βελτιώνοντας τη σχέση κόστους-κέρδους, με απώτερο σκοπό την ακεραιότητα της ιχθυοκαλλιέργειας απέναντι στον καταναλωτή.

1.2. Φαινότυπος του σχήματος του σώματος

1.2.1. Οντογένεση και οντογενετικό τροχιακό

Ο φαινότυπος των οργανισμών αλλάζει κατά τη διάρκεια της οντογένεσης, υποκείμενος στον έλεγχο του περιβάλλοντος και του γονοτύπου. Οι Pigliucci *et al.* (2006) είχαν ορίσει αυτή τη δυνατότητα προσαρμογής ως "φαινοτυπική πλαστικότητα" (phenotypic plasticity), δηλαδή, την ικανότητα ενός γονοτύπου να διαμορφώσει διαφορετικούς φαινοτύπους, υπό την επίδραση του περιβάλλοντος. Περιπτώσεις όπως ο καθορισμός του φύλου στο *Leuresthes tenuis* (Brown *et al.* 2014), η σχέση της υποξίας κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια με την ανάπτυξη οντογενετικών ανωμαλιών στο βάτραχο (Stockard, 1921), αλλά και η ανατομική και ενβιομηχανική προσαρμογή του *Polypterus* στη χερσαία διαβίωση (Standen *et al.* 2014) χαρακτηρίζονται ως φαινοτυπική/αναπτυξιακή πλαστικότητα.

Η πορεία που ακολουθεί ένας οργανισμός κατά τη διάρκεια της οντογένεσής του, ορίζεται ως "οντογενετικό τροχιακό". Αυτός ο ορισμός αποτελεί παράφραση του ορισμού περί οντογενετικών τροχιακών που είχαν θέσει οι Alberch *et al.* (1979) και ο Atchley (1987), όπου "το μονοπάτι που ακολουθεί ένας οργανισμός, μέσω του πολυπαραγοντικού χώρου ("οντογενετικός χώρος") που περιγράφει τις αλλαγές στο σχήμα, ονομάζεται οντογενετικό τροχιακό"¹. Ωστόσο, μέχρι σήμερα, η μόνη γνώση σχετικά με τη φαινοτυπική πλαστικότητα, έγκειται στην επίδραση που έχει το περιβάλλον στον φαινότυπο και όχι στην πορεία που ακολουθεί μέχρι να φτάσει σε αυτόν.

1.2.2. Πρότυπα οντογένεσης των ακτινοπτερύγιων ιχθύων

Η οντογενετική διαδικασία είναι καθοριστική για την επιβίωση και ανάπτυξη των ιχθύων. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί δύο διαφορετικά πρότυπα οντογένεσης για τους ακτινοπτερύγιους ιχθύες ανάλογα με τον τρόπο μετάβασης από το αυγό στο ενήλικο στάδιο (Kendall *et al.* 1984). Στην πρώτη περίπτωση προτύπου οντογένεσης, οι ενήλικοι ιχθύες αποθέτουν βενθικά αυγά. Σε αυτό το πρότυπο οντογένεσης,

¹[...] The path taken by a particular organism, or the mean path of a population of organisms, through some multivariate space ("ontogenetic space") that describes changes in form is called an ontogenetic trajectory. [...] (από Magwene 2001).

παρατηρείται υψηλός βαθμός διαφοροποίησης κατά την εκκόλαψη των αυγών, ενώ ο ρυθμός επιβίωσης είναι υψηλός. Τέτοιες περιπτώσεις είναι ο σολομός του Ατλαντικού (*Salmo salar*) και η ιριδίζουσα πέστροφα όπου η κάθε γέννα περιλαμβάνει μερικές χιλιάδες αυγά (μέχρι 2000 αυγά/Kg σωματικού βάρους). Το άλλο πρότυπο οντογένεσης περιλαμβάνει τα ψάρια των οποίων τα αυγά είναι πελαγικά, παρατηρείται υψηλή γονιμότητα, δεν υπάρχει γονική προστασία ενώ ο ρυθμός επιβίωσης είναι χαμηλός. Σημαντική διαφορά είναι ότι κατά την εκκόλαψη τα νεαρά άτομα των ειδών με πελαγικά αυγά έχουν μικρό βαθμό οντογενετικής διαφοροποίησης, ενώ είναι προσαρμοσμένα να επιβιώνουν σε ένα περιβάλλον διαφορετικό από αυτό των ενηλίκων ατόμων. Έχουν μικρό μέγεθος, ενώ η μορφολογία τους αλλάζει δραματικά κατά την πλαγκτονική φάση της ζωής τους, ενώ ταυτόχρονα πρέπει να παραμείνουν λειτουργικοί οργανισμοί στο περιβάλλον διαβίωσης (Kendall *et al.* 1984).

1.2.3. Διακύμανση φυσιολογικού φαινοτύπου

Το σχήμα του σώματος είναι όλη η γεωμετρική πληροφορία που απομένει από ένα σύνολο καρτεσιανών συντεταγμένων, μετά την αφαίρεση των διαφορών που οφείλονται στον προσανατολισμό, την κλίμακα και την τοποθέτηση (Zelditch 2012). Οι ιχθύες ως μια έντονα εύπλαστη ομάδα οργανισμών, έχουν την ικανότητα να τροποποιούν τον φαινότυπό του σχήματος του σώματος τους σε σχέση με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, ιδιαίτερα όταν αυτές επικρατούν κατά την πρώιμη οντογενετική περίοδο (Vagner *et al.* 2019). Υπό την επίδραση του περιβάλλοντος ο φαινότυπος του σχήματος του σώματος δύναται να αλλάξει σημαντικά. Στο zebrafish (*Danio rerio*) η θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης επηρεάζει σημαντικά το σχήμα του σώματος των ιχθυδίων και ενηλίκων (Georga and Koumoundouros 2010, Sfakianakis *et al.* 2011). Στο ευρωπαϊκό λαβράκι, η θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης (15 °C και 20 °C) κατά τη νυμφική εκτροφή, οδήγησε σε διαφορετικά σχήματα του σώματος, ενώ και αρκετοί μεριστικοί χαρακτήρες έδειξαν να διαφέρουν σημαντικά. Μάλιστα το σχήμα του σώματος των ιχθυδίων που εκτράφηκαν στους 15 °C είχε πιο υδροδυναμικό πρότυπο σε σχέση με το σώμα των ατόμων που εκτράφηκαν στους 20 °C (Georgakopoulou *et al.* 2007). Παρομοίως, στην τσιπούρα η θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης επηρέασε σημαντικά το σχήμα του σώματος των ιχθυδίων, με τα άτομα που είχαν αναπτυχθεί στις υψηλές θερμοκρασίες να έχουν ένα πιο κοιλιακό στόμα, ενώ η κεφαλή ήταν μικρότερη σε σχέση με το υπόλοιπο σώμα (Loizides *et al.* 2014a). Στην

ιριδίζουσα πέστροφα, σημαντικές αλλαγές στο σχήμα του σώματος παρατηρήθηκαν στο στάδιο του ιχθυδίου, όταν νεο-εκκολαφθείσες νύμφες αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές ταχύτητες ρευμάτων (Fischer-Rousseau *et al.* 2010). Αντίστοιχα, στην περίπτωση του λαβρακιού, όπου η αλατότητα διέφερε κατά τα πρώιμα οντογενετικά στάδια, παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο σχήμα του σώματος των ιχθυδίων (Corti *et al.* 1996). Επίσης, οι Costa *et al.* (2010) παρατήρησαν έντονες μορφολογικές διαφορές μεταξύ ενηλίκων ατόμων λαβρακιού, όταν ιχθύδια αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τη διάρκεια της περιόδου της πάχυνσης, μετά από κοινές συνθήκες κατά τη νυμφική τους εκτροφή. Τέλος σε άτομα της ευρωπαϊκής πέρκας (*Perca fluviatilis*), το σχήμα του σώματος έδειξε να διαφοροποιείται κατά την αύξηση, ως απόκριση στην διαφορετική πυκνότητα της τροφής τους σε βενθικά μακροασπόνδυλα (Hjelm *et al.* 2001). Το σχήμα του σώματος θεωρείται αξιόλογος δείκτης για την εκτίμηση του βαθμού επίδρασης του περιβάλλοντος διαβίωσης φυσικών πληθυσμών. Στην περίπτωση των Ramler *et al.* (2016), το σχήμα του σώματος ατόμων του γένους *Phoxinus* επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό από το περιβάλλον διαβίωσης, με τις κύριες μορφολογικές διαφορές πιθανόν να συνδέονται με τους διαφορετικούς τρόπους κολύμβησης στο εκάστοτε περιβάλλον. Από την άλλη οι Jakubaviciūtė *et al.* (2018), παρατήρησαν μορφολογικές διαφορές μεταξύ πληθυσμών του είδους *Gasterosteus aculeatus* που βρίσκονταν σε διαφορετικές περιοχές της Βαλτικής θάλασσας.

Το σχήμα του σώματος όμως έχειδειχθεί ότι αλλάζει και μετά το στάδιο του ιχθυδίου. Σε ψάρια του είδους *Salaria fluviatillis*, παρατηρήθηκαν μορφολογικές διαφορές, όταν τα ιχθύδια διαβίωναν σε περιβάλλοντα με διαφορετικές ταχύτητες ρευμάτων (Laporte *et al.* 2016). Ακόμα και σε περιπτώσεις όπου συγκρίνονταν ψάρια εκτροφής με άτομα από φυσικούς πληθυσμούς (Von Cramon-Taubadel *et al.* 2005, Vehanen and Huusko 2011, Arechavala-Lopez *et al.* 2012), το σχήμα του σώματος παρουσίασε διαφορές. Σε κάποιες περιπτώσεις, ψάρια τα οποία αφέθηκαν στο φυσικό περιβάλλον, έδειξαν να μοιάζουν περισσότερο με τα άτομα των φυσικών πληθυσμών απ' ό τι με τα αδελφά ψάρια εκτροφής (Rogdakis *et al.* 2011, Sánchez-González and Nicieza 2017). Ισχυρή επιβεβαίωση ότι το σχήμα του σώματος αλλάζει και μετά τη μεταμόρφωση αποτελεί η εργασία των Colangelo *et al.* (2019), που περιγράφει τις οντογενετικές ομοιότητες στο στάδιο του ιχθυδίου μεταξύ ατόμων από τέσσερα είδη του γένους *Diplodus*. Παρατηρήθηκε ότι τα τέσσερα είδη ιχθυδίων έφεραν περισσότερες μορφολογικές ομοιότητες μεταξύ τους, απ' ό τι το στάδιο του ιχθυδίου

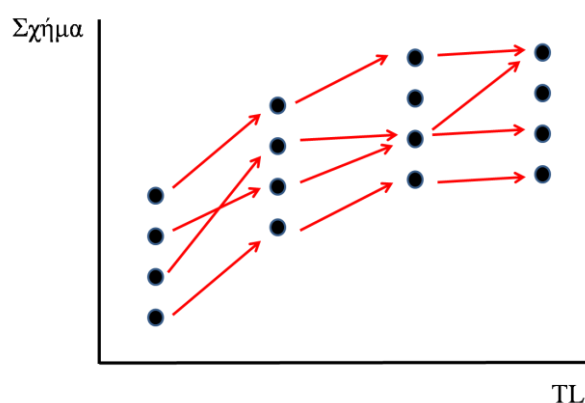
και του ενηλικού του ιδίου είδους. Συμπεραίνεται ότι αρκετά από τα δευτερογενή μορφολογικά χαρακτηριστικά των ψαριών, εμφανίζονται κατά την περίοδο της πάχυνσης. Από την άλλη, ενδέχεται η μετάβαση από την πελαγική στην βενθική φάση ζωής, να πυροδοτεί αλλαγές στο σχήμα του σώματος που μέχρι πρότινος δεν μπορούσαν να παρατηρηθούν.

Η σημασία του σχήματος του σώματος ως φαινοτυπικού χαρακτήρα δεν περιορίζεται στις μορφολογικές διαφορές μεταξύ ατόμων από διαφορετικά περιβάλλοντα. Τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες μελετούν όλο και περισσότερο τη γενετική βάση του σχήματος του σώματος. Στη γλώσσα (*Solea solea*), ένα είδος με μεγάλη εμπορική αξία, επιλογή με κριτήριο το μεγάλο βάρος του σώματος, είχε σαν αποτέλεσμα την λήψη απογόνων με πιο κυκλικό σχήμα σώματος (Blonk *et al.* 2010). Στο ευρωπαϊκό λαβράκι, οι Costa *et al.* (2010) έδειξαν ότι η διακύμανση του σχήματος του σώματος είχε υψηλή γενετική συνιστώσα τόσο ενδοπληθυσμιακά όσο και μεταξύ πληθυσμών. Στον κυπρίνο παρατηρήθηκε υψηλή γενετική και φαινοτυπική συσχέτιση μεταξύ του μήκους και του βάρους (Kocour *et al.* 2007). Στο ασιατικό λαβράκι (*Lates calcarifer*) η υψηλή γενετική και φαινοτυπική συσχέτιση του βάρους των ατόμων με το ύψος του σώματος και το μήκος των ψαριών, οδήγησε στο συμπέρασμα, ότι αυτοί οι μορφομετρικοί χαρακτήρες δύναται να βελτιωθούν, αν γίνει επιλογή των γεννητόρων με κριτήριο το αυξημένο βάρος κατά την εξαλίευση (Domingos *et al.* 2013). Τέλος η μελέτη της γενετικής βάσης του ύψους και του μήκους του σώματος στο γκουράμι (*Trichopodus pectoralis*) σε σχέση με το βάρος, έδειξε ότι σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης του είδους, η επιλογή ατόμων με σκοπό τη βελτίωση του βάρους θα είχε θετική επίδραση και σε αυτούς τους μορφομετρικούς δείκτες (Sutthakiet *et al.* 2020). Στην τσιπούρα δεν υπάρχει μελέτη σε ότι αφορά τη γενετική βάση του σχήματος παρά μόνο κάποιων μορφομετρικών χαρακτήρων μετρημένων ως αποστάσεις σημείων

1.2.4. Αλλομετρικά τροχιακά

Μέχρι τώρα δόθηκε έμφαση στην επίδραση του περιβάλλοντος στο σχήμα του σώματος, υποδεικνύοντας πόσο σημαντικό είναι το περιβάλλον διαβίωσης των ιχθύων για την σωματική τους διάπλαση. Κυρίως όμως φάνηκε ότι μέχρι σήμερα το ερευνητικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στην επίδραση του περιβάλλοντος στη διαμόρφωση του τελικού φαινοτύπου, χωρίς να γίνεται μνεία στη σχέση των παρατηρούμενων διαφορών

με τα πρότυπα οντογένεσης. Επιπλέον, το περιβάλλον μπορεί και επιδρά στα πρότυπα οντογένεσης, επηρεάζοντας τον χρονισμό τους. Εργασίες όπως των Fuiman *et al.* (1998), των Koumoundouros *et al.* (2001a) αλλά και των Parichy *et al.* (2009), έδειξαν ότι όταν η θερμοκρασία του νερού κατά τη νυμφική περίοδο διαφέρει, τα πρότυπα οντογένεσης διαφοροποιούνται με αποτέλεσμα η ολοκλήρωση των αναπτυξιακών διαδικασιών να είναι ταχύτερη στις υψηλότερες θερμοκρασίες. Στην περίπτωση του λαβρακιού, η υψηλή θερμοκρασία οδήγησε σε επιτάχυνση της οντογένεσης με αποτέλεσμα την αλλαγή των αλλομετρικών σημείων καμπής σε οκτώ από τους δεκαπέντε μορφομετρικούς χαρακτήρες (Koumoundouros *et al.* 2001a). Ωστόσο παρατηρείται έλλειψη γνώσης σχετικά με την "πορεία" που ακολουθεί ένας μορφολογικός χαρακτήρας μέχρι να φτάσει στον τελικό του φαινότυπο, ενώ απουσιάζει η μελέτη στη σχέση μεταξύ τους. Με άλλα λόγια, απουσιάζει η μελέτη των αλλομετρικών τροχιακών (allometric trajectories), δηλαδή η μελέτη του ρυθμού μεταβολής ενός φαινοτυπικού χαρακτήρα και η σχέση του με τον τελικό φαινότυπο (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3. Υποθετικά αλλομετρικά "τροχιακά" του σχήματος του σώματος κατά την αύξηση του σωματικού μεγέθους ενός είδους ψαριού.

1.2.5. Οι σκελετικές παραμορφώσεις ως παράγοντας διακύμανσης της εξωτερικής μορφολογίας

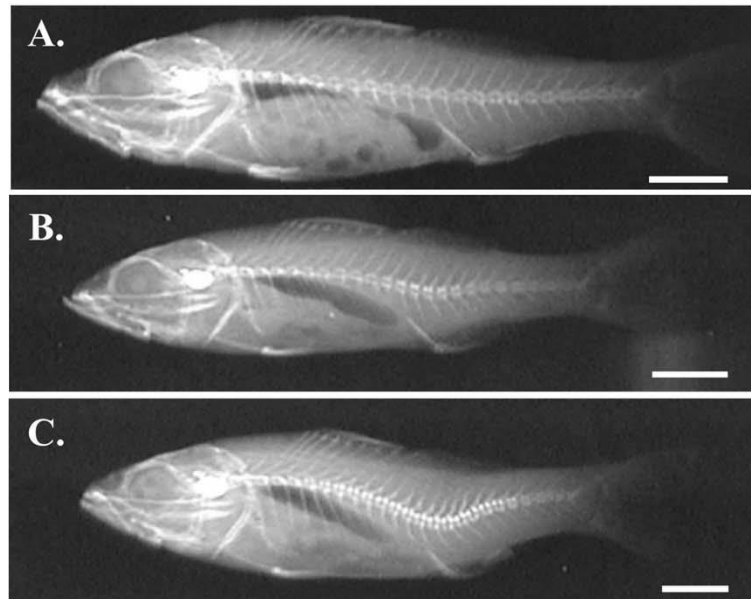
Οι σκελετικές παραμορφώσεις είναι μη αναστρέψιμες αποκλίσεις από το φυσιολογικό φαινότυπο, με συνεχή επίδραση στο σχήμα του σώματος (Koumoundouros 2010). Αποτελούν σημαντική πηγή φαινοτυπικής διαφοροποίησης των εκτρεφόμενων ψαριών, έχουν αρνητικές επιπτώσεις στο ρυθμό αύξησης των ατόμων, ενώ είναι συχνά υπεύθυνες και για υψηλά ποσοστά θνησιμότητας

(ανασκόπηση από Boglione *et al.* 2013). Θεωρούνται από τις πιο σημαντικές παραμέτρους ποιότητας για την ιχθυοκαλλιέργεια, αφού οι σκελετικές παραμορφώσεις μπορούν να προκαλέσουν οικονομικές απώλειες που αντιστοιχούν στο 15% κατά μέσο όρο της ετήσιας παραγωγής, ενώ υποβαθμίζουν σημαντικά την εικόνα που έχει ο καταναλωτής για τα προϊόντα των ιχθυοκαλλιεργειών (ανασκόπηση από Boglione *et al.* 2013).

Η μελέτη των σκελετικών παραμορφώσεων εστιάζεται στην πρώιμη οντογενετική περίοδο στην οποία αναπτύσσεται το σκελετικό σύστημα των ιχθύων. Παράγοντες όπως η θερμοκρασία (Polo *et al.* 1991, Wargelius *et al.* 2005, Georgakopoulou *et al.* 2010, Fraser *et al.* 2015), η διατροφή (Cobcroft *et al.* 2001, Ørnsrud *et al.* 2002, Cobcroft *et al.* 2004, Lall and Lewis-McCrea 2007, Cobcroft and Battaglione 2009, Mazurais *et al.* 2009) αλλά και το περιβάλλον εκτροφής (Koumoundouros *et al.* 2001b, Izquierdo *et al.* 2010,) θεωρούνται γενεσιουργοί παράγοντες των σκελετικών παραμορφώσεων κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Πλέον υπάρχουν και ισχυρές ενδείξεις ότι οι σκελετικές παραμορφώσεις έχουν και γενετική βάση (Gjerde *et al.* 2005, Castro *et al.* 2008, Bardon *et al.* 2009, Lee-Montero *et al.* 2015, Frangkoulis *et al.* 2018, 2020).

Οι σκελετικές δυσπλασίες χωρίζονται σε κατηγορίες με βάση τη θέση τους στο σώμα. Διακρίνονται στις κεφαλικές δυσπλασίες, στις δυσπλασίες της σπονδυλικής στήλης και στις δυσπλασίες των πτερυγίων (Koumoundouros 2010, Boglione *et al.* 2013). Ωστόσο οι παραπάνω τύποι παραμορφώσεων διακρίνονται σε δύο κατηγορίες με βάση το βαθμό που επιδρούν στο σχήμα του σώματος. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι παραμορφώσεις «διακριτής» επίδρασης, όπως είναι αυτές του βραγχιακού επικαλύμματος αλλά και η έλλειψη λειτουργικής νηκτικής κύστης (Koumoundouros 2010). Το κύριο ενδιαφέρον για αυτές τις παραμορφώσεις περιορίζεται στην εύρεση των γενεσιουργών παραγόντων και στην απομάκρυνση των παραμορφωμένων ατόμων από τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς.

Όσον αφορά τη δεύτερη κατηγορία παραμορφώσεων, αυτές δηλαδή όπου η επίδραση τους στην εξωτερική μορφολογία είναι συνεχής, όπως οι παραμορφώσεις των γνάθων και της σπονδυλικής στήλης, το πρόβλημα έγκειται επίσης στα διαφορετικά επίπεδα έντασης, αναλόγως των συνθηκών (Sfakianakis *et al.* 2006a, Εικόνα 1.4).

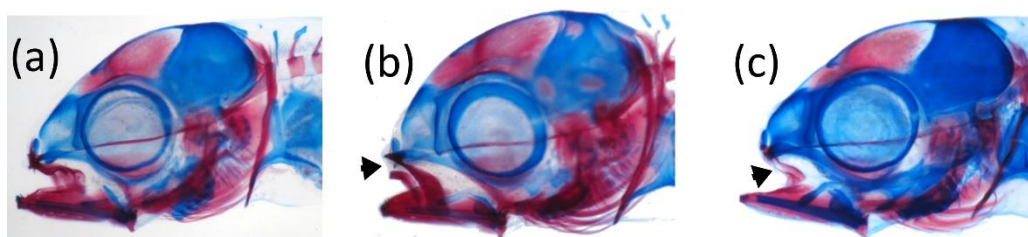


Εικόνα 1.4. Περιπτώσεις αματικής λόρδωσης διαφόρων εντάσεων σε ακτινογραφίες ιχθυδίων λαβρακιού (από Sfakianakis et al. 2006a).

Κατηγορία σκελετικών παραμορφώσεων με συνεχή επίδραση στην εξωτερική μορφολογία είναι οι παραμορφώσεις της σπονδυλικής στήλης. Ανάλογα με την ένταση της σκελετικής παραμόρφωσης, η επίδραση στην εξωτερική μορφολογία μπορεί να κυμαίνεται από αμελητέες έως σοβαρές αλλοιώσεις της εξωτερικής μορφολογίας (Sfakianakis *et al.* 2006a). Σε χαμηλές εντάσεις, συνήθως περνάνε απαρατήρητες κατά τον ποιοτικό έλεγχο των ιχθυδίων (0,2 - 2 γρ. ατομικό βάρος, Koumoundouros 2010), ενώ αυξανόμενης της έντασης, έχουν ανάλογη επίδραση στην εξωτερική μορφολογία. Μακροσκοπικά, οι κυριότερες παραμορφώσεις είναι η σκολίωση (πλευρική κάμψη), η λόρδωση (κοιλιακή κάμψη της σπονδυλικής στήλης στο κατακόρυφο επίπεδο) και η κύφωση (ραχιαία κάμψη της σπονδυλικής στήλης στο κατακόρυφο επίπεδο). Ανατομικά, οι παραμορφώσεις αυτές χαρακτηρίζονται από σύντηξη, μείωση μεγέθους και αλλοιώσεις των εμπλεκόμενων σπονδύλων (Koumoundouros 2010).

Σημαντική επίδραση στην εξωτερική μορφολογία έχουν επίσης και οι παραμορφώσεις του κρανίου. Χωρίζονται στις παραμορφώσεις των γνάθων και στις παραμορφώσεις του βραγχιακού επικαλύμματος. Οι γναθικές παραμορφώσεις συναντώνται τόσο στην άνω όσο και στην κάτω γνάθο, όμως με διαφορετικούς τύπους παραμορφώσεων για την κάθε ανατομική περιοχή (Koumoundouros 2010). Είναι από τις πρώτες σκελετικές παραμορφώσεις που θα αναπτυχθούν, δεδομένου ότι οι γνάθοι είναι από τις πρώτες σκελετικές δομές που αναπτύσσονται στις νύμφες, προκειμένου να ξεκινήσουν την εξωγενή τους θρέψη, μόλις τελειώσουν τα λεκιθικά αποθέματα

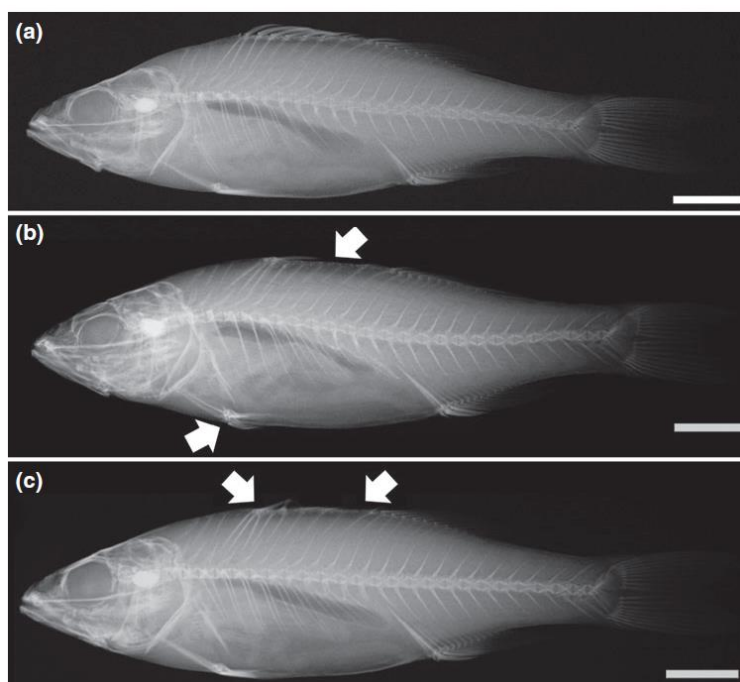
(Boglione *et al.* 2013). Σε υψηλές εντάσεις οι γναθικές παραμορφώσεις επηρεάζουν σημαντικά την εξωτερική μορφολογία των νυμφών (Fragkoulis *et al.* 2018). Από την άλλη, οι παραμορφώσεις του βραγχιακού επικαλύμματος επηρεάζουν την εξωτερική μορφολογία, μέσω της αλλοίωσης των εμπλεκόμενων οστών και την έκθεση των βραγχιακών τόξων (Boglione *et al.* 2013). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τον τραυματισμό των βραγχίων και την έκθεση σε παράσιτα του νερού, με αρνητικές συνέπειες για τη βιωσιμότητα των ατόμων και το ρυθμό αύξησής τους (Boglione *et al.* 2013). Θεωρούνται από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες παραμορφώσεις σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς τσιπούρας (μέχρι 80% Koumoundouros 2010, 5-20% Beraldo and Canavese 2011), ενώ η κύρια περίοδος εμφάνισής τους είναι τα πρώιμα οντογενετικά στάδια (Εικόνα 1.5). Και οι δύο κατηγορίες παραμορφώσεων όταν είναι υψηλής έντασης συντελούν στην απομάκρυνση των πασχόντων ατόμων από το εμπορεύσιμο απόθεμα κατά τον ποιοτικό έλεγχο των ιχθυδίων (Koumoundouros 2010), καθώς η εμφάνισή τους στο εμπορεύσιμο μέγεθος επηρεάζει αρνητικά την αξιολόγηση του καταναλωτή για το τελικό προϊόν.



Εικόνα 1.5. Ενδεικτικές περιπτώσεις κρανιακών παραμορφώσεων σε νύμφες τσιπούρας (από Fragkoulis *et al.* 2018).

Τέλος, μια ακόμη κατηγορία σκελετικών παραμορφώσεων είναι αυτή που σχετίζεται με τα πτερύγια. Κυριότερες περιπτώσεις είναι η μερική έλλειψη του ραχιαίου πτερυγίου (MEP, Saddleback syndrome, SBS) και οι ανωμαλίες που εντοπίζονται στο ουραίο πτερύγιο. Η MEP χαρακτηρίζεται από μερική ή ολική έλλειψη των ακτινών του ραχιαίου πτερυγίου, ενώ σε πολύ σοβαρές καταστάσεις η έλλειψη των ακτινών συνακολουθείται από έλλειψη των υποκείμενων στηρικτικών οστών (pterygiophores) (Εικόνα 1.6). Στο λαβράκι η παραμόρφωση του ραχιαίου πτερυγίου βρέθηκε να συνυπάρχει με ελλείψεις των κοιλιακών πτερυγίων, του εδρικού πτερυγίου, καθώς και αλλοιώσεις της πλευρικής γραμμής, χωρίς να έχει εντοπιστεί η γενεσιουργός αιτία (Fragkoulis *et al.* 2017b). Πρόκειται για μια σπάνια παραμόρφωση (λιγότερο από 1% σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς) η οποία έχει παρατηρηθεί και σε άγριους πληθυσμούς της Αυστραλίας (Diggles 2013). Η άλλη κατηγορία παραμορφώσεων είναι

αυτές του ουραίου πτερυγίου. Κυρίως είναι εσωτερικές χωρίς να επηρεάζουν την εξωτερική μορφολογία (Koumoundouros 2010, Fragkoulis *et al.* 2020). Ωστόσο περιπτώσεις όπως η πλευρική κάμψη και ο διπλασιασμός του ουραίου πτερυγίου θεωρούνται μέχρι σήμερα οι σοβαρότερες παραμορφώσεις που έχουν εντοπιστεί σε εκτρεφόμενα ευρωπαϊκά είδη και επηρεάζουν την εξωτερική μορφολογία (Koumoundouros *et al.* 1997a).



Εικόνα 1.6. Μερική έλλειψη ραχιαίου πτερυγίου σε ιχθύδια λαβρακιού. Α. Λαβράκι με φυσιολογικό ραχιαίο πτερύγιο, Β-Γ. Λαβράκια με ελλείψεις ακτινών του ραχιαίου πτερυγίου (από Fragkoulis *et al.* 2017b).

Μέχρι σήμερα η γνώση και η μελέτη των σκελετικών παραμορφώσεων επικεντρώνεται κυρίως στα στάδια που προηγούνται της μεταμόρφωσης, τόσο για την εύρεση των γενεσιουργών παραγόντων, όσο και για τον εντοπισμό των βέλτιστων επιπέδων των αβιοτικών συνθηκών για την καλύτερη οντογενετική ανάπτυξη (Koumoundouros 2010). Σύμφωνα με τον Koumoundouros (2010) περί βρόχου ποιότητας (Loop of Quality), ακόμα και οι μικρές αποκλίσεις από τον φυσιολογικό φαινότυπο κατά την περίοδο της οντογένεσης πρέπει να προβληματίζουν για τις διαδικασίες εκτροφής των προηγούμενων σταδίων προκειμένου να εντοπίζονται οι γενεσιουργοί παράγοντες και να διορθώνονται. Αυτό απαιτεί την πλήρη (και σημαντική) γνώση όλων των σταδίων κατά την εκτροφή σε καθημερινή βάση. Ακόμα και σε αυτήν την περίπτωση όμως, φαίνεται ότι το κύριο ενδιαφέρον είναι η πρόωμη

οντογενετική περίοδος, ενώ πουθενά δεν αναφέρεται η παρακολούθηση των σκελετικών παραμορφώσεων μετά την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης.

Είναι ευρέως διαδεδομένο ότι η περίοδος της πάχυνσης χαρακτηρίζεται ως "αδρανής" όσον αφορά τον έλεγχο ποιότητας (εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων, όπως η αιματική λόρδωση), ενώ ακόμα και στη βιβλιογραφία ο φαινότυπος του τελικού σταδίου εξετάζεται ως προς τις περιβαλλοντικές αλλαγές που πραγματοποιούνταν στα νυμφικά στάδια (Boglione *et al.* 2013).

Μέχρι σήμερα ωστόσο δεν έχουν υπάρξει έρευνες που να δείχνουν την ποιοτική εμφάνιση των παραμορφώσεων κατά την περίοδο της πάχυνσης, καθώς το ενδιαφέρον επικεντρώνεται μόνο στην αναγνώριση των σοβαρών και ελαφριών εντάσεων των παραμορφώσεων και όχι στις ενδιάμεσες καταστάσεις (Boglione *et al.* 2013). Κρίνεται αναγκαία η ανάπτυξη δεικτών ποιότητας που θα επιτρέπουν την πρόβλεψη της ποιότητας του τελικού προϊόντος από το στάδιο του ιχθυδίου. Επιπλέον η ανάπτυξη κλίμακας ποιότητας με βάση την επίδραση των σκελετικών παραμορφώσεων στην εξωτερική μορφολογία θα μπορούσε να "ρίξει φως" στην εξέλιξη τους κατά την περίοδο της πάχυνσης, ενώ θα έδινε τη δυνατότητα της συσχέτισης των δύο αυτών διακριτών σταδίων. Αυτό θα επέτρεπε την ολιστική μελέτη των σκελετικών παραμορφώσεων κατά τη διάρκεια όλης της παραγωγικής διαδικασίας και όχι μόνο της πρώιμης οντογενετικής περιόδου.

1.3. Στόχοι διδακτορικής διατριβής

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η οντογένεση του σχήματος του σώματος της τσιπούρας κατά την περίοδο της πάχυνσης. Οι επιμέρους στόχοι της μελέτης συνοψίζονται ως εξής:

- διερεύνηση της σχέσης μεταξύ του σχήματος του σώματος στο τέλος της μεταμόρφωσης και της ενηλικίωσης (Κεφάλαιο 2).
- μελέτη της διακύμανσης των ατομικών αλλομετρικών τροχιακών του σχήματος του σώματος (Κεφάλαιο 2).
- εξέλιξη της επίδρασης των σκελετικών δυσπλασιών στην εξωτερική μορφολογία. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε μια σπονδυλική (Κεφάλαιο 3) και μια κρανιακή παραμόρφωση (Κεφάλαιο 4).

Η παρούσα διδακτορική διατριβή έγινε σε εκτρεφόμενο πληθυσμό τσιπούρας. Το συγκεκριμένο είδος επιλέχτηκε ως πειραματικός οργανισμός, λόγω της υψηλής οικονομικής αξίας που έχει για την μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια (Εικόνα 1.2, FAO 2017). Πρόκειται για ένα τυπικό είδος θαλασσινού ψαριού με πελαγικά αυγά, σφαιρικού σχήματος διαμέτρου 1 mm με μία σταγόνα ελαίου (Kamaci *et al.* 2005), υψηλή γονιμότητα (1,2 εκατομμύρια αυγά/kg σωματικού βάρους, Zohar *et al.* 1984) και πρόωμη αναπτυξιακή περίοδο με νυμφικά στάδια (Russo *et al.* 2007).

Όσον αφορά το σχήμα του σώματος της τσιπούρας, οι Russo *et al.* (2007) περιέγραψαν την οντογένεση του από το στάδιο της λεκιθοφόρου νύμφης μέχρι και την ενηλικίωση. Παρατήρησαν ότι μετά τα 70 mm TL, δεν παρατηρούνται σημαντικές μορφολογικές διαφοροποιήσεις. Ωστόσο οι Fragkoulis *et al.* (2017a) εντόπισαν έντονες μορφολογικές διαφορές μεταξύ εκτρεφόμενων πληθυσμών όταν, μετά την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης, τα άτομα μοιράστηκαν σε δύο διαφορετικά περιβάλλοντα. Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η θερμοκρασία πρόωμης ανάπτυξης επηρεάζει τον οντογενετικό χρονισμό, με αποτέλεσμα το ίδιο στάδιο να εντοπίζεται σε μικρότερα μεγέθη, όταν η θερμοκρασία είναι υψηλή (Loizides *et al.* 2014a). Είναι ένα είδος του οποίου το σχήμα του σώματος έχει συγκριθεί πολλές φορές μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικών πληθυσμών προκειμένου να χαρακτηριστούν οι μορφολογικές διαφορές λόγω της εντατικής εκτροφής του (Rogdakis *et al.* 2011, Arechavala-Lopez *et al.* 2012). Η υψηλή εμπορική του αξία έχει οδηγήσει στην μελέτη και τον εντοπισμό QTL γενετικών

τόπων μορφολογικών χαρακτήρων, προκειμένου να ενταχθούν σε προγράμματα γενετικής βελτίωσης (Loukonitis *et al.* 2013).

Αναφορικά με την ανάπτυξη σκελετικών παραμορφώσεων, έχει δειχθεί ότι η επίδραση του περιβάλλοντος κατά την πρώιμη οντογενετική περίοδο έχει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των σκελετικών παραμορφώσεων (Fernandez *et al.* 2008, Georgakoroulou *et al.* 2010), ενώ έχει παρατηρηθεί και λόρδωση σε στάδια μετά τη μεταμόρφωση (Andrades *et al.* 1996). Επιπλέον είναι ένα είδος στο οποίο έχει γίνει πλήρης περιγραφή της οντογενετικής ανάπτυξης ολόκληρου του σκελετικού συστήματος (Faustino and Power 1998, 1999, 2001). Τέλος αξίζει να αναφερθεί ότι στο συγκεκριμένο είδος παρατηρήθηκε για πρώτη φορά επιδιόρθωση των παραμορφώσεων του βραγχιακού επικαλύμματος (Beraldo and Canavese 2011).

Κεφάλαιο 2^ο

Αλλομετρικά τροχιακά του σχήματος του σώματος

2.1. Εισαγωγή

Η οντογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία αύξησης και διαφοροποίησης, κατά την οποία ο οργανισμός υπόκειται σε έντονες αλλαγές προκειμένου να συνεχίζει να είναι λειτουργικός όσο μεγαλώνει. Κύριο χαρακτηριστικό της περιόδου αυτής, είναι η αλλομετρική αύξηση, δηλαδή ο διαφορετικός ρυθμός αύξησης μεριστικών και μορφομετρικών χαρακτήρων του σώματος, σε σχέση με το ρυθμό αύξησης του μήκους του ψαριού (Fuiman 1983). Η μελέτη των αλλομετρικών τροχιακών των διαφορετικών ποσοτικών χαρακτήρων, εξυπηρετεί τη σύνδεση της μορφολογικής οντογένεσης με τη λειτουργικότητα των οργανισμών. Οι μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν κατά την οντογενετική περίοδο, μπορεί να σχετίζονται με αλλαγές στην εσωτερική ανατομία, την φυσιολογία, το μεταβολισμό και τις διατροφικές αλλαγές των ιχθύων (Kendall *et al.* 1984, Russo *et al.* 2007). Οι μελέτες που σχετίζονται με την αλλομετρική αύξηση πραγματοποιούνται κυρίως κατά τα πρώιμα οντογενετικά στάδια, καθώς τότε οι νύμφες υφίστανται έντονες αλλαγές προκειμένου να μεταμορφωθούν σε ιχθύδια (Koumoundouros *et al.* 1999, Osse and van den Boogaart 2004, Peña and Dumas 2009). Έχει δειχθεί ότι τα οντογενετικά και αλλομετρικά πρότυπα τέτοιων χαρακτήρων αλλάζουν όταν περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία (Koumoundouros *et al.* 2001a, Georgakopoulou *et al.* 2007, Georga and Koumoundouros 2010, Loizides *et al.* 2014a), η συγκέντρωση του οξυγόνου (Marks *et al.* 2005, Shang *et al.* 2006, Widmer *et al.* 2006), η φωτοπερίοδος και η αλατότητα (Lindsey 1988), η παρουσία θηρευτών (Eklöv and Svanbäck 2006), το περιβάλλον πρώιμης ανάπτυξης (Koumoundouros *et al.* 1999, Bowen and Marchetti 2016) και η διατροφή (Hjelm *et al.* 2001) διαφοροποιούνται. Μέχρι τώρα όλες οι επιστημονικές εργασίες που σχετίζονται με οντογένεση και αλλομετρία αναφέρονται σε πληθυσμιακό επίπεδο μελετώντας το μέσο αλλομετρικό τροχιακό, χρησιμοποιώντας δείγματα που αποτελούνται από διαφορετικά άτομα που συλλέγονται σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης. Αυτό οφείλεται κυρίως στην ευαισθησία των οργανισμών κατά τα πρώιμα οντογενετικά στάδια, γεγονός που δεν επιτρέπει την ατομική σήμανση για την μελέτη των αλλομετρικών τροχιακών σε ατομικό επίπεδο.

Ένας χαρακτήρας που μελετάται εκτενέστερα κατά την οντογένεση των οργανισμών είναι το σχήμα του σώματος. Ως σχήμα ορίζεται η γεωμετρική πληροφορία που απομένει από ένα σύνολο καρτεσιανών συντεταγμένων, όταν αφαιρεθούν οι διαφορές που οφείλονται στον προσανατολισμό, το μέγεθος και την

τοποθέτηση (Zelditch 2012). Είναι σημαντικός δείκτης ποιότητας για τα εκτρεφόμενα ψάρια που εμπορεύονται ολόκληρα (Fragkoulis *et al.* 2017a). Η οντογένεση του σχήματος του σώματος μελετάται κυρίως από τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, ενώ η χρήση διαφορετικών αβιοτικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία (Georgakopoulou *et al.* 2007, Georga and Koumoundouros 2010, Sfakianakis *et al.* 2011, Loizides *et al.* 2014a) και η ταχύτητα ρευμάτων (Fischer-Rousseau *et al.* 2010), έχει σημαντική επίδραση στον φαινότυπο του ιχθυδίου. Η μελέτη της οντογένεσης είναι απαραίτητη για είδη εμπορικής σημασίας (Koumoundouros *et al.* 1999, 2005, Kouttouki *et al.* 2006, Song *et al.* 2019), αλλά και για είδη που παρουσιάζουν μείωση των πληθυσμών τους λόγω αυξημένης αλιευτικής δραστηριότητας (Kupren *et al.* 2015). Για εκτρεφόμενα είδη όπως το *Diplodus puntazzo* (Kouttouki *et al.* 2006), το *Dentex dentex* (Koumoundouros *et al.* 1999), το *Umbrina cirrosa* (Koumoundouros *et al.* 2005), το *Sparus aurata* (Russo *et al.* 2007), το *Huso huso* (Gisbert *et al.* 2014), το *Chelon labrosus* (Khemis *et al.* 2013), το *Platax teira* (Leu *et al.* 2018), αλλά και το *Siniperca chuatsi* (Song *et al.* 2019), η γνώση σχετικά με την οντογένεσή τους, είναι σημαντική για την βελτιστοποίηση της ανάπτυξης τους με απότερο στόχο την αύξηση της παραγωγής. Ωστόσο για τα περισσότερα είδη απουσιάζει η μελέτη της οντογένεσης μετά το στάδιο του ιχθυδίου, καθώς θεωρείται ότι το σχήμα του σώματος παραμένει σταθερό μετά από αυτό το στάδιο και δεν αλλάζει κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Μάλιστα κατά την οντογένεση της τσιπούρας, το σχήμα του σώματος μετά τα 70 mm TL έχει προταθεί πως παραμένει σταθερό και δεν αλλάζει μέχρι την ενηλικίωση (Russo *et al.* 2007). Πρόσφατα, παρατηρήθηκε ότι το σχήμα του σώματος της τσιπούρας μπορεί και αλλάζει και μετά το στάδιο του ιχθυδίου. Οι Fragkoulis *et al.* (2017a) παρατήρησαν διαφορές στο σχήμα του σώματος μεταξύ πληθυσμών τσιπούρας και μετά το στάδιο του ιχθυδίου και συγκεκριμένα στα 210 mm SL, όταν οι πληθυσμοί αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες κατά την περίοδο της πάχυνσης.

Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε το σχήμα του σώματος της τσιπούρας κατά την περίοδο της πάχυνσης. Με τη μέθοδο της ηλεκτρονικής σήμανσης στην έναρξη του πειράματος (1 dpt) έγινε εφικτή η παρακολούθηση των αλλομετρικών τροχιακών του σχήματος του σώματος τόσο σε πληθυσμιακό όσο και σε ατομικό επίπεδο μέχρι το τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt). Η μελέτη του μέσου αλλομετρικού τροχιακού θα δείξει κατά πόσο το σχήμα του σώματος αλλάζει κατά την περίοδο της πάχυνσης, αλλά και πότε φτάνει στον τελικό φαινότυπο. Επιπλέον η μελέτη των ατομικών αλλομετρικών τροχιακών θα ερευνησει κατά πόσο το πρότυπο αλλομετρικής αύξησης

είναι προκαθορισμένο και αν υπάρχει ενδοπληθυσμιακή διακύμανση κάτω από τις ίδιες συνθήκες εκτροφής, ενώ θα δείξει κατά πόσο συσχετίζονται μορφολογικά τα δύο οντογενετικά στάδια του ιχθυδίου και του ενηλίκου ατόμου.

2.2. Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός και προέλευση πληθυσμού ιχθύων

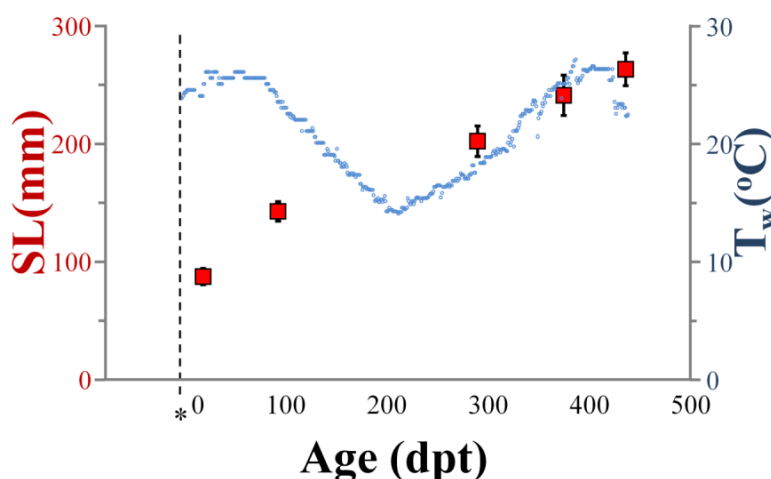
Πειραματικός πληθυσμός 1700 ιχθυδίων τσιπούρας (154 dph, 86 ± 7 mm τυπικό μήκος, SL) σημάνθηκε ηλεκτρονικά με τη μέθοδο PIT-tag (FDX-B, Trovan Ltd, USA). Η εξωτερική μορφολογία των ψαριών εξετάζονταν ανά τακτά διαστήματα μέχρι ο πληθυσμός να φτάσει στο εμπορεύσιμο μέγεθος (589 dph, 262 ± 14 mm SL) (Πίνακας 2.1). Σε κάθε δειγματοληψία όλα τα ψάρια αναισθητοποιούνταν (ethyleneglycol-monophenylether, Merck, $0,2 - 0,5 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$), φωτογραφίζονταν από την αριστερή πλευρά και σαρώνονταν για αναγνώριση ηλεκτρονικής μάρκας πριν επιστραφούν στο κλωβό. Για τις φωτογραφίες χρησιμοποιήθηκε κάμερα CANON PowerShot G9, τοποθετημένη σε τρίποδο, ενώ σε κάθε δειγματοληψία καταγράφονταν ο αριθμός των νεκρών ψαριών.

Πίνακας 2.1. Ηλικία, τυπικό μήκος (SL, μέσος όρος \pm τυπική απόκλιση) και βάρος (W, μέσο βάρος \pm τυπική απόκλιση) και αριθμός των ψαριών που φωτογραφήθηκαν σε κάθε δειγματοληπτική περίοδο. Από τα αρχικά 1700 ηλεκτρονικά σημασμένα ψάρια, 1376 επιβίωσαν μέχρι το τέλος της πειραματικής περιόδου. $^{\circ}\text{C} \cdot \text{days}$, το γινόμενο των ημερών με τη θερμοκρασία του νερού.

Ηλικία (days post tag)	Τυπικό μήκος (SL, mm)	Βάρος (W, g)	$^{\circ}\text{C} \cdot \text{days}$	Μέγεθος δείγματος
1	86 ± 7	15 ± 5	24	1700
77	142 ± 8	77 ± 14	1934	1605
282	201 ± 13	230 ± 48	5572	1507
371	240 ± 17	-	7209	1438
434	262 ± 14	513 ± 76	8816	1376

Η εκτροφή της τσιπούρας από το νυμφικό στάδιο και μέχρι το εμπορεύσιμο μέγεθος πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία ΑΝΔΡΟΜΕΔΑ Α.Ε. Τα 1700 ιχθύδια προέρχονταν από κοινό απόθεμα αυγών. Η εκτροφή των ψαριών πραγματοποιήθηκε με την καθιερωμένη μεθοδολογία για το είδος, όπως ακολουθείται από τα εκκολαπτήρια για τα νυμφικά στάδια και από τις μονάδες εκτροφής για την προπάχυνση και πάχυνση αντίστοιχα. Η εκτροφή των νυμφών έγινε με αρχική πυκνότητα εκατό νύμφες ανά λίτρο, υπό την παρουσία φυτοπλαγκτού (*Chlorella sp.*). Η διατροφή τους αποτελούνταν από ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς *Brachionus plicatilis* για το διάστημα 5 - 27 dph και ναύπλιων *Artemia sp.* για το διάστημα 17 - 40 dph. Η χρήση ξηρής εμπορικής τροφής ξεκίνησε από τις 27 dph. Η θερμοκρασία του

νερού διατηρούνταν μεταξύ 19°C και 21°C κατά την περίοδο της νυμφικής εκτροφής και της προπάχυνσης, ενώ την περίοδο της πάχυνσης η θερμοκρασία ακολουθούσε τις εποχικές διακυμάνσεις (Εικόνα 2.1). Στο τέλος της προπάχυνσης, 2000 ιχθύδια ($6,1 \pm 1,9$ γρ. μέσου βάρους, 137 dph) μεταφέρθηκαν σε θαλάσσιο κλωβό (έξι μέτρα διάμετρος και οκτώ μέτρα βάθος) για την περίοδο της πάχυνσης.



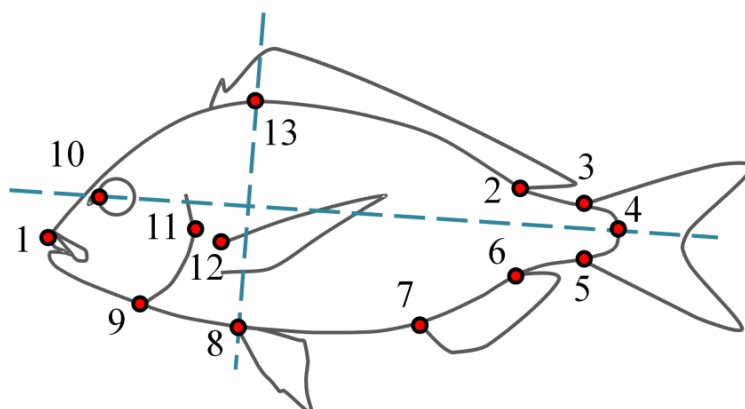
Εικόνα 2.1. Διακύμανση της θερμοκρασίας του νερού (T_w) κατά την περίοδο πάχυνσης, με τις δειγματοληψίες που πραγματοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια του πειράματος (κόκκινα τετράγωνα). Με αστερίσκο (*) υποδεικνύεται η μεταφορά των ιχθυδίων στον θαλάσσιο κλωβό. SL, τυπικό μήκος. dpt, days post tagging, ημέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.

2.2.2. Μορφομετρική ανάλυση

Για τη μελέτη των αλλομετρικών τροχιακών χρησιμοποιήθηκαν 959 άτομα που είχαν φυσιολογική εξωτερική μορφολογία σε όλη τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Η οντογένεση του σχήματος του σώματος κατά την περίοδο της πάχυνσης μελετήθηκε με τη μέθοδο της γεωμετρικής μορφομετρίας. Στις ψηφιακές φωτογραφίες των ψαριών τοποθετήθηκαν 13 μορφομετρικά ορόσημα σε διακριτές ανατομικές περιοχές (Εικόνα 2.2).

Το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για την τοποθέτηση των μορφομετρικών οροσήμων ήταν το tpsDig2 (Rohlf 2010a). Με τη βοήθεια του λογισμικού IMP (Sheets 2001) έγινε επεξεργασία των μορφομετρικών οροσήμων στον υπό εξέταση πληθυσμό, προκειμένου να καθοριστεί τόσο η μέση διαμόρφωση του σχήματος όσο και το κεντροειδές μέγεθος. Ακολούθως υπολογίστηκε ο πίνακας σχετικών στρεβλώσεων (relative warp matrix) με τη χρήση του πρόγραμματος tpsRelw (έκδοση 1.53, Rohlf

2010b). Για να εξεταστούν οι οντογενετικές αλλαγές του σχήματος του σώματος κατά τη διάρκεια της πάχυνσης, έγινε ανάλυση σχετικών στρεβλώσεων (Relative Warp Analysis, RWA). Για την οπτικοποίηση των αλλαγών στο σχήμα του σώματος, έγινε απεικόνιση ανυσμάτων ύστερα από τη συσχέτιση των σωματικών παραγόντων με τις RWs με τη χρήση του λογισμικού tpsRegr (Rohlf 2011).



Εικόνα 2.2. Θέση των δεκατριών μορφομετρικών σημείων (landmarks). (1) άνω πρόσθιο άκρο του ρύγχους, (2) οπίσθια βάση ραχιαίου πτερυγίου, (3) ραχιαίο άκρο της βάσης του ουραίου πτερυγίου, (4) μέσο της βάσης των ουραίων λεπιδοτριχιών, (5) κοιλιακό άκρο της βάσης του ουραίου πτερυγίου, (6, 7) οπίσθια και πρόσθια βάση του εδρικού πτερυγίου αντίστοιχα, (8) βάση των κοιλιακών πτερυγίων, (9) κοιλιακό όριο του βραγχιακού επικαλύμματος, (10) διάκενο μεταξύ ρόθωνα και οφθαλμικής κόγχης, (11) οπίσθιο άκρο βραγχιακού επικαλύμματος, (12) ραχιαία βάση των θωρακικών πτερυγίων, (13) ραχιαίο σημείο τομής όπως ορίζεται από την προέκταση των καθέτων προβολών στο ύψος της πρόσθιας βάσης των κοιλιακών πτερυγίων. Η απόσταση μεταξύ των οροσήμων 1 και 4 ορίζει το τυπικό μήκος (SL).

Για την εκτίμηση των αλλαγών ολόκληρου του σχήματος χρησιμοποιήθηκαν οι Προκρούστειες αποστάσεις (Procrustes Distances, PDs). Οι PDs θεωρούνται κατάλληλος μετρικός δείκτης για την ανομοιομορφία του σχήματος στον πολυδιάστατο γεωμετρικό χώρο (Kendall shape space). Οι PDs υπολογίστηκαν για κάθε άτομο ξεχωριστά. Για τον υπολογισμό τους, χρησιμοποιήθηκαν ως σημείο αναφοράς, τα τριάντα ιχθύδια με το μικρότερο τυπικό μήκος ($71,1 \pm 2,1$ mm SL, 1 dpt). Για τον υπολογισμό των PDs για κάθε άτομο χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$PD = \sqrt{\sum(RWi - rRWi)^2} \text{ (Zelditch 2012),}$$

όπου RWi, είναι η τιμή κάθε ατόμου για την εκάστοτε μεταβλητή σχετικών στρεβλώσεων (RW1 - RW22) και rRWi είναι η μέση τιμή RWi του δείγματος

αναφοράς. Για να διερευνηθεί κατά πόσο το σχήμα του σώματος των ιχθυδίων μπορεί να θεωρηθεί καλός δείκτης για το σχήμα του σώματος των ψαριών στα μετέπειτα στάδια, εκτιμήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson's μεταξύ των ατομικών PD τιμών του πρώτου (1 dpt) δείγματος με τα υπόλοιπα τέσσερα στάδια (77 - 434 dpt). Επιπλέον η διαδικασία επαναλήφθηκε για κάθε RW ξεχωριστά, αφού κάθε RW εξηγεί συγκεκριμένα στοιχεία της διακύμανσης του σχήματος του σώματος (Rohlf 1993).

Το τυπικό μήκος στο οποίο τα αλλομετρικά τροχιακά του σχήματος του σώματος παρουσίασαν σημείο καμπής (inflexion point) εκτιμήθηκε από μια ειδική μορφή γραμμικής παλινδρόμησης (κατά τμήματα γραμμική παλινδρόμηση, piecewise linear regression):

$$Y = b_0 + b_1 * SL + b_2 * (SL - L) * (SL \geq L),$$

όπου Y είναι η υπό εξέταση μεταβλητή του σχήματος του σώματος (PDs ή RWs), SL είναι το τυπικό μήκος, b₁ είναι η κλίση της σχέσης Y-SL κατά την πρώτη φάση των αλλομετρικών τροχιακών, b₂ είναι η αλλαγή στην παράμετρο b₁ που οδηγεί στην κλίση Y-SL κατά τη δεύτερη φάση των αλλομετρικών τροχιακών και L είναι το τυπικό μήκος στο σημείο καμπής (Nikolioudakis *et al.* 2010). Για την ποσοτικοποίηση των αλλομετρικών τροχιακών του σχήματος του σώματος, παράμετροι που σχετίζονται με την γραμμική συσχέτιση (κλίση και σημείο τομής του y-άξονα) εκτιμήθηκαν ξεχωριστά για κάθε άτομο και κάθε φάση των αλλομετρικών τροχιακών.

Επειδή στο παρελθόν το ύψος του σώματος παρατηρήθηκε να έχει σημαντικό ρόλο για τον καταναλωτή (Fragkoulis *et al.* 2017a), μελετήθηκε η εξέλιξη αυτού του μορφομετρικού χαρακτήρα κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Για αυτό το λόγο, υπολογίστηκε ο μορφομετρικός δείκτης BDR (Body Depth Ratio) από την εξίσωση:

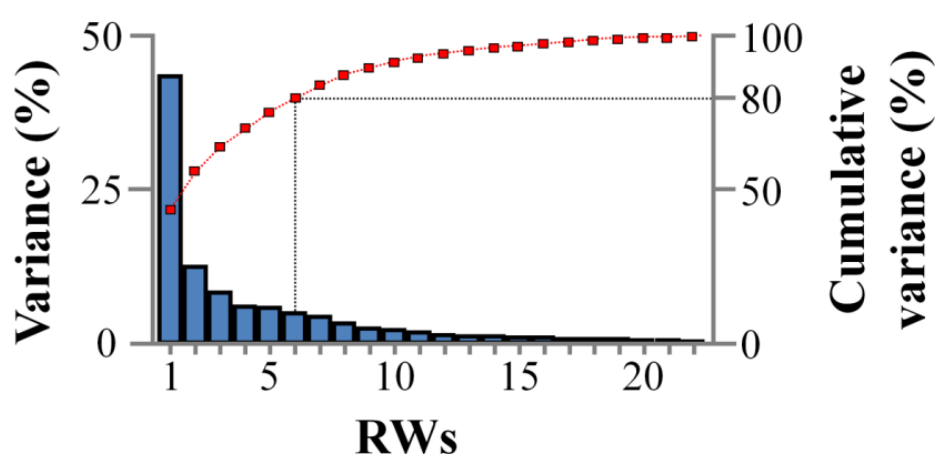
$$BDR = \frac{L8 - L13}{SL}$$

όπου L8-L13 είναι η απόσταση που ορίζεται από τα ορόσημα L8 και L13 (Εικόνα 2.2) και SL είναι το τυπικό μήκος. Προκειμένου να ελεγχθούν οι διαφορές μεταξύ των οντογενετικών σταδίων ως προς το συγκεκριμένο δείκτη, εκτιμήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Pearson's του δείκτη BDR, με τα δείγματα αναφοράς να είναι τα στάδια των ιχθυδίων (1 dpt) και των ενηλίκων (434 dpt) ατόμων.

2.3. Αποτελέσματα

2.3.1. Συσχέτιση του σχήματος του σώματος μεταξύ διαφορετικών σταδίων

Η ανάλυση σχετικών στρεβλώσεων από όλα τα ψάρια και όλες τις δειγματοληψίες διέκρινε 22 RWs. Το 43,4% της συνολικής διακύμανσης ερμηνεύεται από την RW1 ενώ το 80% της συνολικής διακύμανσης από τις RW1 - RW6 (Εικόνα 2.3). Προκειμένου να ποσοτικοποιηθούν οι συνολικές αλλαγές του σχήματος του σώματος κατά την οντογένεση, όλες οι RWs χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των PDs για κάθε ψάρι σε κάθε δειγματοληψία.

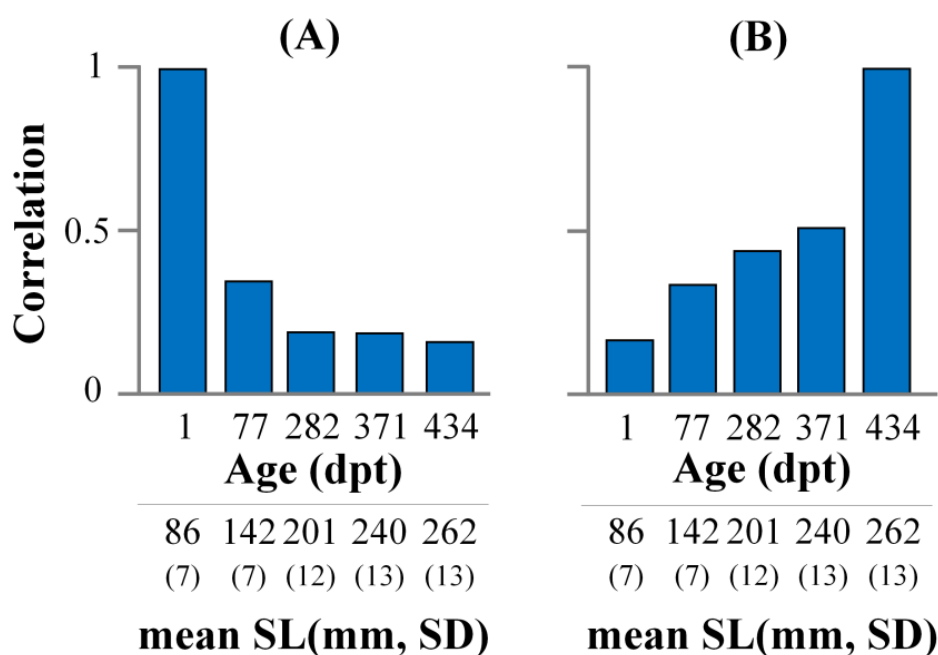


Εικόνα 2.3. Συνολική διακύμανση του σχήματος του σώματος, όπως αυτή εξηγείται από τις 22 μεταβλητές σχετικών στρεβλώσεων (Relative Warps, RWs).

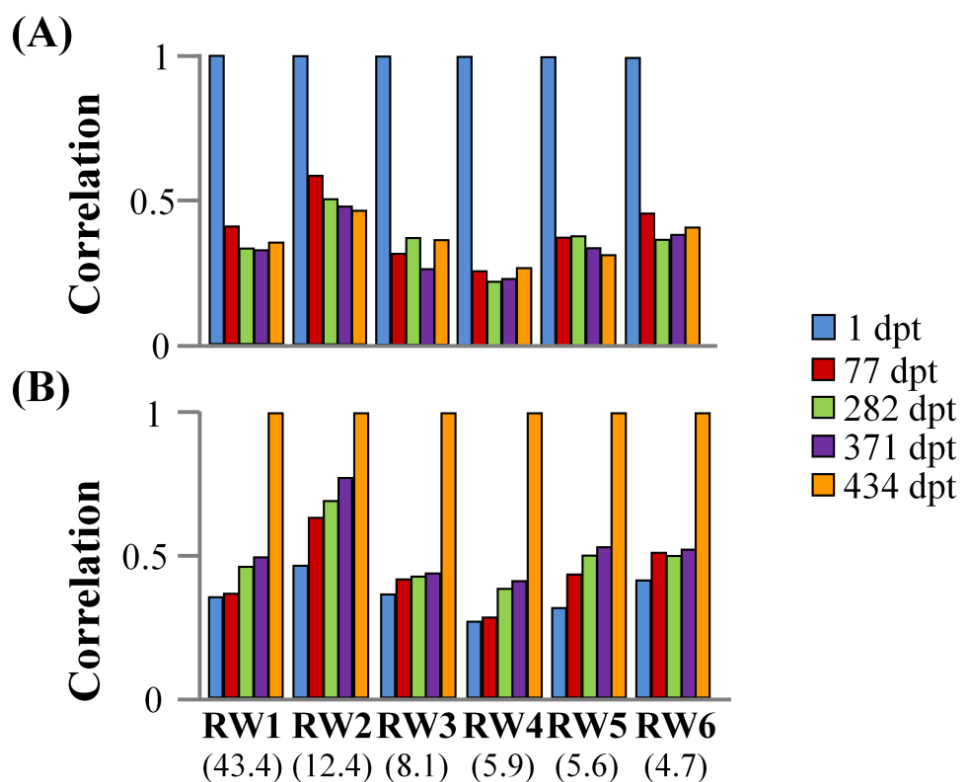
Το σχήμα του σώματος των ιχθυδίων είχε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με εκείνο των επόμενων δειγματοληψιών. Ο συντελεστής συσχέτισης παρουσίασε μείωση με την αύξηση της ηλικιακής διαφοράς μεταξύ των δύο δειγμάτων. Κυμάνθηκε από το 0,34 για το σχήμα του σώματος μεταξύ των ηλικιών 1 και 77 dpt (PD₁ - PD₇₇) μέχρι το 0,16 για το σχήμα του σώματος μεταξύ των ηλικιών 1 και 434 dpt (PD₁ - PD₄₃₄, Εικόνα 2.4A). Όμοια, όταν το σχήμα του σώματος στο εμπορεύσιμο μέγεθος (434 dpt) συσχετιζόταν με τις προηγούμενες δειγματοληψίες (1 - 371 dpt), ο συντελεστής συσχέτισης μειωνόταν όταν η διαφορά ηλικίας μεταξύ των δειγματοληψιών αυξανόταν, αφού κυμαινόταν από 0,51 όταν συσχετιζόταν το σχήμα του σώματος των ηλικιών 434 και 371 dpt (PD₄₃₄ - PD₃₇₁), μέχρι το 0,16 για τη συσχέτιση του σχήματος του σώματος μεταξύ των ηλικιών 434 και 1 dpt (PD₄₃₄ - PD₁, Εικόνα 2.4B).

Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν συσχετίσεις μεταξύ της πρώτης και της τελευταίας δειγματοληψίας (1 dpt και 434 dpt, αντίστοιχα) (εφεξής δείγματα αναφοράς) στις RWs. Αυτό έγινε προκειμένου να ελεγχθεί, αν τα διαφορετικά στοιχεία της διακύμανσης του

σχήματος του σώματος, παρουσιάζουν διαφορετικές συσχετίσεις μεταξύ των διαφορετικών δειγματοληψιών. Η συγκεκριμένη ανάλυση περιλάμβανε τις πρώτες έξι μεταβλητές σχετικών στρεβλώσεων (RW1 - RW6), που εξήγησαν το 80,1% της ολικής διακύμανσης αθροιστικά (Εικόνα 2.5A). Για όλες τις εξεταζόμενες RWs, παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις ($p < 0,05$) μεταξύ των δειγμάτων αναφοράς και των υπολοίπων δειγμάτων. Όπως και στις συσχετίσεις των PDs, στις περισσότερες των περιπτώσεων οι συσχετίσεις παρουσίασαν μείωση όσο αυξανόταν η ηλικιακή διαφορά μεταξύ των δειγμάτων (Εικόνα 2.5). Ανάλογα με την σχετική μεταβλητή που εξεταζόταν, η συσχέτιση κυμαινόταν μεταξύ 0,22 και 0,76. Υψηλότερες συσχετίσεις παρατηρήθηκαν στην RW2 ανεξαρτήτως δείγματος αναφοράς (0,46 - 0,58 και 0,45 - 0,76 για τα δείγματα 1 dpt και 434 dpt, αντίστοιχα) (Εικόνα 2.5B).



Εικόνα 2.4. **A.** Συντελεστής συσχέτισης Pearson's μεταξύ των Προκρούστειων αποστάσεων (Procrustes distances, PDs) του δείγματος των ιχθυδίων (1 dpt) με τις Προκρούστειες αποστάσεις, των επόμενων δειγμάτων, μέχρι το τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt). **B.** Συντελεστής συσχέτισης Pearson's μεταξύ των Προκρούστειων αποστάσεων του δείγματος στο τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt) με τις Προκρούστειες αποστάσεις των προηγούμενων δειγμάτων (1 - 371 dpt). Δίνεται το μέσο τυπικό μήκος (SL) για κάθε δειγματοληψία. Όλες οι συσχετίσεις ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$). dpt, days post tagging, ημέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.



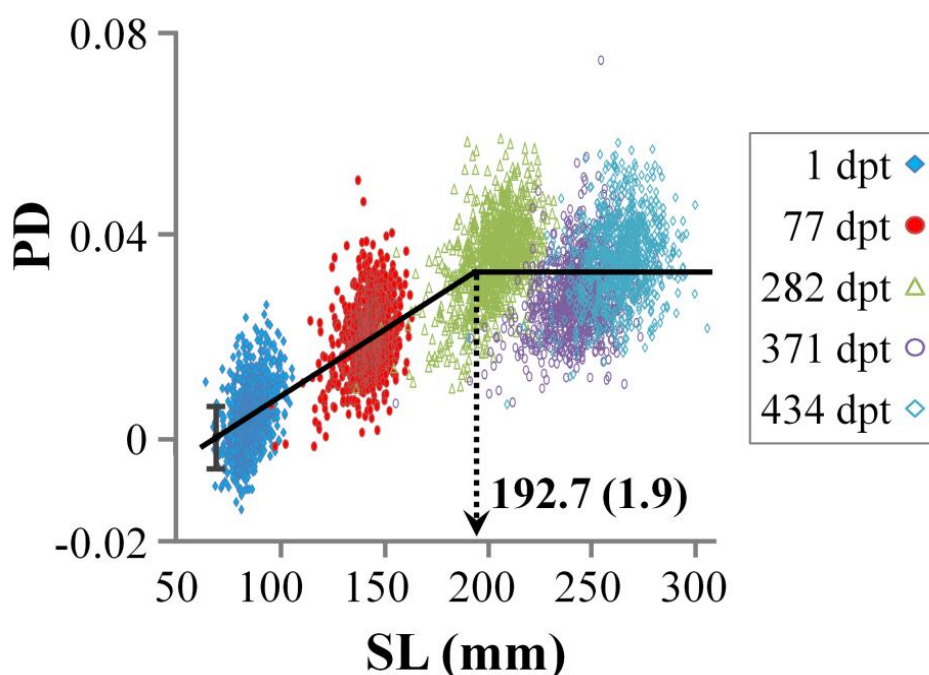
Εικόνα 2.5. Α. Συντελεστής συσχέτισης Pearson's μεταξύ των μεταβλητών σχετικών στρεβλώσεων (Relative Warps, RW) του σταδίου των ιχθυδίων (1 dpt) με εκείνες των επόμενων δειγματοληψιών μέχρι το τέλος της πάχυνσης (434 dpt). Β. Συντελεστής συσχέτισης Pearson's μεταξύ των μεταβλητών σχετικών στρεβλώσεων (Relative Warps, RWs) του τελευταίου σταδίου (434 dpt) με εκείνες των προηγούμενων δειγματοληψιών (1 – 371 dpt). Ο συντελεστής συσχέτισης υπολογίστηκε για τις πρώτες έξι RWs, που εξήγησαν το 80,1% της συνολικής διακύμανσης του σχήματος του σώματος. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις δίνουν το ποσοστό της διακύμανσης για κάθε μεταβλητή. Όλες οι συσχετίσεις ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$). dpt, days post tagging, , ημέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.

2.3.2. Οντογένεση του σχήματος του σώματος κατά την περίοδο της πάχυνσης

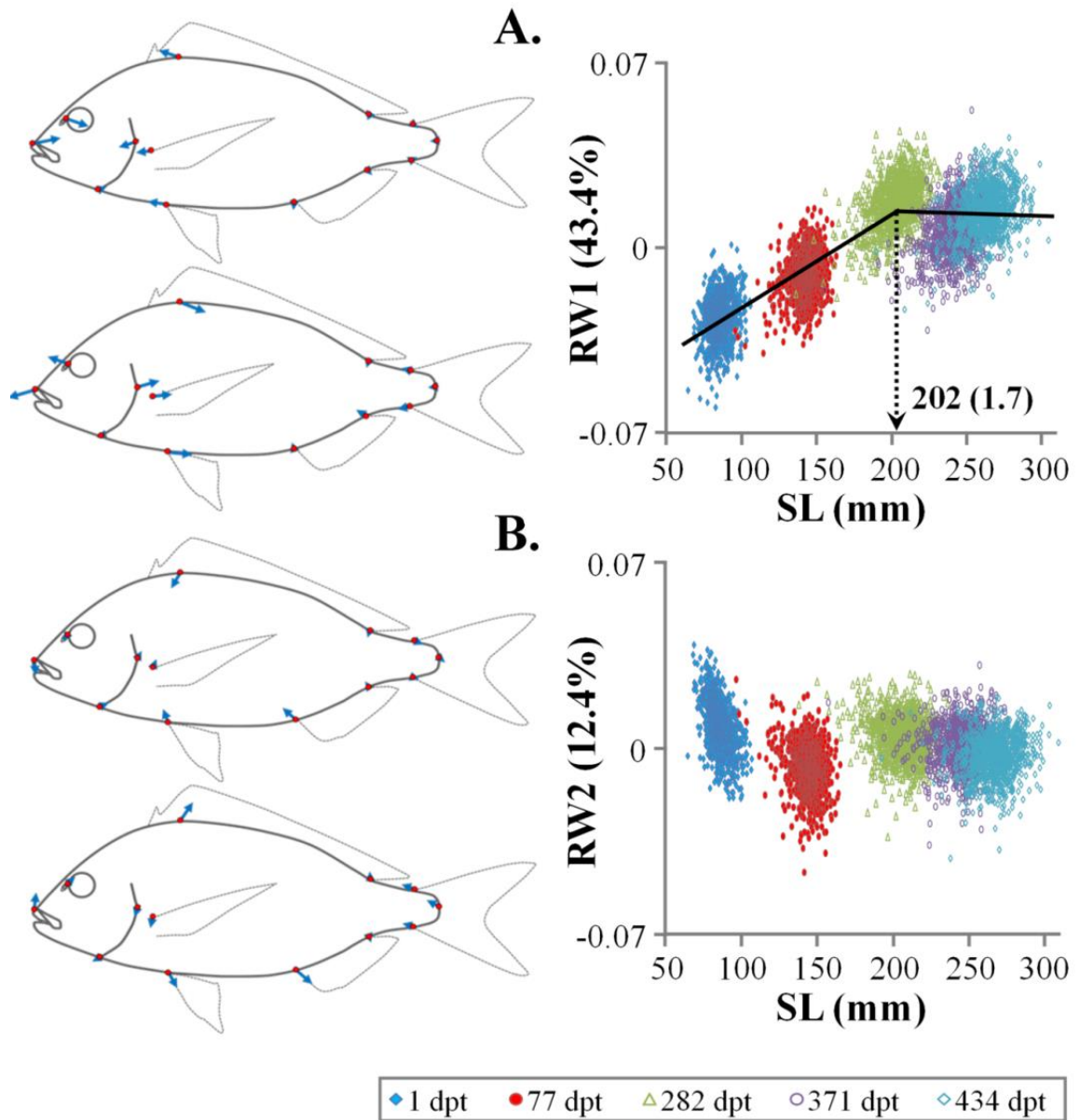
Από τη συσχέτιση των PDs με το SL, παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση του μεγέθους στο σχήμα του σώματος της τσιπούρας κατά την περίοδο της πάχυνσης (Εικόνα 2.6). Από το στάδιο των ιχθυδίων (περίπου 70 mm SL) και μέχρι τα $192,7 \pm 1,9$ (\pm SE) mm SL, οι PDs αυξάνονταν με την αύξηση του SL, ενώ κατά την υπόλοιπη οντογενετική περίοδο οι PDs ήταν ανεξάρτητες του τυπικού μήκους (Εικόνα 2.6). Στην περίπτωση των RWs, αλλαγές στο σχήμα του σώματος λόγω οντογενετικών αλλαγών παρατηρήθηκαν στην RW1 (43,4% της συνολικής διακύμανσης, Εικόνα 2.7A). Όπως και στην ανάλυση των PDs, η RW1 παρουσίασε οντογενετικές αλλαγές στο σχήμα του σώματος μέχρι το τυπικό μήκος των $202,0 \pm 1,7$ (\pm SE) mm, ενώ πάνω από αυτό το μέγεθος η RW1 ήταν ανεξάρτητη του SL (Εικόνα 2.7A). Οι οντογενετικές αλλαγές του σχήματος μεταξύ ιχθυδίων και ενηλίκων ατόμων αφορούσαν κυρίως στα πρόσθια μέρη του σώματος. Η μετάβαση από το φαινότυπο του ιχθυδίου στο φαινότυπο του ενηλίκου

χαρακτηρίστηκε από την οπίσθια μετατόπιση του ρύγχους και του ματιού, καθώς επίσης και από την πρόσθια μετατόπιση του βραγχιακού επικαλύμματος αλλά και της βάσης των θωρακικών και κοιλιακών πτερυγίων, καθώς επίσης και του ανώτατου ορίου του σώματος (Εικόνα 2.7A).

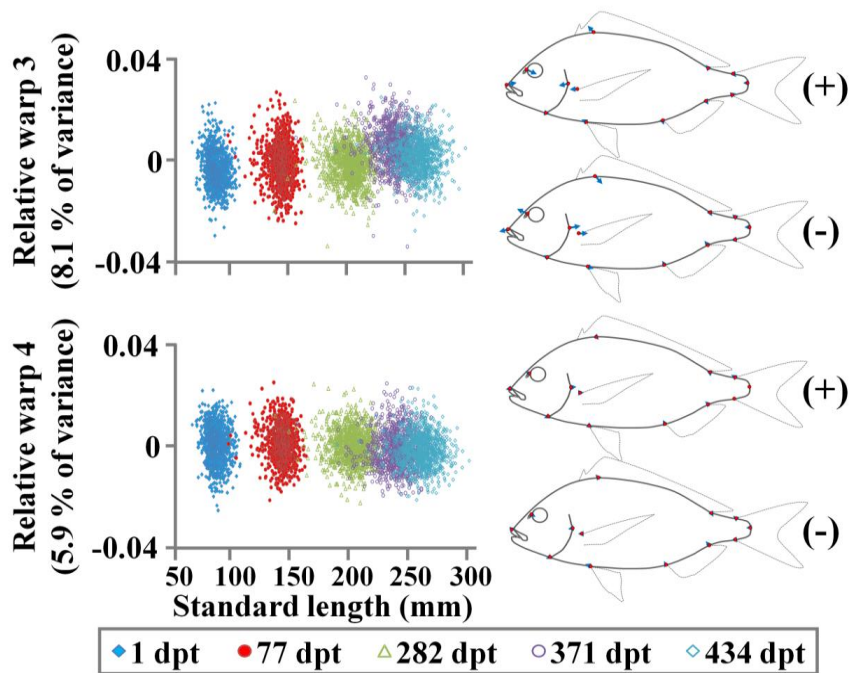
Σε αντίθεση με την RW1, δεν σημειώθηκαν σημαντικές αλλαγές στην RW2 (12,4% της συνολικής διακύμανσης) που να σχετίζονται με την ανάπτυξη των ψαριών (Εικόνα 2.7B). Οι αλλαγές του σχήματος κατά μήκος του άξονα της RW2 αφορούσαν στη μετατόπιση του οροσήμου 13 (ανώτερο ραχιαίο σημείο), της βάσης των κοιλιακών πτερυγίων (ορόσημο 8) και της αρχής του εδρικού πτερυγίου (ορόσημο 7), καθώς επίσης και της κοιλιακής μετατόπισης του ρύγχους (ορόσημο 1, Εικόνα 2.7B). Ομοίως, δεν παρατηρήθηκαν οντογενετικές αλλαγές στο σχήμα του σώματος που να σχετίζονται με τις υπόλοιπες σχετικές μεταβλητές (RW3 - RW6), οι οποίες αθροιστικά εξήγησαν το 24,3% της συνολικής διακύμανσης του σχήματος του σώματος (Εικόνα 2.8, 2.9).



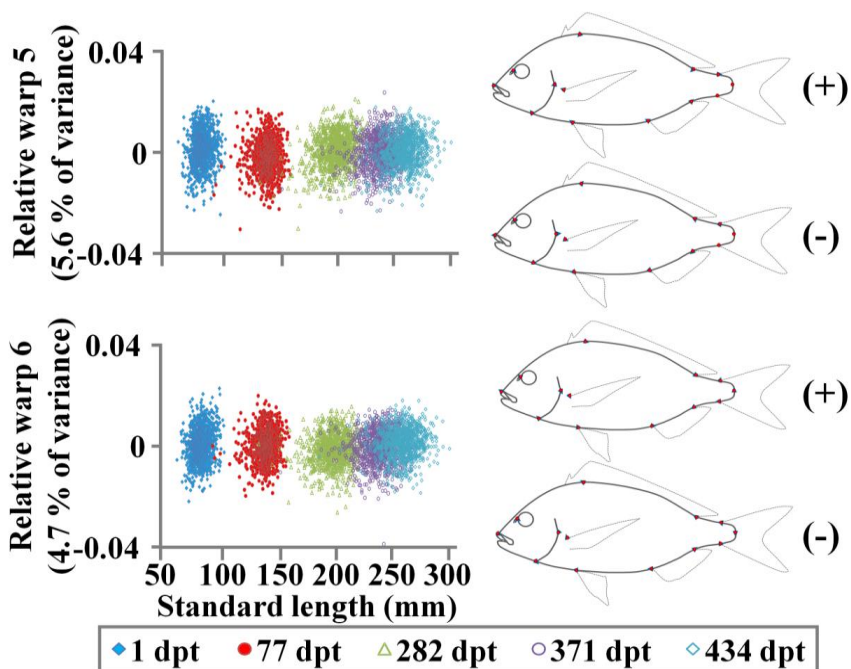
Εικόνα 2.6. Σχέση των Προκρούσειων αποστάσεων (PD) με το τυπικό μήκος (SL) κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Οι γραμμές σφάλματος (τυπική απόκλιση, SD) αναφέρονται στη μέση Προκρούσεια απόσταση των τριάντα ιχθυδίων με το μικρότερο τυπικό μήκος, τα οποία αποτέλεσαν το σημείο αναφοράς για τον υπολογισμό των PD. dpt, days post tagging, ημέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.



Εικόνα 2.7. Σχέση της πρώτης (A) και δεύτερης (B) μεταβλητής σχετικών στρεβλώσεων (RW1, RW2) με το τυπικό μήκος (SL) κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Τα διαγράμματα ανυσμάτων δείχνουν τις αλλαγές του σχήματος του σώματος στις ακραίες τιμές του Y-άξονα. dpt, days post tagging, ημέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.

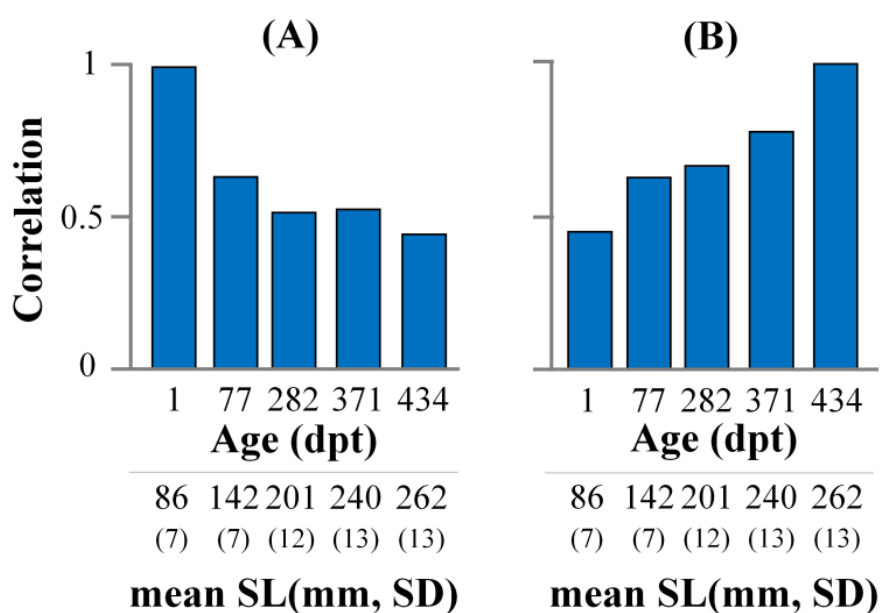


Εικόνα 2.8. Σχέση της τρίτης και τέταρτης μεταβλητής σχετικών στρεβλώσεων (RW3, RW4) με το τυπικό μήκος (SL) κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Τα διαγράμματα ανυσμάτων δείχνουν τις αλλαγές του σχήματος του σώματος στις ακραίες τιμές του Y-άξονα. dpt, days post tagging, ημέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.



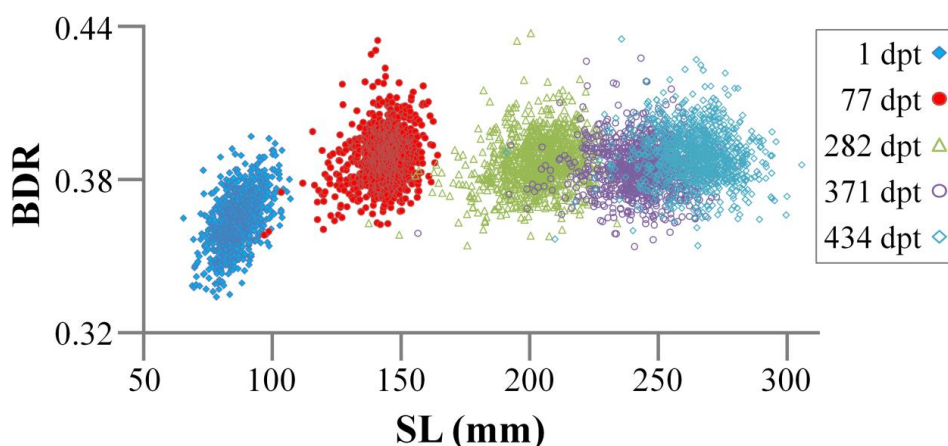
Εικόνα 2.9. Σχέση της πέμπτης και έκτης μεταβλητής σχετικών στρεβλώσεων (RW5, RW6) με το τυπικό μήκος (SL) κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Τα διαγράμματα ανυσμάτων δείχνουν τις αλλαγές του σχήματος του σώματος στις ακραίες τιμές του Y-άξονα. dpt, days post tagging, ημέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.

Όπως και στις περιπτώσεις των PDs και RW1, έτσι και στο δείκτη BDR παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δειγματοληψιών ($p < 0,05$). Πιο συγκεκριμένα, ο συντελεστής συσχέτισης του BDR παρουσίασε μείωση κατά τη διάρκεια της πάχυνσης, όταν μεγάλωνε η ηλικιακή διαφορά μεταξύ των δειγμάτων αναφοράς (1 και 434 dpt) από τις υπόλοιπες δειγματοληψίες (77, 282, 371 dpt). Έτσι η συσχέτιση κυμαινόταν από 0,64 μέχρι 0,45 όταν ο δείκτης BDR της πρώτης δειγματοληψίας (1dpt) συσχετίστηκε με τις υπόλοιπες δειγματοληψίες (77 - 434 dpt) (Εικόνα 2.10A). Ομοίως, όταν το δείγμα αναφοράς ήταν αυτό των ενηλίκων (434 dpt), ο δείκτης BDR παρουσίασε συσχέτιση που κυμαινόταν από 0,45 μέχρι 0,78 (Εικόνα 2.10B).



Εικόνα 2.10. **A.** Συντελεστής συσχέτισης Pearson's μεταξύ του δείκτη BDR (Body depth ratio) του σταδίου των ιχθυδίων (1 dpt) με τον δείκτη BDR των επόμενων δειγμάτων, μέχρι το τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt). **B.** Συντελεστής συσχέτισης Pearson's μεταξύ του δείκτη BDR του ενήλικου σταδίου (434 dpt) με τον δείκτη BDR των προηγούμενων δειγμάτων (1 - 371 dpt). Δίνεται το μέσο τυπικό μήκος (SL) για κάθε δειγματοληψία. Όλες οι συσχετίσεις ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$). dpt, days post tagging, ημέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.

Από τη συσχέτιση του δείκτη BDR με το SL, παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση κατά την περίοδο της πάχυνσης (Εικόνα 2.11). Πιο συγκεκριμένα ο χαρακτήρας που έχει έντονη σημασία για τους καταναλωτές παρουσίασε μεταβολή μεγέθους μέχρι τα 100 - 125 mm SL, ενώ στη συνέχεια παρουσίασε σταθερότητα.



Εικόνα 2.11. Σχέση του δείκτη BDR (Body depth ratio) με το τυπικό μήκος (SL) κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. dpt, days post tagging, ημέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.

2.3.3. Αλλομετρικά τροχιακά του σχήματος του σώματος

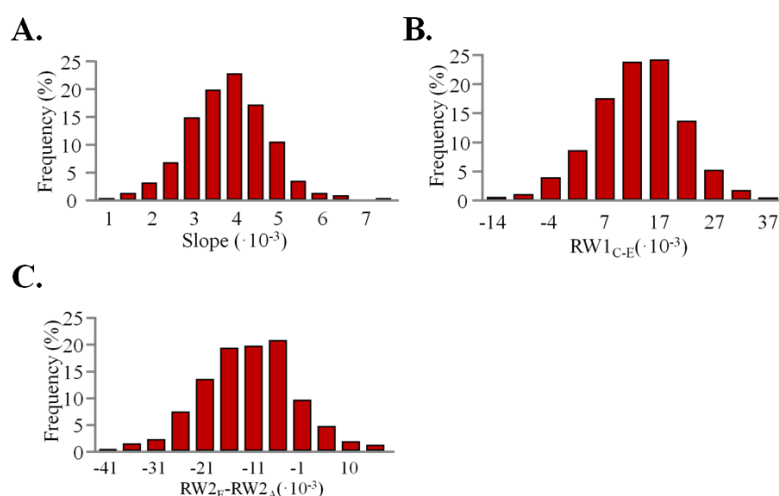
Λόγω της έντονης οντογενετικής ποικιλομορφίας που παρατηρήθηκε ανάμεσα στις δειγματοληψίες (Εικόνα 2.7) αλλά και των χαμηλών συσχετίσεων μεταξύ των δειγματοληψιών, δεν ήταν εύκολη η κατηγοριοποίηση των ατόμων με βάση την ηλικία. Για αυτό το λόγο, χρησιμοποιήθηκε το τυπικό μήκος, προκειμένου να κατηγοριοποιηθούν εκ νέου τα άτομα. Βάση του εύρους του τυπικού μήκους, τα δεδομένα του σχήματος του σώματος, κατηγοριοποιήθηκαν σε 13 κλάσεις των 20 χιλιοστών η κάθε μία. Τα αλλομετρικά τροχιακά υπολογίστηκαν για τα 5, 25, 50, 75 και 95α εκατοστημόρια (percentiles) για κάθε κλάση του μήκους (Εικόνα 2.13, 2.14). Παρατηρήθηκε ότι κάθε ψάρι παρουσιάζει διαφορετικό αλλομετρικό τροχιακό όσον αφορά το σχήμα του σώματος του, τόσο για την RW1 (Εικόνα 2.13) όσο και για την RW2 (Εικόνα 2.14).

Για να γίνει ποσοτικοποίηση των αλλομετρικών τροχιακών του σχήματος του σώματος, υπολογίστηκαν οι παράμετροι γραμμικής παλινδρόμησης (κλίση, σημείο τομής με τον y-άξονα) για την σχέση SL-RW1 κατά την περίοδο των τριών πρώτων δειγματοληψιών για κάθε ψάρι ξεχωριστά (φάση 1). Οι συντελεστές της γραμμικής παλινδρόμησης παρουσίασαν υψηλές τιμές (0,69 - 1), με την κλίση της ευθείας να κυμαίνεται μεταξύ 0,0001 και 0,0008 (Πίνακας 2.2). Η κατανομή συχνοτήτων έδειξε ότι το 84,4% των ατόμων είχε κλίση που κυμαινόταν γύρω από το μέσο όρο του πληθυσμού (0,0003 - 0,0005, Εικόνα 2.13H), ενώ το 10,6% είχε κλίση μικρότερη από 0,0003 (Εικόνα 2.13G). Μόλις το 5% του πληθυσμού παρουσίασε κλίση μεγαλύτερη του 0,0005, γεγονός που σημαίνει ότι ακολούθησαν ραγδαία μεταβολή του σχήματος κατά την περίοδο της πάχυνσης (Εικόνα 2.12A, 2.13I).

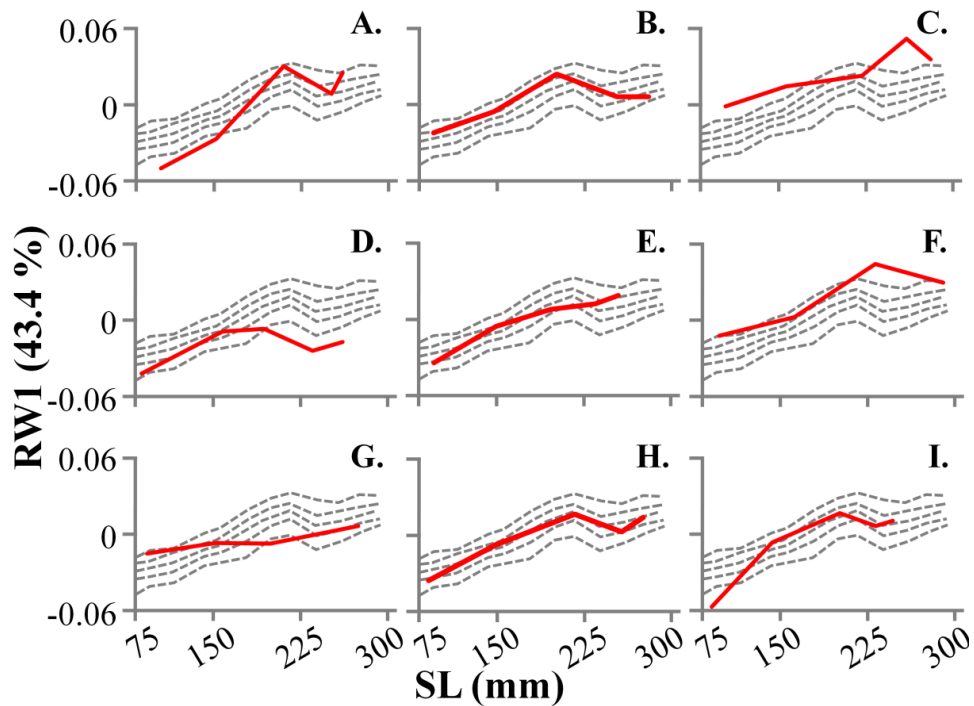
Αντίστοιχα, για την περίοδο των τριών τελευταίων δειγματοληψιών (φάση 2), όπου η RW1 δεν επηρεάζονταν από το τυπικό μήκος (Εικόνα 2.7), η μέση RW1 υπολογίστηκε ξεχωριστά για κάθε άτομο, αντιπροσωπεύοντας το σχήμα του σώματος στο πλατό του τροχιακού. Η τιμή της $RW1_{C-E}$ κυμαινόταν μεταξύ -0,152 και 0,0372 ($RW1_{C-E}$, Πίνακας 2.2). Από την κατανομή συχνοτήτων φάνηκε ότι το 66% των ατόμων είχε τιμή που κυμαινόταν μεταξύ 0,007 και 0,017 (Εικόνα 2.13E), το 13,5% είχε τιμή μικρότερη του 0,007 (Εικόνα 2.13D), ενώ το 20,5% παρουσίασε τιμή μεγαλύτερη του 0,022, παρουσιάζοντας δηλαδή μέσο σχήμα σώματος μεγαλύτερο από το μέσο όρο του πληθυσμού (Εικόνα 2.12B, 2.13F).

Πίνακας 2.2. Μέση τιμή (mean), τυπική απόκλιση (SD), μικρότερη (min.) και μεγαλύτερη (max.) τιμή των ατομικών αλλομετρικών τροχιακών. "b", είναι η κλίση και "a" το σημείο τομής της γραμμικής σχέσης SL-RW1 για τις τρεις πρώτες δειγματοληψίες κάθε ψαριού. $RW1_{C-E}$ είναι η μέση τιμή RW1 των τριών τελευταίων δειγμάτων για κάθε ψάρι. $RW2_E-RW2_A$ είναι η διαφορά της πέμπτης από την πρώτη δειγματοληψία για τη δεύτερη σχετική μεταβλητή. n, ο αριθμός των ατόμων.

Parameter	Mean	SD	min.	max.	n
b	0,0004	0,0001	0,0001	0,0008	959
a	-0,0615	0,0145	-0,1279	-0,0179	
r	0,9748	0,0356	0,6907	1	
$RW1_{C-E}$	0,0126	0,0079	-0,0152	0,0372	
$RW2_A$	0,0076	0,0096	-0,0192	0,0375	
$RW2_B$	-0,0083	0,0089	-0,0465	0,0247	
$RW2_C$	0,0038	0,0081	-0,0334	0,0268	
$RW2_D$	0,0007	0,0082	-0,0364	0,0300	
$RW2_E$	-0,0038	0,0080	-0,0413	0,0180	
$RW2_E-RW2_A$	-0,0114	0,0093	-0,0422	0,0170	

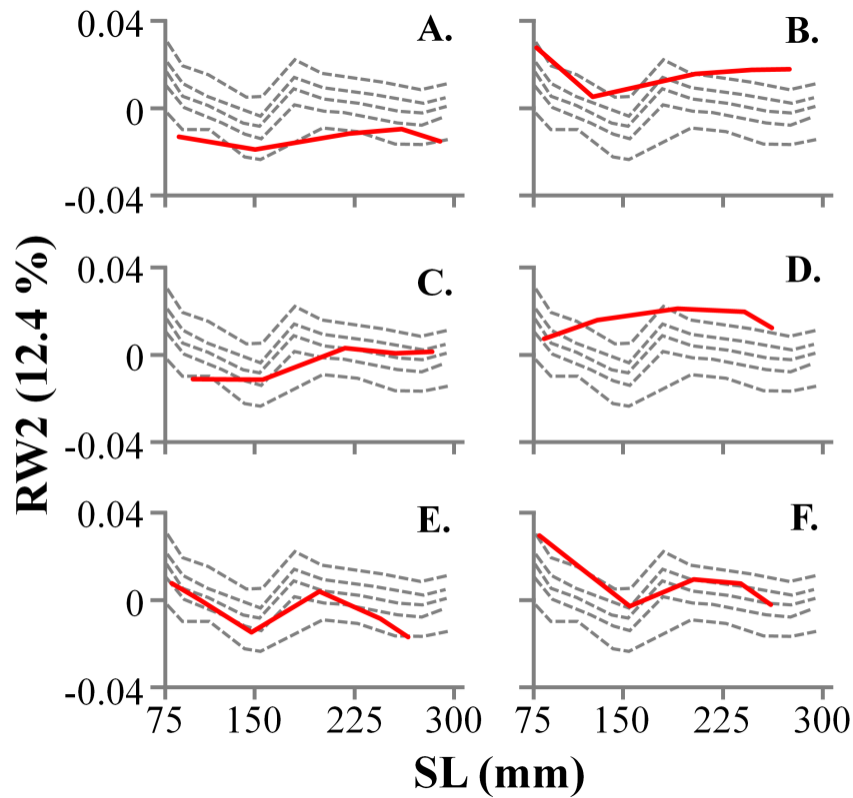


Εικόνα 2.12. Κατανομή συχνοτήτων A) της κλίσης, B) του μέσου RW1 όπως αυτό ορίζεται από τις τελευταίες τρεις δειγματοληψίες, C) της διαφοράς της τιμής μεταξύ $RW2_E$ και $RW2_A$.



Εικόνα 2.13. Παραδείγματα ατομικών αλλομετρικών τροχιακών του σχήματος του σώματος στην πρώτη μεταβλητή σχετικών στρεβλώσεων (RW1, κόκκινες γραμμές) σε σχέση με τα πληθυσμιακά τροχιακά (διακεκομμένες γραμμές), όπως ορίζονται από τα 5 (κατώτερη διακεκομμένη γραμμή), 25, 50, 75, 95α (ανώτερη διακεκομμένη γραμμή) εκατοστημόρια (percentiles). **A-C**, περιπτώσεις ατομικών τροχιακών με διαφορετικό σημείο τομής του γ-άξονα (a). **D-F**, περιπτώσεις ατομικών τροχιακών με διαφορετική τιμή για τη μέση RW1_{C-E}. **G-I**, περιπτώσεις ατομικών τροχιακών με διαφορετική κλίση (b). SL, τυπικό μήκος.

Τέλος, για την ποσοτικοποίηση των ατομικών τροχιακών της RW2, υπολογίστηκε η μέση τιμή RW2 για όλες τις δειγματοληψίες (RW2_A - RW2_E), καθώς επίσης και η διαφορά μεταξύ της RW2_E και της RW2_A. Η τιμή της διαφοράς των δύο δειγματοληψιών κυμαινόταν μεταξύ -0,0422 και 0,0170 (Πίνακας 2.2). Από την κατανομή συχνοτήτων φάνηκε ότι το 73,2% παρουσίασε τιμή μεταξύ -0,021 και -0,006, ενώ το 10,4% είχε τιμή μικρότερη από -0,021. Το 16,4% των ατόμων παρουσίασε τιμή μεγαλύτερη από -0,006 (Εικόνα 2.12C). Όσον αφορά την RW2 παρατηρήθηκαν περιπτώσεις ατόμων που παρουσίασαν είτε χαμηλές (Εικόνα 2.14A) είτε υψηλές τιμές (Εικόνα 2.14B), σε όλη τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Ωστόσο, παρατηρήθηκαν και περιπτώσεις ατόμων που παρουσίασαν χαμηλές τιμές στην έναρξη της πάχυνσης, αλλά είχαν υψηλές τιμές στο τέλος της (Εικόνα 2.14C) ή και το αντίστροφο (Εικόνα 2.14F). Τέλος παρατηρήθηκαν περιπτώσεις όπου ενώ τα άτομα βρίσκονταν στο μέσο του πληθυσμού κατά την έναρξη της πάχυνσης, βρέθηκαν είτε στο 95ο εκατοστημόριο του πληθυσμού (Εικόνα 2.14D) είτε στο 5ο εκατοστημόριο του πληθυσμού (Εικόνα 2.14E) στο τέλος της πάχυνσης.



Εικόνα 2.14. Παραδείγματα ατομικών τροχιακών του σχήματος του σώματος στη δεύτερη μεταβλητή σχετικών στρεβλώσεων (RW2, κόκκινες γραμμές) σε σχέση με τα πληθυσμιακά τροχιακά (διακεκομμένες γραμμές), όπως ορίζονται από τα 5 (κατώτερη διακεκομμένη γραμμή), 25, 50, 75, 95α (ανώτερη διακεκομμένη γραμμή) εκατοστημόρια (percentiles). **A**, περίπτωση τροχιακού που βρισκόταν στο 5ο εκατοστημόριο σε όλη τη διάρκεια της πάχυνσης. **B**, περίπτωση τροχιακού που βρισκόταν στο 95ο εκατοστημόριο σε όλη τη διάρκεια της πάχυνσης. **C**, περίπτωση τροχιακού που βρισκόταν στο 5ο εκατοστημόριο κατά την έναρξη της πάχυνσης και ήταν στο 50ο εκατοστημόριο κατά την λήξη της πάχυνσης. **D**, περίπτωση τροχιακού που βρισκόταν στο 50ο εκατοστημόριο κατά την έναρξη της πάχυνσης και ήταν στο 95ο εκατοστημόριο κατά τη λήξη της πάχυνσης. **E**, περίπτωση τροχιακού που βρισκόταν στο 50ο εκατοστημόριο κατά την έναρξη της πάχυνσης και ήταν στο 5ο εκατοστημόριο κατά τη λήξη της πάχυνσης. **F**, περίπτωση τροχιακού που βρισκόταν στο 95ο εκατοστημόριο κατά την έναρξη της πάχυνσης και ήταν στο 50ο εκατοστημόριο κατά τη λήξη της πάχυνσης. SL, τυπικό μήκος.

2.4. Συζήτηση

Στο παρόν κεφάλαιο εξετάστηκε η οντογένεση του σχήματος του σώματος της τσιπούρας από το στάδιο του ιχθυδίου (86 ± 7 mm SL) μέχρι το εμπορεύσιμο μέγεθος (262 ± 14 mm SL), σε μια προσπάθεια να χρησιμοποιηθεί η μορφολογία των ιχθυδίων ως δείκτης πρόβλεψης για το φαινότυπο του τελικού προϊόντος. Η μελέτη έγινε τόσο σε πληθυσμιακό όσο και σε ατομικό επίπεδο.

Οι μεγάλες οντογενετικές αλλαγές του σχήματος του σώματος της τσιπούρας φαίνεται να πραγματοποιούνται κατά την πρώιμη οντογενετική περίοδο. Στην εργασία των Russo *et al.* (2007) μελετήθηκε η οντογένεση της τσιπούρας από το στάδιο της λεκιθοφόρου νύμφης ($3,8 \pm 0,1$ mm TL) μέχρι το ενήλικο άτομο ($221,5 \pm 9,8$ mm TL), με τις σημαντικές μορφολογικές αλλαγές να πραγματοποιούνται στα πρώιμα οντογενετικά στάδια, ενώ μετά το μέγεθος των 70 mm TL και μέχρι την ενηλικίωση το σχήμα του σώματος δεν παρουσιάζει σημαντικές μορφολογικές αλλαγές. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν ότι το σχήμα του σώματος των ιχθυδίων συνέχισε να παρουσιάζει αλλαγές κατά την περίοδο της πάχυνσης. Παρατηρήθηκε μία έντονη αλλομετρική διαφοροποίηση κατά την αρχική περίοδο της πάχυνσης, ενώ μετά τα 202 mm SL το σχήμα του σώματος έφτασε στον τελικό του φαινότυπο (Εικόνα 2.7A). Αλλαγές στο σχήμα του σώματος ωστόσο παρατήρησαν και οι Fragkoulis *et al.* (2017a) όταν πληθυσμός τσιπούρας μοιράστηκε σε δύο διαφορετικά περιβάλλοντα για την περίοδο της πάχυνσης, αφού είχε προηγηθεί η νυμφική εκτροφή του σε κοινό περιβάλλον. Οι έντονες μορφολογικές διαφορές που παρατήρησαν αφορούσαν άτομα που είχαν φτάσει στο στάδιο της ενηλικίωσης (210 mm SL), ενισχύοντας την άποψη ότι το σχήμα του σώματος συνεχίζει να αλλάζει και μετά την μεταμόρφωση. Ενδέχεται το πλατό που παρατήρησαν οι Russo *et al.* (2007), να οφείλονταν στο γεγονός ότι περιλάμβαναν στα αποτελέσματά τους τα πρώιμα οντογενετικά στάδια. Φαίνεται ότι οι έντονες μορφολογικές αλλαγές που συμβαίνουν σε αυτά τα στάδια, επηρέασαν τις αναλύσεις της γεωμετρικής μορφομετρίας, γεγονός που δεν ανέδειξε τις οντογενετικές αλλαγές που συμβαίνουν από το στάδιο του ιχθυδίου και ύστερα. Επιπλέον οι Russo *et al.* (2007) μελέτησαν το μέσο πληθυσμιακό σχήμα, χρησιμοποιώντας δείγματα που προέρχονταν από διαφορετικά άτομα, ενώ ο μικρός αριθμός ατόμων (από 15 μέχρι 50 άτομα ανά δείγμα) πιθανόν να μην ήταν αρκετός για την παρατήρηση των οντογενετικών αλλαγών από το στάδιο του ιχθυδίου και μέχρι την ενηλικίωση. Αντιθέτως στην παρούσα εργασία το δείγμα ήταν αρκετά μεγαλύτερο (959 άτομα σε

πέντε συνεχόμενες δειγματοληψίες), ενώ η ηλεκτρονική σήμανση επέτρεψε την παρακολούθηση των ίδιων ατόμων σε όλη τη διάρκεια της πάχυνσης.

Η μέθοδος της ηλεκτρονικής σήμανσης επέτρεψε και την παρακολούθηση του σχήματος του σώματος σε ατομικό επίπεδο κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει ότι υπάρχει ένα προκαθορισμένο ατομικό πρότυπο αύξησης, το οποίο συμφωνεί με το μέσο πληθυσμιακό τροχιακό (Εικόνα 2.13 Α,Β,Η,Ι). Ωστόσο από την μελέτη των παραμέτρων των αλλομετρικών τροχιακών παρατηρήθηκαν και περιπτώσεις όπου το πρότυπο αλλομετρικής αύξησης διέφερε σημαντικά από το πληθυσμιακό πρότυπο (Εικόνα 2.13 C - G). Σε άλλους οργανισμούς η εξατομικευμένη παρακολούθηση (μέσω ατομικών ή οικογενειακών τροχιακών) χρησιμοποιείται κυρίως για τη μελέτη της μέσης πληθυσμιακής διακύμανσης, χωρίς να δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στο ατομικό τροχιακό. Τέτοια περίπτωση είναι η εργασία των Bacon *et al.* (2004) στο σολομό του Ατλαντικού όπου μελετήθηκαν τα πρότυπα αύξησης σε άγρια ιχθύδια που είχαν ηλεκτρονικά σημειωθεί. Αλλά και σε άλλα είδη, όπως στη σαλαμάνδρα *Ambystoma macrodactylum* (Ragland and Carter 2004) η μελέτη των μορφομετρικών χαρακτηρισμών (όπως του μήκους του σώματος αλλά και του βάρους) έγινε σε πληθυσμιακό επίπεδο από απομονωμένες οικογένειες. Στον άνθρωπο, ενώ η παρακολούθηση της οντογένεσης του κρανίου έγινε σε ατομικό επίπεδο, η μελέτη αφορούσε το πληθυσμιακό επίπεδο (Bulygina *et al.* 2006). Στην οντογένεση του ανθρώπινου κρανίου, παρατηρήθηκε ένα κοινό αλλομετρικό πρότυπο που ακολουθείται από όλα τα άτομα ανεξαρτήτως φύλου, το οποίο όμως διαμορφώνεται μετά τα τρία χρόνια ζωής των ατόμων. Μέχρι τον τρίτο χρόνο ζωής, κάθε άτομο παρουσιάζει διαφορετικό αλλομετρικό τροχιακό. Στην παρούσα εργασία η ποσοτικοποίηση των αλλομετρικών παραμέτρων έδειξε ότι ενώ υπάρχει ένα γενικό πληθυσμιακό πρότυπο, υπήρξαν και περιπτώσεις όπου αυτό το πρότυπο δεν ακολουθήθηκε. Κατά την περίοδο της πάχυνσης, παρατηρήθηκαν άτομα που είχαν διαφορετικό μήκος τροχιακού, γεγονός που συμφωνεί με τους Bulygina *et al.* (2006). Είναι η πρώτη φορά που παρατηρούνται διαφορετικά αλλομετρικά τροχιακά πρότυπα σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς τσιπούρας. Πιθανόν τα διαφορετικά αλλομετρικά πρότυπα να σχετίζονται με γενετικές παραμέτρους.

Για τη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια το σχήμα του σώματος των ψαριών αποτελεί σημαντικό χαρακτήρα ποιότητας. Η πρόβλεψη του φαινοτύπου του τελικού προϊόντος από το στάδιο του ιχθυδίου θα επιτρέψει την βελτιστοποίηση των εκτρεφόμενων

συνθηκών με το χαμηλότερο δυνατό κόστος. Στην παρούσα μελέτη τα δύο στάδια δεν παρουσίασαν υψηλές συσχετίσεις, υποδεικνύοντας ότι διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Παρόμοια αποτελέσματα παρατήρησαν και οι Bulygina *et al.* (2006), όταν μελέτησαν την οντογένεση του κρανίου στον άνθρωπο. Αυτό που παρατήρησαν ήταν χαμηλές συσχετίσεις του φαινότυπο των νεογνών (από ένα μήνα μέχρι τρία χρόνια ζωής) με τον ενήλικο φαινότυπο (21 χρόνια ζωής), συμπεραίνοντας ότι μέχρι την ηλικία των τριών ετών, ο άνθρωπος έχει διαφορετικά ατομικά τροχιακά, ενώ ύστερα η κατεύθυνση της ανάπτυξης γίνεται κοινή, παρόλο που τα τροχιακά έχουν διαφορετικό μήκος. Ακολουθώντας τα συμπεράσματα των Bulygina *et al.* (2006), οι χαμηλές συσχετίσεις μεταξύ των δύο σταδίων, αλλά και η ύπαρξη διαφορετικών αλλομετρικών προτύπων που παρατηρήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή (Εικόνα 2.5 και 2.13), επιβεβαιώνουν την ύπαρξη έντονης αλλομετρικής διαφοροποίησης και σε ενδοπληθυσμιακό επίπεδο. Φαίνεται ότι η φαινοτυπική τιμή του σχήματος του σώματος του ιχθυδίου δεν μπορεί να προβλέψει τον τελικό φαινότυπο. Μέσω πολυπαραγοντικών προσεγγίσεων (RWA, PD) η πιο πρόωμη πρόβλεψη του τελικού φαινοτύπου μπορεί να γίνει μεταξύ 190 και 200 mm SL, καθώς τότε το σχήμα του σώματος φτάνει στον τελικό φαινότυπο (Εικόνα 2.6 και 2.7A).

Το σχήμα του σώματος αποτελεί σημαντικό κριτήριο ποιότητας και για τον καταναλωτή. Οι Fragkoulis *et al.* (2017a) έδειξαν ότι αυτός ο χαρακτήρας σχετίζεται με τις καταναλωτικές προτιμήσεις. Παρατήρησαν ότι οι κύριες διαφορές μεταξύ των εξαιρετικών και μέτριων ψαριών, σχετίζονται με το ύψος του σώματος. Τόσο οι καταναλωτές υψηλής όσο και χαμηλής διακριτικής ικανότητας, διέκριναν τα ψάρια με βάση αυτήν την περιοχή του σώματος. Μάλιστα τα ψάρια με εξαιρετική μορφολογία είχαν πιο υδροδυναμικό σχήμα (μικρό ύψος σώματος), ενώ τα ψάρια με μέτρια μορφολογία είχαν πιο μεγάλο ύψος σώματος. Παρόλο όμως που η συγκεκριμένη ανάλυση έκανε απλή διάκριση μεταξύ των δύο ομάδων, έδειξε ότι ο καταναλωτής έχει συγκεκριμένα μορφολογικά κριτήρια ποιότητας για τα ψάρια. Στην παρούσα μελέτη το ύψος του σώματος έδειξε να αλλάζει κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Στην RW2 το ύψος μεταξύ των σταδίων του ιχθυδίου και του ενήλικου παρουσίασε σημαντικές διαφορές κατά τη διάρκεια της πάχυνσης. Δεδομένου ότι η RW1 εξηγούσε το οντογενετικό κομμάτι της RWA, η RW2 ερμήνευσε μια διακύμανση του σχήματος που δεν έχει οντογενετικό χαρακτήρα αλλά αποτελούν μόνο μορφολογικές αλλαγές του σχήματος (Εικόνα 2.7). Φαίνεται ότι η RW2 ταυτίζεται πλήρως με τις καταναλωτικές προτιμήσεις.

Η ανάπτυξη μιας γρήγορης μεθόδου για τον υπολογισμό ενός σημαντικού χαρακτήρα, όπως είναι το ύψος του σώματος, είναι μια διαδικασία σημαντική για την βιομηχανία της ιχθυοκαλλιέργειας. Στην οντογένεση της συναγρίδας, οι Koumoundouros *et al.* (1999) παρατήρησαν διαφορετικά αλλομετρικά πρότυπα, ανάλογα με τον μορφομετρικό χαρακτήρα που εξέταζαν. Στο σαργό (*Diplodus sargus*), οι Nikolioudakis *et al.* (2010) με τη χρήση πολυπαραγοντικών και μορφομετρικών αναλύσεων, θέλησαν να προσδιορίσουν το μέγεθος στο οποίο ολοκληρώνεται η μεταμόρφωση του είδους. Αυτό που παρατήρησαν ήταν ότι κάθε μορφομετρικός χαρακτήρας παρουσίαζε διαφορετικό αλλομετρικό πρότυπο, καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι η χρήση ενός μόνο μορφομετρικού χαρακτήρα δεν μπορεί να προσδιορίσει την μετάβαση των ψαριών από το νυμφικό στάδιο στο στάδιο του ιχθυδίου. Στην παρούσα εργασία, το ύψος του σώματος εκτιμήθηκε ξεχωριστά, μέσω του μορφομετρικού δείκτη BDR. Η μελέτη αυτού του χαρακτήρα έδειξε ένα ξεκάθαρο αλλομετρικό σημείο καμπής μεταξύ της πρώτης και δεύτερης δειγματοληψίας (100 - 120 mm SL, Εικόνα 2.11). Το σημείο καμπής είναι σημαντικά χαμηλότερο από το σημείο καμπής που παρατηρήθηκε τόσο στην RW1 (202 mm SL, Εικόνα 2.7A), όσο και στην PD ανάλυση (192,7 mm SL, Εικόνα 2.6). Οι διαφορές που παρατηρήθηκαν όσον αφορά τα σημεία καμπής συμφωνούν με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Ενώ ο BDR είναι δείκτης που υπολογίζεται από δύο μορφομετρικούς χαρακτήρες (τυπικό μήκος και ύψος σώματος), η γεωμετρική μορφομετρία είναι ανάλυση επί των καρτεσιανών συντεταγμένων (X,Y). Τόσο στην ανάλυση κύριων συνιστωσών (RWA), όσο και στην ανάλυση Προκρούστειων Αποστάσεων (που προκύπτει επί των μεταβλητών της RWA), η μελέτη του σχήματος του σώματος έγινε επί των μεταβλητών που προέκυψαν από τα μορφομετρικά ορόσημα που περιγράφουν ολόκληρο το σχήμα του σώματος, καθιστώντας την πιο κατάλληλη μέθοδο, για την περιγραφή της συνολικής διακύμανσης του σχήματος του σώματος, σε σχέση με την ανάλυση αποστάσεων.

Όλα τα παραπάνω ανέδειξαν τη σημασία της οντογένεσης του σχήματος του σώματος και μετά το στάδιο της μεταμόρφωσης. Η περίοδος της πάχυνσης είναι μια ιδιαίτερα κρίσιμη περίοδος για την ανάπτυξη των ιχθύων, γεγονός που μέχρι σήμερα δεν ήταν γνωστό ή παραλείπονταν. Ακόμα και στην περίπτωση των σκελετικών παραμορφώσεων, σοβαρές αλλοιώσεις του εξωτερικού φαινοτύπου έχουν τη δυνατότητα να επιδιορθωθούν και στο τέλος της πάχυνσης να μην διαφέρουν από τα φυσιολογικά (Κεφάλαιο 3). Στην περίπτωση των ιχθύων με φυσιολογική εξωτερική

μορφολογία, το σχήμα του σώματος των ιχθυδίων δεν δύναται να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ποιότητας του τελικού προϊόντος. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι ο τελικός φαινότυπος των ψαριών μπορεί να προβλεφθεί από τα 202 mm SL. Στο μέλλον θα ήταν δυνατό να συσχετιστούν οι αλλαγές του σχήματος του σώματος με σημαντικές βιολογικές λειτουργίες, όπως είναι η αναπαραγωγική ωρίμανση και η αναστροφή του φύλου. Μέχρι σήμερα έχει καταγραφεί ένα εύρος μεγεθών (17,6 - 32,6 cm TL), όπου ξεκινά η αναπαραγωγική ωρίμανση του είδους (Chaoui *et al.* 2006, Emre *et al.* 2009, Taieb *et al.* 2013), ενώ οι Suau and Lopez (1976) παρατήρησαν αναστροφή φύλου σε πληθυσμό τσιπούρας στα 22 cm TL. Η πραγματοποίηση ιστολογικής μελέτης επί των γονάδων κατά την περίοδο όπου το σχήμα του σώματος σταθεροποιείται θα μπορούσε να δείξει αν η σταθερότητα σχετίζεται με την αναστροφή του φύλου. Τέλος η ύπαρξη ατομικών αλλομετρικών τροχιακών θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα χρήσιμο εργαλείο τόσο για τα προγράμματα γενετικής βελτίωσης, όσο και για τη μελέτη της αρχιτεκτονικής του σχήματος του σώματος. Στο παρελθόν έχει αποδειχθεί ότι το περιβάλλον πρώιμης ανάπτυξης έχει σημαντική επίδραση στον τελικό φαινότυπο του σχήματος του σώματος (Georga and Koumoundouros 2010, Loizides *et al.* 2014a). Χρησιμοποιώντας οργανισμούς μοντέλα σαν το zebrafish, θα μπορούσε να μελετηθεί η επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων στα αλλομετρικά τροχιακά (π.χ. θερμοκρασία, διατροφή, κ.α.), με απώτερο στόχο τόσο την ποσοτικοποίηση των διαφορών, όσο και το πότε θα σταθεροποιηθεί ο τελικός φαινότυπος.

Κεφάλαιο 3^ο

Εξέλιξη της αιματικής λόρδωσης²

²Μέρος του παρόντος κεφαλαίου έχει δημοσιευθεί στην εργασία:

Fragkoulis S., Printzi A., Geladakis G., Katribouzas N. & Koumoundouros G. (2019) Recovery of haemal lordosis in Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Scientific Reports*, 9, 9832

3.1. Εισαγωγή

Η παρουσία των σκελετικών παραμορφώσεων στους εκτρεφόμενους ιχθύες αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα για την ποιότητα του προϊόντος, με αντίκτυπο στην εξωτερική μορφολογία των ψαριών αλλά και στη βιολογική τους απόδοση (ανασκόπηση από Boglione *et al.* 2013). Στα περισσότερα είδη οι σκελετικές παραμορφώσεις αναπτύσσονται κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (εμβρυϊκό, νυμφικό και πρώιμο στάδιο ιχθυδίου) (Boglione *et al.* 2009, Loizides *et al.* 2014b, de Azevedo *et al.* 2017, Fragkoulis *et al.* 2017b, Thuong *et al.* 2017), ενώ η ανάπτυξη τους οφείλεται στις μη βέλτιστες συνθήκες εκτροφής (Fernández *et al.* 2008, Georgakopoulou *et al.* 2010, Izquierdo *et al.* 2010, Georga *et al.* 2011, Cobcroft *et al.* 2012), στους γενετικούς παράγοντες (Bardon *et al.* 2009, Negrín-Báez *et al.* 2015, Fragkoulis *et al.* 2018, 2020) αλλά και στους ανθρώπινους χειρισμούς (Carmichael and Tomasso 1984). Η υπάρχουσα βιβλιογραφία αναφέρει ότι κατά την ανάπτυξη των ιχθύων μπορεί να υπάρξει μείωση στη συχνότητα εμφάνισης των σκελετικών παραμορφώσεων, ως αποτέλεσμα της υψηλής θνησιμότητας που μπορεί να έχουν συγκεκριμένοι τύποι παραμορφώσεων (προαιματική κύφωση, Koumoundouros *et al.* 2002, παραμορφώσεις βραγχιακού επικαλύμματος, Georgakopoulou *et al.* 2010, συμπίεση και σύντηξη αιματικών σπονδύλων, Loizides *et al.* 2014b). Μέχρι σήμερα η ανάκαμψη των σκελετικών παραμορφώσεων έχει καταγραφεί σε παραμορφώσεις του βραγχιακού επικαλύμματος ελαφριάς έντασης, τόσο στην τσιπούρα (Beraldo and Canavese 2011), όσο και στο σολομό (Amoroso *et al.* 2016). Δεν υπάρχουν στοιχεία που να δείχνουν επιδιόρθωση παραμορφώσεων της σπονδυλικής στήλης στους τελεόστεους ιχθύες.

Η λόρδωση της σπονδυλικής στήλης αποτελεί μια συχνή παραμόρφωση στους εκτρεφόμενους ιχθύες. Ανάλογα με την ένταση της παραμόρφωσης, η λόρδωση μπορεί να προκαλέσει από μικρές και ασήμαντες μορφολογικές αλλαγές μέχρι σοβαρές αλλοιώσεις του σχήματος του σώματος (Sfakianakis *et al.* 2006a). Στους φυσόκλειστους ιχθύες, η λόρδωση πρωτο-αναφέρθηκε στους προ-αιματικούς σπονδύλους και οφείλονταν στη μη πλήρωση της νηκτικής κύστης με αέρα κατά τα πρώιμα στάδια ανάπτυξης της (Kitajima *et al.* 1981, Chatain 1994). Σε εκτρεφόμενα είδη, όπως το ευρωπαϊκό λαβράκι και το ιαπωνικό φαγκρί (*Pagrus major*), δείχθηκε ότι η λόρδωση μπορεί να εμφανιστεί και σε ψάρια με φυσιολογική νηκτική κύστη, στην αιματική περιοχή της σπονδυλικής στήλης, ως αποτέλεσμα της έντονης κολυμβητικής

δραστηριότητας (Divanach *et al.* 1997, Kihara *et al.* 2002). Μέχρι σήμερα, η προαιματική λόρδωση δεν αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για την ιχθυοκαλλιέργεια, καθώς εφαρμόζονται κατάλληλες τεχνικές (απομάκρυνση του ελαιώδους φιλμ που σχηματίζεται στην επιφάνεια του νερού), επιτρέποντας στις νύμφες να πάρουν την απαραίτητη φυσαλίδα αέρα και να έχουν φυσιολογική νηκτική κύστη (ανασκόπηση από Boglione *et al.* 2013). Όσον αφορά στην αιματική λόρδωση, προτείνεται περιορισμός της έντασης της κολυμβητικής δραστηριότητας των νεαρών ιχθυδίων. Αυτό λύνει μερικώς το πρόβλημα, καθώς και άλλοι παράγοντες έχει δειχθεί να ενοχοποιούνται για την εμφάνιση (θερμοκρασία ανάπτυξης, Sfakianakis *et al.* 2006b, Georgakopoulou *et al.* 2010, επίπεδα βιταμίνης A στη νυμφική διατροφή, Mazurais *et al.* 2009, γενετικό υπόβαθρο, Bardou *et al.* 2009).

Μέχρι σήμερα η αιματική λόρδωση είναι αντικείμενο μελέτης, τόσο για την εύρεση των γενεσιουργών παραγόντων της (Sfakianakis *et al.* 2006b, Koumoundouros 2010, Fjellidal *et al.* 2012, Boglione *et al.* 2013) όσο και για την ποσοτικοποίηση της έντασης της, με βάση την εσωτερική ανατομία (Sfakianakis *et al.* 2006a). Ωστόσο κρίνεται αναγκαία η ποσοτικοποίηση της αιματικής λόρδωσης, όχι με βάση την εσωτερική ανατομία της, αλλά με βάση το βαθμό που επηρεάζει την εξωτερική μορφολογία των ιχθύων, δεδομένου ότι πρόκειται για έναν χαρακτήρα που αξιολογείται σημαντικά από τον καταναλωτή για την εκτίμηση της ποιότητας του τελικού προϊόντος.

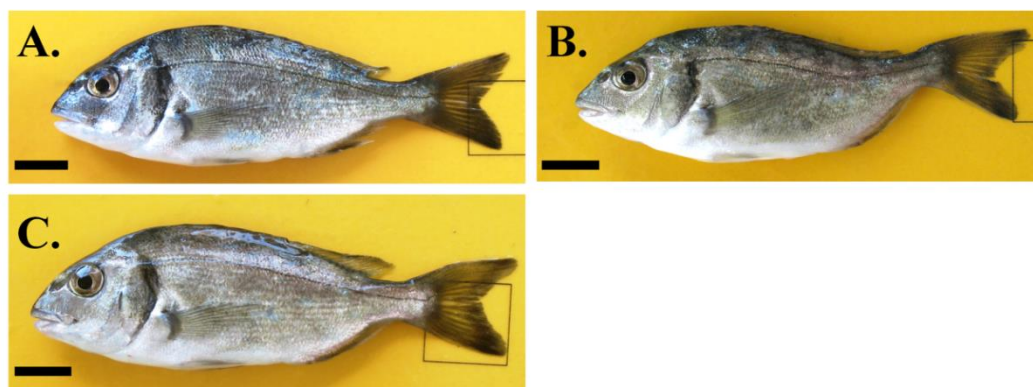
Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε η ανάπτυξη της αιματικής λόρδωσης σε όλη την περίοδο της πάχυνσης. Στόχος ήταν η μελέτη της εξέλιξης της στην πορεία του χρόνου και της επίδρασης που είχε στο σχήμα του σώματος. Η μέθοδος της ηλεκτρονικής σήμανσης επέτρεψε την παρακολούθηση των σκελετικών παραμορφώσεων τόσο σε ατομικό όσο και σε πληθυσμιακό επίπεδο. Με τη μέθοδο αυτήν εξετάστηκαν οι διαφορές που παρατηρήθηκαν μεταξύ παραμορφωμένων και φυσιολογικών ατόμων, τόσο στην έναρξη όσο και στην λήξη της περιόδου πάχυνσης, χρησιμοποιώντας τη γεωμετρική μορφομετρία. Επιπλέον η ακτινογραφική εξέταση ατόμων με συγκεκριμένα εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά, επέτρεψε τη σχέση της εξωτερικής μορφολογίας με την εσωτερική ανατομία. Τέλος για να εξεταστεί η επίδραση της εξέλιξης της αιματικής λόρδωσης στο ρυθμό σωματικής αύξησης κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης, χρησιμοποιήθηκαν μορφομετρικοί δείκτες, προκειμένου να συγκριθούν οι διαφορές μεταξύ φυσιολογικών και παραμορφωμένων ατόμων.

3.2. Υλικά και μέθοδοι

3.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

Η μελέτη της εξέλιξης της αιματικής λórδωσης πραγματοποιήθηκε μέσω της παρακολούθησης της εξωτερικής μορφολογίας 1700 ατόμων τσιπούρας από το μέσο βάρος των 6,1 ($\pm 1,9$) γραμμαρίων και μέχρι το μέσο βάρος των 513 (± 76) γραμμαρίων. Η παρακολούθηση πραγματοποιήθηκε σε πέντε σημεία σωματικής αύξησης, 86, 142, 201, 240 και 262 mm SL (Πίνακας 2.1, σελίδα 22). Αναλυτικά στοιχεία για τη μέθοδο εκτροφής και την ηλικία των δειγμάτων περιγράφονται στο δεύτερο κεφάλαιο (§2.2.1, σελίδα 22). Σε κάθε δειγματοληψία τα ψάρια αναισθητοποιούνταν, φωτογραφίζονταν ατομικά και σαρώνονταν για αναγνώριση της ηλεκτρονικής μάρκας. Σε όλες τις δειγματοληψίες καταγράφονταν ο αριθμός των νεκρών ψαριών. Προκειμένου να ελεγχθεί κατά πόσο η διαφορά στη θνησιμότητα μεταξύ των φυσιολογικών και λορδωτικών ψαριών ήταν στατιστικά σημαντική, έγινε χρήση του G-test.

Ο έλεγχος της εξωτερικής μορφολογίας πραγματοποιούνταν ανεξάρτητα για κάθε δειγματοληψία πριν γίνει η ταυτοποίηση των ψαριών με τον αριθμό της ηλεκτρονικής μάρκας. Ο διαχωρισμός των ατόμων με λορδωτική εξωτερική μορφολογία από τα άτομα με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία έγινε με βάση τη ραχιαία μετατόπιση του ουραίου μίσχου (Εικόνα 3.1). Ιχθύες που δεν είχαν την τυπική φυσιολογική ή λορδωτική εξωτερική μορφολογία χαρακτηρίζονταν ως άτομα με αβέβαιο φαινότυπο (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις ιχθυδίων τσιπούρας κατά την ηλεκτρονική σήμανση (1 dpt) με φυσιολογική (A), λορδωτική (B) και αβέβαιη (C) εξωτερική μορφολογία. Η διάκριση στηρίχθηκε στη ραχιαία μετατόπιση του ουραίου μίσχου στα παραμορφωμένα ψάρια (B). Οι κλίμακες ισούται με 1 cm.

Κατά την αρχική σήμανση του πειραματικού πληθυσμού, συλλέχθηκε επιπλέον δείγμα εκατό ιχθυδίων, προκειμένου να γίνει επιβεβαίωση της μεθοδολογίας που

χρησιμοποιήθηκε για την κατηγοριοποίηση της εξωτερικής μορφολογίας. Τα 100 ιχθύδια αναισθητοποιήθηκαν, φωτογραφήθηκαν και συντηρήθηκαν στους -20°C . Βάση της εξωτερικής τους μορφολογίας τα 100 άτομα κατηγοριοποιήθηκαν σε ιχθύδια με φυσιολογική, λорδωτική ή αβέβαιη εξωτερική μορφολογία (Εικόνα 3.1). Ακολούθως υποβλήθηκαν σε ακτινογραφική εξέταση (Koumoundouros *et al.* 2000b). Στη συνέχεια τα αποτελέσματα της φαινοτυπικής κατηγοριοποίησης συγκρίθηκαν με εκείνα της ακτινογραφικής απεικόνισης των ιχθυδίων.

Ομοίως, δείγμα 146 ψαριών λήφθηκε κατά το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (434 dpt) προκειμένου να εξεταστεί η εσωτερική τους ανατομία. Τα άτομα που επιλέχθηκαν για ακτινογράφιση, ήταν αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις ατόμων με διαφορετική εξωτερική μορφολογία. Τα 146 άτομα αφού φωτογραφήθηκαν στη συνέχεια ακτινογραφήθηκαν προκειμένου να γίνει ταυτοποίηση της εξωτερικής μορφολογίας με την εσωτερική απεικόνιση της σπονδυλικής στήλης. Όλα τα άτομα που επιλέχθηκαν για ακτινογραφική εξέταση, θανατώθηκαν με υψηλή δόση αναισθητικού. Οι ακτινογραφίες πραγματοποιήθηκαν σε τάση 50KV, ένταση 400mA και χρόνος έκθεσης 0,002 δευτερόλεπτα (Econet medical PpP-60HF, AGFA CR10).

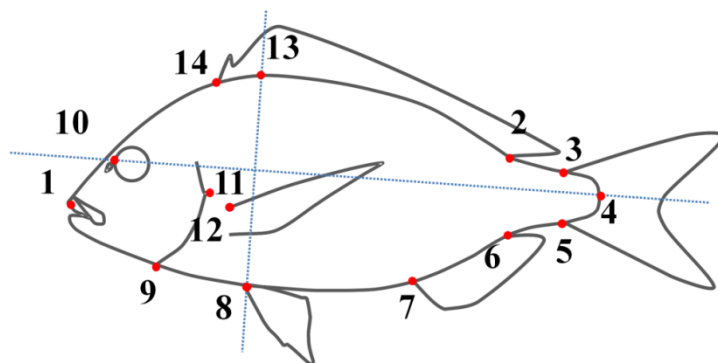
3.2.2. Μορφομετρική ανάλυση

Για την μελέτη της επίδρασης της αιματικής λорδωσης στο σχήμα του σώματος χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της γεωμετρικής μορφομετρίας. Η μελέτη έγινε τόσο στο στάδιο των ιχθυδίων (1 dpt) όσο και στο στάδιο των ενηλίκων ψαριών (434 dpt). Η ανάλυση των ιχθυδίων περιλάμβανε 174 άτομα με λорδωτική και αβέβαιη εξωτερική μορφολογία (Πίνακας 3.2), καθώς και τυχαίο δείγμα 150 ατόμων με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία. Η ανάλυση των ενηλίκων ιχθύων περιλάμβανε 71 λорδωτικά άτομα, 17 άτομα με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία και 50 άτομα με φυσιολογική μορφολογία (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2. Αριθμός των ενηλίκων ιχθύων που ακτινογραφήθηκαν. Αντιπροσωπευτικός αριθμός ιχθύων επιλέχθηκε τυχαία από κάθε ομάδα, προκειμένου να μελετηθούν οι αλλαγές της εξωτερικής μορφολογίας από την έναρξη (1 dpt) μέχρι και το τέλος της πειραματικής περιόδου (434 dpt). N, ψάρια με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία. Un, ψάρια με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία. L, ψάρια με λорδωτική εξωτερική μορφολογία. dpt, days post-tagging, μέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.

Τελική εξ. μορφολογία (434 dpt)	Αρχική εξ. μορφολογία (1 dpt)	Ολικός αριθμός	Αριθμός ακτινογραφημένων ιχθύων	Ποσοστό (%) ψαριών που ακτινογραφήθηκαν
	N	1199	25	2
N	Un	25	13	52
	L	61	41	67
	N	3	-	-
Un	Un	4	2	50
	L	13	11	85
	N	0	-	-
L	Un	5	5	100
	L	66	49	74

Τέλος πραγματοποιήθηκε μια επιπλέον γεωμετρική μορφομετρική ανάλυση προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσο η επιδιόρθωση της αιματικής λόρδωσης μπορεί να προβλεφθεί από το στάδιο του ιχθυδίου (1 dpt). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα ιχθύδια που διατήρησαν την λорδωτική τους εξωτερική μορφολογία μέχρι το τέλος της πάχυνσης (sevL, severely lordotic) και τα λорδωτικά ιχθύδια που παρουσίασαν βελτιωμένη φυσιολογική εξωτερική μορφολογία. Επιπλέον συμπεριλήφθηκαν 33 τυχαία φυσιολογικά ιχθύδια ως ομάδα ελέγχου.



Εικόνα 3.3. Θέση των δεκατεσσάρων μορφομετρικών σημείων (landmarks). Στα σημεία της εικόνας 2.2 προστέθηκε το ορόσημο 14 (πρόσθιο άκρο του ραχιαίου πτερυγίου).

Σε όλες τις αναλύσεις τοποθετήθηκαν 14 μορφομετρικά ορόσημα (landmarks) στις ψηφιακές φωτογραφίες των ατόμων, με τη βοήθεια του λογισμικού tpsDig2 (Rohlf 2010a, version 2.17, Εικόνα 3.3). Τα δεκατέσσερα ορόσημα τοποθετήθηκαν σε συγκεκριμένες ανατομικές περιοχές. Για τη μέση διαμόρφωση του σχήματος αλλά και για τον προσδιορισμό του κεντροειδούς μεγέθους (Centroid Size, CS), χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό πρόγραμμα IMP (CoordGen6d, Rohlf and Slice, 1990). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό IMP-Standard6 (Sheets, 2001), προκειμένου να αφαιρεθεί κάθε επίδραση του μεγέθους και της αλλομετρίας. Για τον υπολογισμό του πίνακα βαρύτητας (weight matrix) εφαρμόστηκε ο αλγόριθμος thin plate spline στο σύνολο των μορφομετρικών σημείων του δείγματος (tpsRelw, έκδοση 1.53, Rohlf 2010b). Για τη μελέτη της επίδρασης της λόρδωσης στο σχήμα του σώματος έγινε ανάλυση κανονικών συνιστωσών (Canonical Variate Analysis, CVA). Τέλος για την οπτικοποίηση των διαφορών του σχήματος του σώματος μεταξύ των διαφορετικών ομάδων έγινε ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης των κανονικών συνιστωσών με τις μεταβλητές ανάλυσης κανονικών συνιστωσών (tpsRegr, έκδοση 1.40, Rohlf 2011), προκειμένου να εκτιμηθούν τα πλέγματα παραμόρφωσης (spline diagrams).

3.2.3. Σχέση της εσωτερικής γωνίας της αιματικής λόρδωσης με την γωνία που σχηματίζεται στην εξωτερική μορφολογία των ψαριών

Στόχος της παρούσας μελέτης ήταν ο προσδιορισμός δείκτη, ικανού να ποσοτικοποιήσει την επίδραση της αιματικής λόρδωσης στην εξωτερική μορφολογία. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκαν άτομα με γνωστή ακτινογραφική απεικόνιση της τελευταίας δειγματοληψίας (434 dpt, n=146). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν οι ψηφιακές φωτογραφίες της πρώτης δειγματοληψίας των ίδιων ατόμων, προκειμένου να ποσοτικοποιηθεί η εξέλιξη της αιματικής λόρδωσης. Στις ψηφιακές φωτογραφίες αυτών των ατόμων χρησιμοποιήθηκαν τα ορόσημα L4, L7, L10, ώστε να υπολογιστεί η γωνία που σχηματίζεται στη βάση του εδρικού πτερυγίου (Εικόνα 3.4A). Παράλληλα μετρήθηκε η γωνία της αιματικής λόρδωσης επί της σπονδυλικής στήλης στις ακτινογραφίες των ατόμων (Sfakianakis *et al.* 2006a). Ο προσδιορισμός της εσωτερικής γωνίας της αιματικής λόρδωσης, έγινε επί των παραμορφωμένων σπονδύλων, με τη γωνία στις ακτινογραφίες να υπολογίζεται στο κέντρο της παραμόρφωσης (Εικόνα 3.4B).



Εικόνα 3.4. Υπολογισμός της εξωτερικής γωνίας (A) και της εσωτερικής γωνίας (B) σε ενήλικες τσιπούρες. Στις ψηφιακές φωτογραφίες ο υπολογισμός της γωνίας βασίστηκε σε τρία μορφομετρικά ορόσημα, ενώ ο υπολογισμός στις ακτινογραφίες έγινε στην περιοχή της παραμόρφωσης, όπως περιγράφεται από τους Sfakianakis *et al.* (2006a).

Όλες οι εσωτερικές γωνίες υπολογίστηκαν με το λογισμικό tpsDig2 (Rohlf 2010a). Για τον υπολογισμό της εξωτερικής γωνίας, χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλες τριγωνομετρικές εξισώσεις επί των X και Y συντεταγμένων των τριών μορφομετρικών σημείων. Για τη μελέτη της επίδρασης της εσωτερικής γωνίας της λόρδωσης στην εξωτερική μορφολογία χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της γεωμετρικής μορφομετρίας. Για την οπτικοποίηση της μεταβολής του σχήματος του σώματος με τη μεταβολή των δύο υπό εξέταση γωνιών, χρησιμοποιήθηκε η πρώτη μεταβλητή σχετικών στρεβλώσεων (RW1), όπως αυτή υπολογίστηκε από το tpsRelw (έκδοση 1.53, Rohlf 2010b), κατά τον υπολογισμό του πίνακα σχετικών στρεβλώσεων (relative warp matrix). Η ανάλυση περιλάμβανε όλα τα 146 ενήλικα ψάρια που ακτινογραφήθηκαν, ανεξαρτήτως της εξωτερικής τους μορφολογίας (Πίνακας 3.2).

Για τον υπολογισμό του σημείου καμπής της σχέσης των υπό εξέταση παραγόντων (RW1, εσωτερική και εξωτερική γωνία της αιματικής λόρδωσης), εφαρμόστηκε ειδική μορφή γραμμικής παλινδρόμησης (κατά τμήματα γραμμική παλινδρόμηση, piecewise linear regression):

$$Y=b_0+b_1*R_0+b_2*(R_0 - R)*(R_0 \geq R),$$

όπου Y είναι η εξεταζόμενη μεταβλητή, b_0 είναι το σημείο τομής με τον y-άξονα, b_1 η κλίση της ευθείας Y- R_0 κατά το πρώτο κομμάτι της ευθείας, b_2 είναι η αλλαγή κλίσης

που οδηγεί στο δεύτερο κομμάτι της σχέσης $Y-R_0$ και R είναι η γωνία στο σημείο καμπής (Nikolioudakis *et al.* 2010).

Η γραμμική παλινδρόμηση χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί το σημείο καμπής της σχέσης:

- α) της εσωτερικής γωνίας της αιματικής λόρδωσης και της RW1.
- β) της εσωτερικής και εξωτερικής γωνίας της αιματικής λόρδωσης για την τελευταία δειγματοληψία (434 dpt).
- γ) της εξωτερικής γωνίας μεταξύ της πρώτης (1 dpt) και τελευταίας δειγματοληψίας (434 dpt).

3.2.4. Σχέση της αιματικής λόρδωσης με το ρυθμό σωματικής αύξησης

Για να ελεγχθεί η συσχέτιση της αιματικής λόρδωσης με το ρυθμό σωματικής αύξησης κατά τη διάρκεια της πάχυνσης, συγκρίθηκε το μέσο τυπικό μήκος (SL) μεταξύ των ατόμων με διαφορετική εξωτερική μορφολογία. Επειδή η αιματική λόρδωση επιδρά σημαντικά στο τυπικό μήκος των ψαριών (βράχυνση του σώματος, Sfakianakis *et al.* 2006b), χρησιμοποιήθηκαν επιπλέον δεδομένα για τη μελέτη του ρυθμού σωματικής αύξησης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το μήκος της κεφαλής (Head length, HL), το ύψος του σώματος (Body depth, BD) και το βάρος (weight) των ψαριών, ως χαρακτήρες που δεν επηρεάζονται από την αιματική λόρδωση. Το μήκος της κεφαλής ορίστηκε ως η απόσταση μεταξύ των οροσήμων L1 και L11 (Εικόνα 3.3), ενώ το ύψος του σώματος ορίστηκε ως η απόσταση μεταξύ των οροσήμων L8 και L13 (Εικόνα 3.3).

Επιπλέον υπολογίστηκε και ο δείκτης σχετικού βάρους (relative weight factor) για το μήκος της κεφαλής, το τυπικό μήκος και το ύψος του σώματος με το βάρος των ψαριών. Για τον υπολογισμό αυτού του δείκτη χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση:

$$K = \frac{W_i}{W_s} \cdot 100$$

όπου W_i είναι το πραγματικό βάρος του ψαριού, W_s είναι το αναμενόμενο (για το μήκος του ψαριού) βάρος (Blackwell *et al.* 2000). Για τον υπολογισμό του αναμενόμενου βάρους, χρησιμοποιήθηκε η παρακάτω σχέση:

$$W_i = \alpha \cdot X^b$$

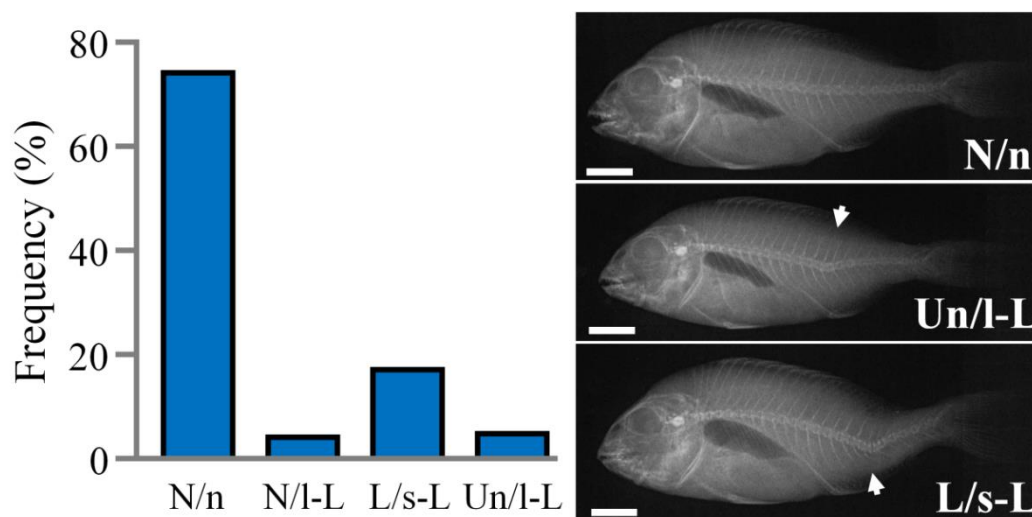
όπου W_i είναι το πραγματικό βάρος του ψαριού σε γραμμάρια, X είναι ο εκάστοτε μορφομετρικός δείκτης (SL, HL, BD) του ψαριού σε χιλιοστά, "α" και "b" οι σταθερές της σχέσης $X-W_i$, όπως αυτές εκτιμήθηκαν μετά από ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης. Η εξίσωση εφαρμόστηκε επί των παρατηρούμενων τιμών, προκειμένου να υπολογιστούν οι παράμετροι α και b.

Για τις παραπάνω αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν 979 άτομα που ήταν φυσιολογικά σε όλη τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης, 66 άτομα που ήταν λορδωτικά σε όλη τη διάρκεια της πάχυνσης και 60 άτομα που στο τέλος της περιόδου είχαν βελτιωμένη εξωτερική μορφολογία. Για να ελεγχθούν αν οι διαφορές που παρατηρούνται είναι στατιστικά σημαντικές, πραγματοποιήθηκε ANOVA και *a posteriori* Bonferroni test. Όλοι οι έλεγχοι έγιναν σε επίπεδο σημαντικότητας $p < 0,05$.

3.3. Αποτελέσματα

3.3.1. Φαινοτυπική κατηγοριοποίηση της εξωτερικής μορφολογίας

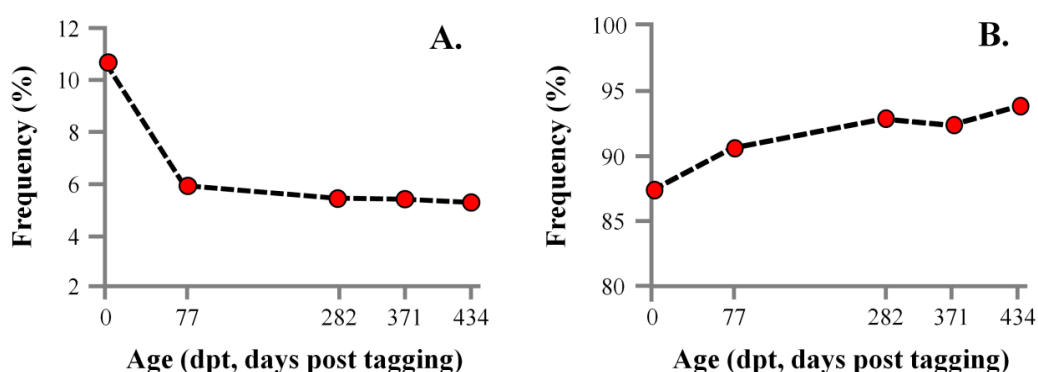
Από τα εκατό ιχθύδια του δείγματος ελέγχου που λήφθηκε κατά την έναρξη του πειράματος (1 dpt), τα 78 είχαν φυσιολογική εξωτερική μορφολογία (N). Από τα υπόλοιπα είκοσι δύο άτομα, 17 ιχθύδια ήταν λορδωτικά (L) ενώ πέντε άτομα ήταν αβέβαια ως προς την εξωτερική τους μορφολογία (Un) (Εικόνα 3.5). Η ακτινογραφική εξέταση του ίδιου δείγματος έδειξε ότι από τα 78 άτομα που είχαν φυσιολογική εξωτερική μορφολογία, τα 74 είχαν απόλυτα φυσιολογική σπονδυλική στήλη (N/n, Εικόνα 3.5), ενώ τα εναπομείναντα τέσσερα άτομα έφεραν λόρδωση ελαφριάς έντασης (N/l-L, Εικόνα 3.5). Όλα τα άτομα που είχαν λορδωτική εξωτερική μορφολογία (L) έφεραν στο εσωτερικό τους αιματική λόρδωση σοβαρής έντασης (L/s-L, Εικόνα 3.5). Όσον αφορά τα ιχθύδια με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία, αυτά έφεραν αιματική λόρδωση ελαφριάς έντασης (Un/l-L, Εικόνα 3.5). Οι κατηγορίες της εξωτερικής μορφολογίας επιβεβαιώθηκαν από την ακτινογραφική εξέταση στο 95% των φυσιολογικών ιχθυδίων και στο 100% των λορδωτικών ιχθυδίων. Η μέθοδος που εφαρμόστηκε κατά την κατηγοριοποίηση της εξωτερικής μορφολογίας, απέτυχε να εντοπίσει τέσσερα άτομα με λόρδωση ελαφριάς έντασης, τα οποία κατηγοριοποιήθηκαν ως φυσιολογικά (N/l-L).



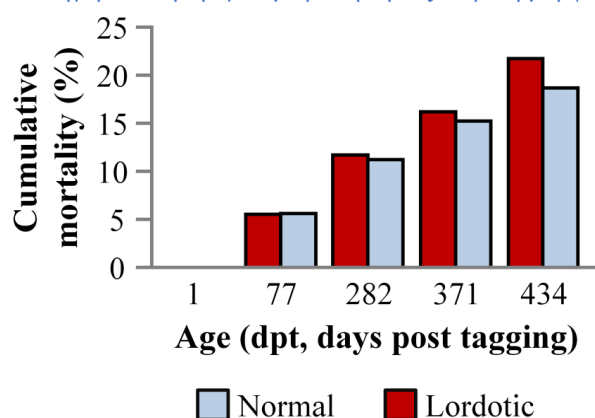
Εικόνα 3.5. Συχνότητα των ψαριών με φυσιολογική (N, Normal), λορδωτική (L, Lordotic) και αβέβαιη (Un, Uncertain) εξωτερική μορφολογία στο δείγμα ελέγχου. Ακολουθώντας τη διάκριση βάσης της εξωτερικής μορφολογίας, όλα τα άτομα εξετάστηκαν σε συνδυασμό με την ακτινογραφική απεικόνιση της σπονδυλικής στήλης (n, φυσιολογική, l-L, λόρδωση ελαφριάς έντασης, s-L, λόρδωση σοβαρής έντασης). Τα κέντρα της λόρδωσης υποδεικνύονται με βέλος. Όλες οι κλίμακες ισούται με 1 cm.

3.3.2. Εξέλιξη της αιματικής λórδωσης κατά την περίοδο της πάχυνσης

Κατά την έναρξη της πειραματικής διαδικασίας, η κατηγοριοποίηση της εξωτερικής μορφολογίας των 1700 ιχθυδίων, έδειξε ότι το 10,5% των ατόμων ήταν λórδωτικά, το 87,0% ήταν φυσιολογικά και μόλις το 2,5% ήταν άτομα με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία. Κατά την περίοδο της πάχυνσης, η συχνότητα των λórδωτικών ατόμων μειώθηκε αισθητά στο 5,8% στις 77 dpt (days post-tagging) και στο 5,2% στις 434 dpt (Εικόνα 3.6A). Από την άλλη, η συχνότητα των φυσιολογικών ατόμων αυξήθηκε στο 90,2% στις 77 dpt και στο 93,4% στις 434 dpt (Εικόνα 3.6B). Αυτές οι αλλαγές στη συχνότητα τόσο των λórδωτικών όσο και των φυσιολογικών δεν μπορούν να αποδοθούν σε επιλεκτική θνησιμότητα λόγω της παραμόρφωσης. Από τα αποτελέσματα φάνηκε ότι δεν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη θνησιμότητα μεταξύ των δύο κατηγοριών ($p > 0,05$ G-test). Η αθροιστική θνησιμότητα αντιστοιχούσε σε 18,7% για τα φυσιολογικά άτομα και 21,8% για τα λórδωτικά (με βάση τις κατηγορίες που είχαν τεθεί κατά την 1 dpt) (Εικόνα 3.7).



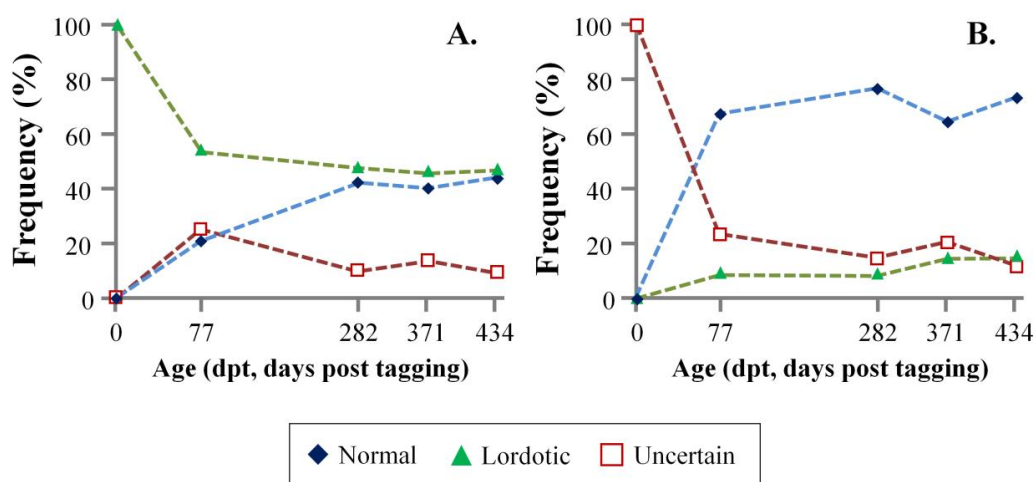
Εικόνα 3.6. Συχνότητα των λórδωτικών (A) και φυσιολογικών (B) ιχθύων στις διαφορετικές δειγματοληψίες. Η κατηγοριοποίηση έγινε με βάση την εξωτερική μορφολογία των ψαριών.



Εικόνα 3.7. Αθροιστική θνησιμότητα των φυσιολογικών (Normal) και λórδωτικών (Lordotic) ψαριών, όπως είχαν κατηγοριοποιηθεί κατά την ηλεκτρονική σήμανση. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη θνησιμότητα μεταξύ των δύο ομάδων ψαριών ($p > 0,05$, G-test).

3.3.3. Επιδιόρθωση της αιματικής λόρδωσης κατά την περίοδο της πάχυνσης (1 - 434 dpt, days post-tagging)

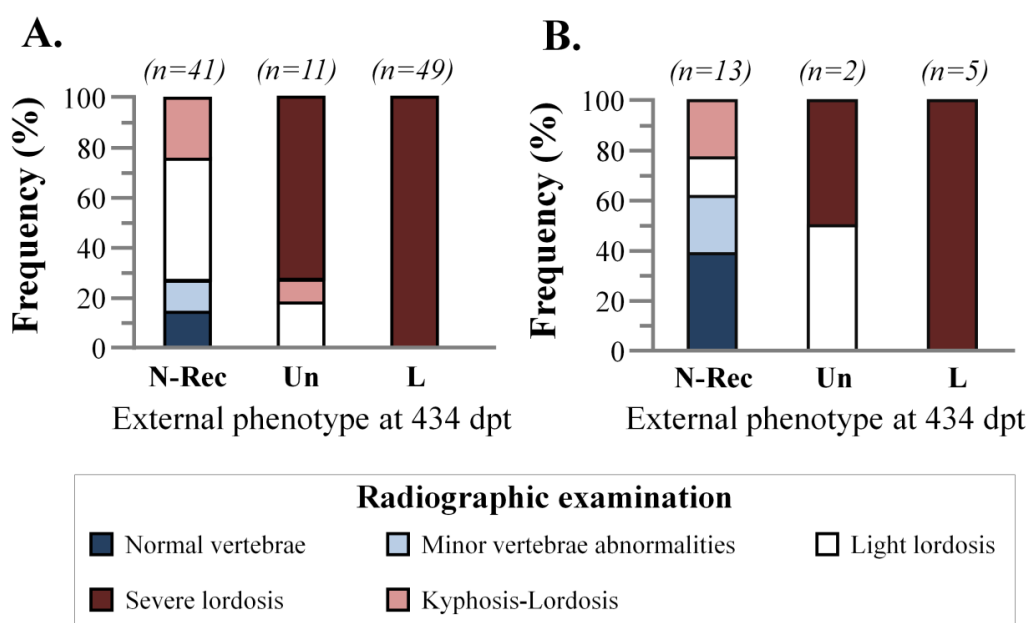
Από την εξατομικευμένη παρακολούθηση της εξωτερικής μορφολογίας των παραμορφωμένων ψαριών, αποδείχθηκε ότι το 20,7% των ψαριών με λорδωτική εξωτερική μορφολογία παρουσίασε φυσιολογικό φαινότυπο στις 77 μέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση (dpt). Μέχρι το τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt), το 43,6% των αρχικά λорδωτικών ψαριών είχαν απόλυτα φυσιολογική εξωτερική μορφολογία (Εικόνα 3.8Α). Παρόμοια σημάδια επιδιόρθωσης παρατηρήθηκαν και στις περιπτώσεις των ψαριών με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία, όπου σε αυτά παρατηρήθηκε υψηλότερη επιδιόρθωση της εξωτερικής τους μορφολογία (67,6% στις 77 dpt, 73,5% στις 434 dpt, Εικόνα 3.8B).



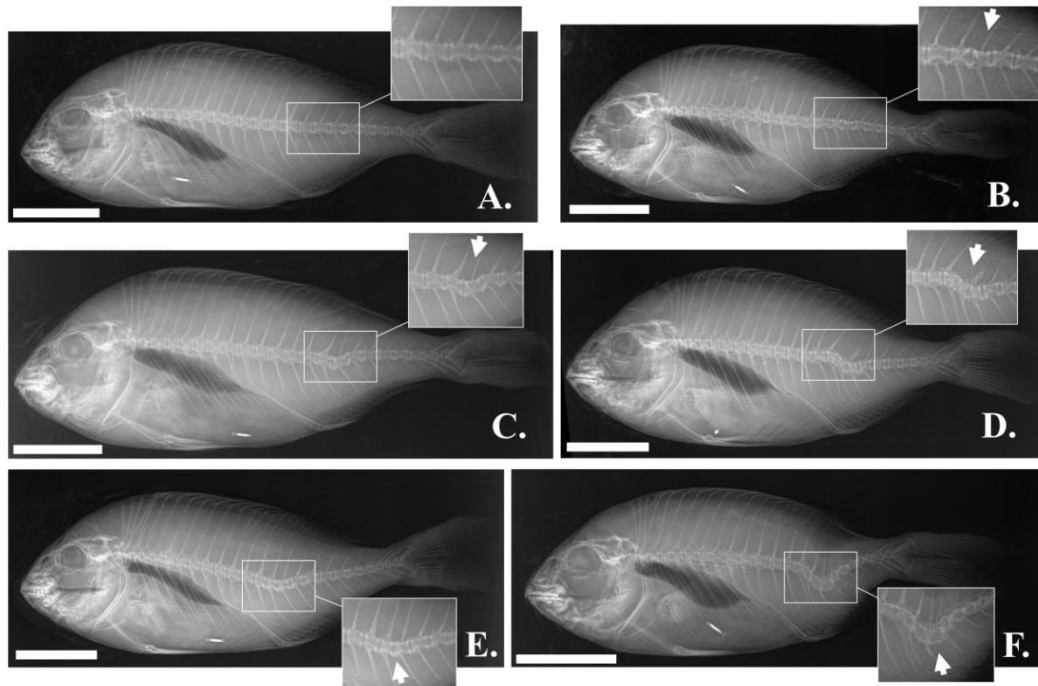
Εικόνα 3.8. Εξέλιξη της εξωτερικής μορφολογίας των αρχικά παραμορφωμένων ιχθυδίων σε όλη τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. (Α) Ψάρια με λорδωτική εξωτερική μορφολογία στην 1 dpt. (B) Ψάρια με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία στην 1 dpt. Κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης, η συχνότητα των ψαριών με λорδωτική και αβέβαιη εξωτερική μορφολογία μειωνόταν προς όφελος των φυσιολογικών ψαριών. Normal, φυσιολογικό ψάρι. Lordotic, ψάρι με λорδωτική εξωτερική μορφολογία. Uncertain, ψάρι με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία. dpt, days post-tagging, μέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.

Η επιδιόρθωση της αιματικής λόρδωσης επιβεβαιώθηκε από την ακτινογραφική εξέταση των ψαριών κατά το τέλος του πειράματος (434 dpt). Από τα ψάρια που παρουσίασαν βελτιωμένη εξωτερική μορφολογία, το 26,8% είχε πλήρη επιδιόρθωση της σπονδυλικής στήλης, χωρίς καμία αλλοίωση των επιμέρους σπονδύλων (14,6%, Εικόνα 3.9Α και Εικόνα 3.10), ή με μικρές αλλοιώσεις σε μεμονωμένους σπονδύλους (12,2%, Εικόνα 3.9Α και Εικόνα 3.10). Το 48,8% των ψαριών με επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία έφεραν λόρδωση ελαφριάς έντασης (Εικόνα 3.9Α και Εικόνα

3.10), ενώ στο 24,4% παρατηρήθηκε αντίρροπη κύφωση πρόσθια της αιματικής λόρδωσης (Εικόνα 3.9Α και Εικόνα 3.10). Η πλειονότητα των αρχικά λорδωτικών ατόμων τα οποία είχαν αβέβαιη εξωτερική μορφολογία στο τέλος, έφεραν λόρδωση σοβαρής έντασης (Εικόνα 3.9Α και Εικόνα 3.10). Η μερική επιδιόρθωση της αιματικής λόρδωσης, επιβεβαιώθηκε και από την ακτινογραφική εξέταση στις περιπτώσεις των ψαριών με αρχική αβέβαιη εξωτερική μορφολογία (Εικόνα 3.9B). Τέλος, αιματική λόρδωση σοβαρής έντασης παρατηρήθηκε στις ακτινογραφίες όλων των ψαριών με τελική λорδωτική εξωτερική μορφολογία (434 dpt, Εικόνα 3.9 και Εικόνα 3.10).



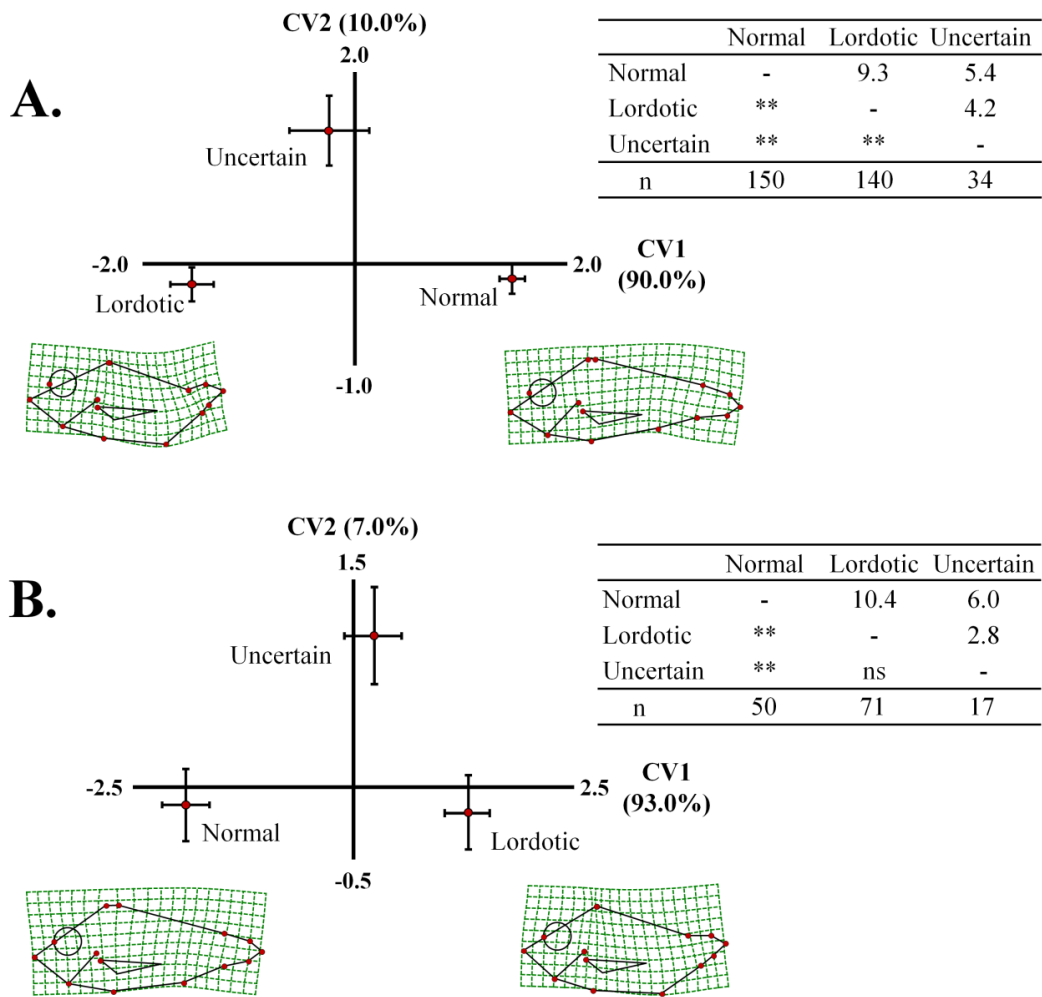
Εικόνα 3.9. Ακτινογραφική κατηγοριοποίηση των ψαριών στο τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt). (A) Ψάρια που είχαν λорδωτική εξωτερική μορφολογία στην 1 dpt. (B) Ψάρια με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία στην 1 dpt. N-Rec, ψάρια με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία. Un, ψάρια με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία. L, ψάρια με λорδωτική εξωτερική μορφολογία. dpt, days post tagging.



Εικόνα 3.10. Αιματική λόρδωση (C-F) ποικίλης έντασης σε ενήλικες τσιπούρες κατά το τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpi). (A) Φυσιολογικό ψάρι. (B) Ψάρι με μικρές αλλοιώσεις στους σπονδύλους (λευκό βέλος). (C) Ψάρι με λόρδωση ελαφριάς έντασης και φυσιολογική εξωτερική μορφολογία. (D) Ψάρι με κύφωση που αναπτύχθηκε πρόσθια της λόρδωσης. (E) Ψάρι με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία και εσωτερική λόρδωση σοβαρής έντασης. (F) Ψάρι με παραμορφωμένη εξωτερική μορφολογία και λόρδωση σοβαρής έντασης. Οι κλίμακες ισούται με 5 cm.

3.3.4. Επίδραση της αιματικής λόρδωσης στο σχήμα του σώματος στην αρχή και στο τέλος της περιόδου πάχυνσης

Η ανάλυση κανονικών μεταβλητών έδειξε ότι η λόρδωση έχει σημαντική επίδραση στο σχήμα του σώματος της τσιπούρας, τόσο στην αρχή (1 pdt) όσο και στο τέλος (434 dpi) της περιόδου πάχυνσης (Wilk's $\lambda = 0,262$ και $0,261$ αντίστοιχα, $p < 0,001$, Εικόνα 3.11). Και στις δύο αναλύσεις, η πρώτη κανονική μεταβλητή (CV1), ερμήνευσε το μεγαλύτερο ποσοστό της φαινοτυπικής διακύμανσης (90,0 - 93,0%), διαχωρίζοντας τα φυσιολογικά από τα λорδωτικά ψάρια. Τα ψάρια με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία κατανέμονταν μεταξύ των δύο ομάδων (Εικόνα 3.11). Στην πρώτη δειγματοληψία, τα τετράγωνα των αποστάσεων Mahalanobis διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ όλων των εξεταζόμενων ομάδων (Εικόνα 3.11A), ενώ στην τελευταία δειγματοληψία μόνο η ομάδα των φυσιολογικών ψαριών διέφερε στατιστικά σημαντικά από τις άλλες δύο ομάδες (Εικόνα 3.11B). Τα πλέγματα παραμόρφωσης έδειξαν ότι τα λорδωτικά ψάρια χαρακτηρίζονταν από μια κοιλιακή μετατόπιση της πρόσθιας βάσης του εδρικού πτερυγίου (ορόσημο 7) και μια προσθιο-ραχιαία μετατόπιση του ουραίου μίσχου (ορόσημο 2 - 6, Εικόνα 3.11).

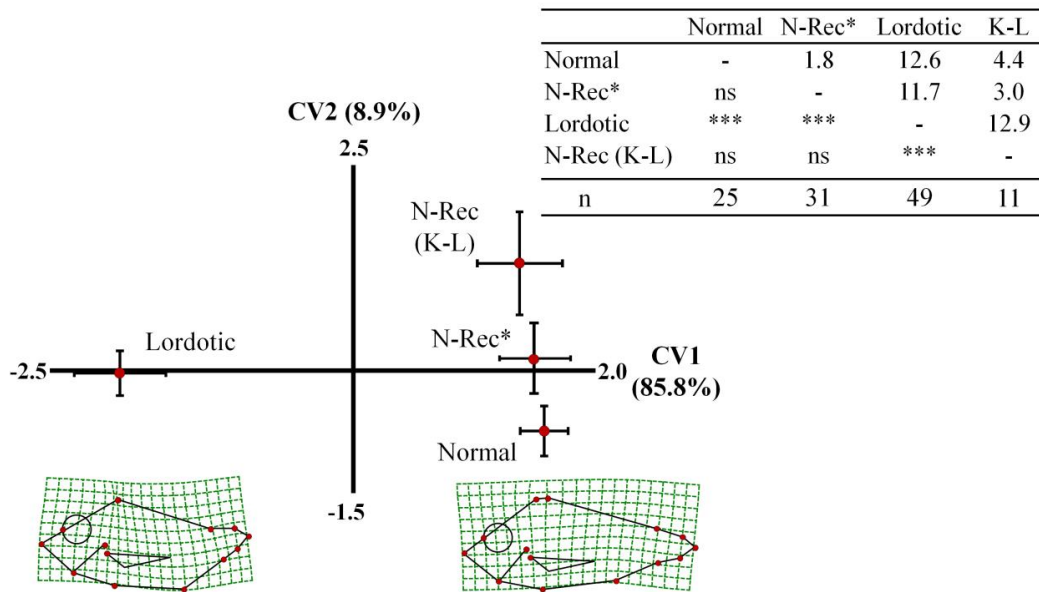


Εικόνα 3.11. Κατανομή των μέσων τιμών ($\text{mean} \pm \text{SD}$) των ατόμων με φυσιολογική (Normal), λорδωτική (Lordotic) και αβέβαιη (Uncertain) εξωτερική μορφολογία κατά μήκος των δύο αξόνων της ανάλυσης κανονικών μεταβλητών (CV1, CV2). (A) Έναρξη της περιόδου πάχυνσης (1 dpt). (B) Τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt). Στις παρενθέσεις δίνονται τα ποσοστά της συνολικής φαινοτυπικής διακύμανσης που εξηγούνται από κάθε κανονική μεταβλητή. Τα πλέγματα παραμόρφωσης ($\times 1$) δείχνουν την αλλαγή στο σχήμα του σώματος κατά μήκος του CV1 άξονα. Τα τετράγωνα των αποστάσεων Mahalanobis μεταξύ των διαφορετικών ομάδων καθώς και τα αντίστοιχα επίπεδα σημαντικότητας δίνονται στον πίνακα δίπλα σε κάθε γράφημα. ns, $p > 0,05$. ** $p < 0,001$. n, αριθμός ατόμων κάθε ομάδας.

3.3.5. Μορφομετρική ανάλυση των ατόμων με επιδιόρθωση της λόρδωσης

Μετά την ακτινογραφική απεικόνιση των ψαριών στο τέλος της περιόδου πάχυνσης (Εικόνα 3.12), ελέγχθηκε κατά πόσο το σχήμα του σώματος των ψαριών με επιδιορθωμένη φυσιολογική εξωτερική μορφολογία διαφέρει από το σχήμα του σώματος των ψαριών με φυσιολογική μορφολογία από την έναρξη του πειράματος (1 dpt). Στην πρώτη κανονική μεταβλητή (CV1) (85,8% της συνολικής διακύμανσης), διακρίθηκαν τα ψάρια με φυσιολογικό φαινότυπο από τα ψάρια με λорδωτικό

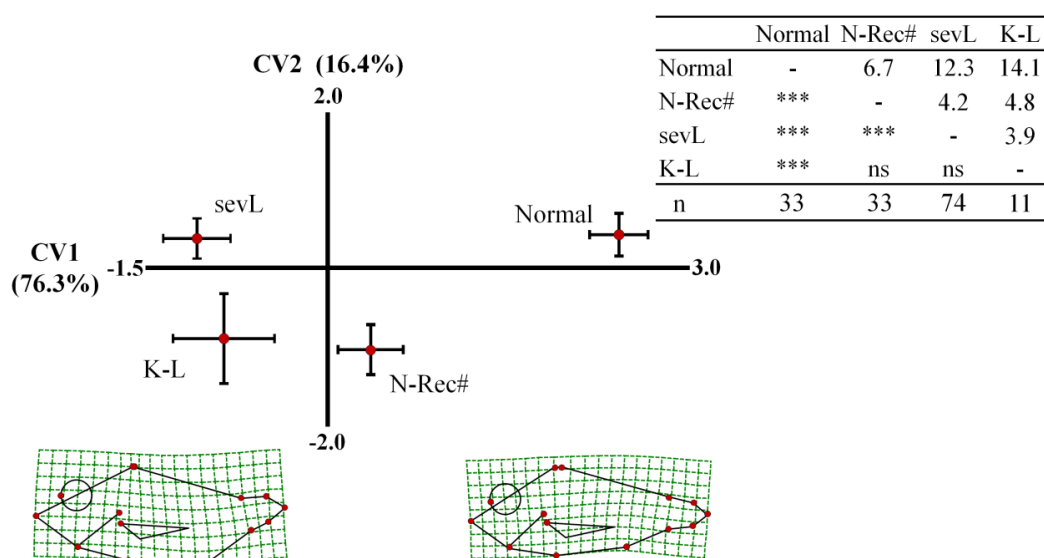
φαινότυπο (Wilk's $\lambda = 0,155$, $p < 0,001$, Εικόνα 3.12). Τα τετράγωνα των αποστάσεων Mahalanobis διέφεραν στατιστικά σημαντικά μόνο μεταξύ των φυσιολογικών και λорδωτικών ατόμων (Εικόνα 3.12). Η απόσταση μεταξύ των ψαριών με επιδιορθωμένη φυσιολογική εξωτερική μορφολογία και των ψαριών με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία από την έναρξη του πειράματος δεν ήταν στατιστικά σημαντική (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12. Κατανομή των μέσων τιμών (mean±SD) των ατόμων της τελευταίας δειγματοληψίας (434 days post-tagging) με βελτιωμένη φυσιολογική (N-Rec*, N-Rec K-L), φυσιολογική από την αρχή του πειράματος (1dpt, Normal) ή λорδωτική (Lordotic) εξωτερική μορφολογία κατά μήκος των δύο πρώτων κανονικών μεταβλητών (CV1, CV2). Στις παρενθέσεις δίνονται τα ποσοστά της συνολικής φαινοτυπικής διακύμανσης που εξηγούνται από κάθε κανονική μεταβλητή. Τα πλέγματα παραμόρφωσης (x1) δείχνουν την αλλαγή στο σχήμα του σώματος κατά μήκος του CV1 άξονα. Τα τετράγωνα των αποστάσεων Mahalanobis μεταξύ των διαφορετικών ομάδων καθώς και τα αντίστοιχα επίπεδα σημαντικότητας δίνονται στον πίνακα δίπλα στο γράφημα. ns, $p > 0,05$. *** $p < 0,001$. N-Rec*, N-Rec της εικόνας 3.8A εξαιρώντας τα K-L. N-Rec (K-L), K-L ψάρια της εικόνας 3.9A. Η ομάδα των λорδωτικών ψαριών αποτελούνται από τα άτομα με λόρδωση σοβαρής έντασης, όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.8A. n, αριθμός ατόμων κάθε ομάδας.

Τέλος έγινε διάκριση των λорδωτικών ιχθυδίων με βάση τις μορφολογικές κατηγορίες που είχαν στο τέλος του πειράματος. Έτσι τα λорδωτικά ιχθύδια κατηγοριοποιήθηκαν σε ψάρια που παρέμειναν λорδωτικά (sevL) και σε ψάρια που παρουσίασαν επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία κατά το τέλος της περιόδου πάχυνσης (N-Rec#, Εικόνα 3.13). Στην πρώτη κανονική μεταβλητή (CV1) (76,3% της ολικής διακύμανσης), ξεχώρισαν τα ψάρια με φυσιολογικό φαινότυπο από τις ομάδες των λорδωτικών (sevL) και των επιδιορθωμένων (N-Rec#) ψαριών (Wilk's $\lambda = 0,420$, $p < 0,001$, Εικόνα 3.13). Τα τετράγωνα των αποστάσεων Mahalanobis ήταν στατιστικά

σημαντικά μεταξύ των φυσιολογικών (Nor) και των υπολοίπων κατηγοριών (sevL, K-L, N-Rec#, Εικόνα 3.13). Σημαντικές διαφορές στο σχήμα του σώματος παρατηρήθηκαν μεταξύ των σοβαρά λорδωτικών (sevL) και των επιδιορθωμένων ιχθυδίων (N-Rec#) (Εικόνα 3.13). Τα πλέγματα παραμόρφωσης έδειξαν ότι οι κύριες μορφολογικές διαφορές στο σχήμα του σώματος μεταξύ των sevL και των N-Rec# ιχθυδίων σχετίζονταν με την ένταση της απόκλισης από τον φυσιολογικό φαινότυπο (Εικόνα 3.13). Μέσω την ανάλυση των κανονικών μεταβλητών για την κατηγοριοποίηση των ατόμων, έγινε εφικτή η ορθή επανακατηγοριοποίηση στο 94% των φυσιολογικών ατόμων, 89% των σοβαρά λорδωτικών (sevL) και 74% των επιδιορθωμένων ατόμων (N-Rec#) (Πίνακας 3.3). Αυτό δείχνει ότι η επιδιόρθωση της λόρδωσης είναι δυνατό να προβλεφθεί από την αρχή της πάχυνσης.



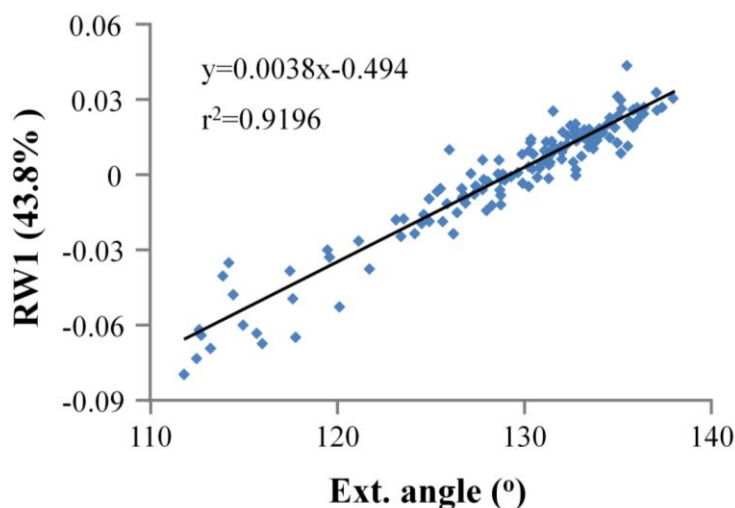
Εικόνα 3.13. Κατανομή των μέσων τιμών (mean±SD) των λорδωτικών ιχθυδίων στην έναρξη της πάχυνσης (1 dpt) κατά μήκος των δυο πρώτων κανονικών μεταβλητών (CV1, CV2). Τα ιχθυδία κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την εξωτερική μορφολογία και την ακτινογραφική απεικόνιση που είχαν στο τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt, Εικόνα 3.8A). Τα ιχθυδία διακρίθηκαν σε ψάρια με λόρδωση σοβαρής έντασης (sevL, Εικόνα 3.9A), ψάρια με επιδιορθωμένη φυσιολογική εξωτερική μορφολογία και εσωτερική κύφωση-λόρδωση (K-L, Εικόνα 3.9A), ψάρια με επιδιορθωμένη φυσιολογική εξωτερική μορφολογία (N-Rec#, N-Rec και Un ψάρια της Εικόνας 3.9A, εξαιρώντας τις ομάδες K-L και sevL) και ψάρια με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία από την έναρξη της περιόδου πάχυνσης (Normal). Στις παρενθέσεις δίνονται τα ποσοστά της φαινοτυπικής διακύμανσης που εξηγούνται από κάθε κανονική μεταβλητή. Τα πλέγματα παραμόρφωσης (x1) δείχνουν την αλλαγή στο σχήμα του σώματος κατά μήκος του CV1 άξονα. Τα τετράγωνα των αποστάσεων Mahalanobis μεταξύ των διαφορετικών ομάδων καθώς και τα αντίστοιχα επίπεδα σημαντικότητας δίνονται στον πίνακα δίπλα στο γράφημα. ns, $p > 0,05$. *** $p < 0,001$. Η ομάδα sevL αποτελείται από 57 άτομα της Εικόνας 3.9A (“Severe lordosis”) και επιπλέον 17 άτομα με λорδωτική εξωτερική μορφολογία, τα οποία δεν ακτινογραφήθηκαν. n, αριθμός ατόμων κάθε ομάδας.

Πίνακας 3.3. Κατηγοριοποίηση των ιχθυδίων της Εικόνας 3.14 στις διαφορετικές κατηγορίες με βάση τη μορφομετρία και την ανάλυση των κανονικών μεταβλητών. Οι "a priori" πιθανότητες κατηγοριοποίησης ήταν ανάλογες του αρχικού μεγέθους. Οι αριθμοί υποδηλώνουν ποσοστά σωστής επανακατηγοριοποίησης (έντονοι αριθμοί) ή λανθασμένης επανακατηγοριοποίησης των ατόμων.

	sevL	N-Rec#	Normal	K-L	Total
sevL	89	7	3	1	100
N-Rec#	21	73	6	0	100
Normal	0	6	94	0	100
K-L	45	9	0	46	100

3.3.6 Σχέση της εσωτερικής γωνίας της αιματικής λόρδωσης με τη γωνία που σχηματίζεται στην εξωτερική μορφολογία των ψαριών

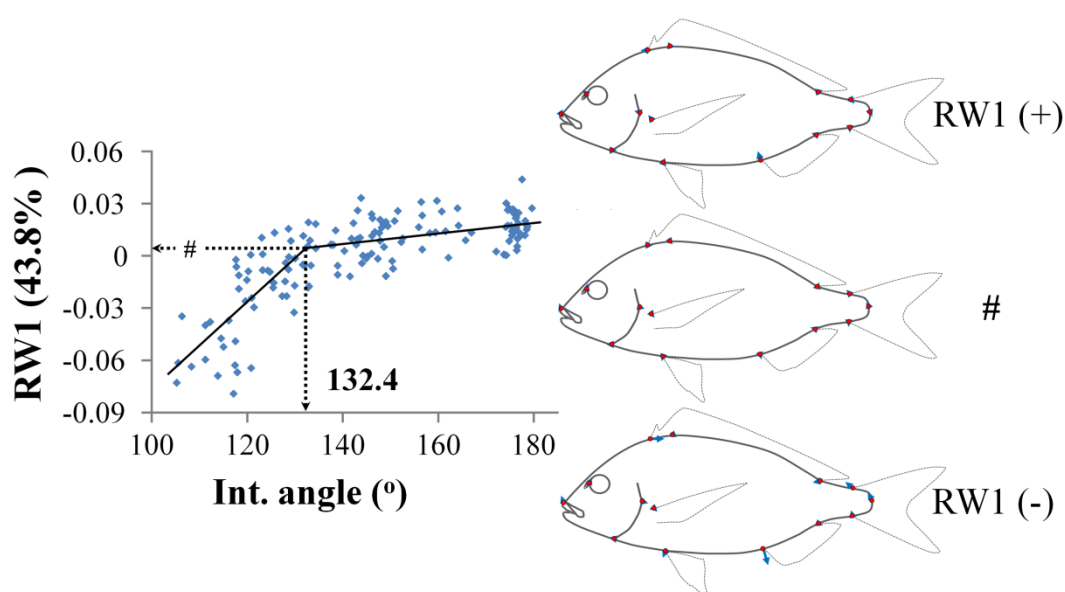
Η γεωμετρική μορφομετρική ανάλυση των ενηλίκων ατόμων, έδειξε ότι η RW1 (43,8% της συνολικής διακύμανσης) σχετίζεται σημαντικά με την εξωτερική γωνία των ενηλίκων ατόμων (Εικόνα 3.14).



Εικόνα 3.14. Σχέση της πρώτης μεταβλητής σχετικών στρεβλώσεων (RW1) με τη γωνία της αιματικής λόρδωσης, όπως αυτή υπολογίστηκε από τις φωτογραφίες της εξωτερικής μορφολογίας των ενηλίκων ατόμων.

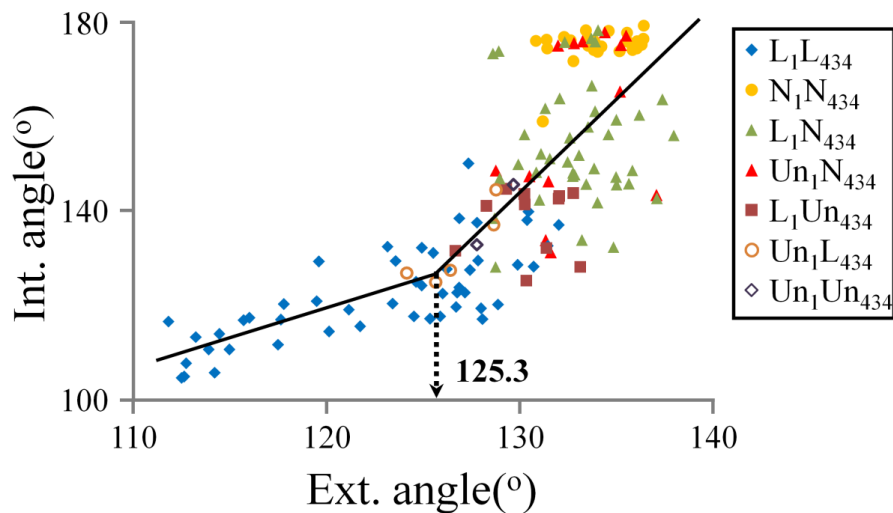
Στην περίπτωση της εσωτερικής γωνίας της αιματικής λόρδωσης, η σχέση της με το σχήμα του σώματος των ενηλίκων (RW1) παρουσίασε ένα διακριτό σημείο καμπής του ρυθμού μεταβολής (132,4°), το οποίο χώρισε τα άτομα σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα ($x < 132,4^\circ$) υπήρξε μια ραγδαία μεταβολή της εξωτερικής μορφολογίας, ενώ

στην δεύτερη ομάδα ($x > 132,4^\circ$) δεν παρατηρήθηκε κάτι αντίστοιχο (Εικόνα 3.15). Η εκτίμηση των ανυσμάτων (vector diagrams) έδειξε ότι κατά μήκος της RW1, οι μεταβολές του σχήματος που εντοπίζονται, όντως αφορούν σε μεταβολές λόγω της επίδρασης της αιματικής λόρδωσης. Πιο συγκεκριμένα, όσο μειώνεται η εσωτερική γωνία της αιματικής λόρδωσης, τόσο πιο έντονη ήταν η κοιλιακή μετατόπιση του οροσήμου 7 που βρισκόταν στην αρχή του εδρικού πτερυγίου. Όσο αυξανόταν η εσωτερική γωνία αυξάνονταν και οι τιμές της RW1, αλλά με σημαντικά μικρότερο ρυθμό. Από την απεικόνιση ανυσμάτων φάνηκε ότι οι θετικές τιμές αντιστοιχούσαν σε πιο φυσιολογικό φαινότυπο (RW1+). Επιπλέον η ανυσματική απεικόνιση στις $132,4^\circ$ πλησίαζε αυτή των ακραίων θετικών τιμών (RW1#, Εικόνα 3.15).



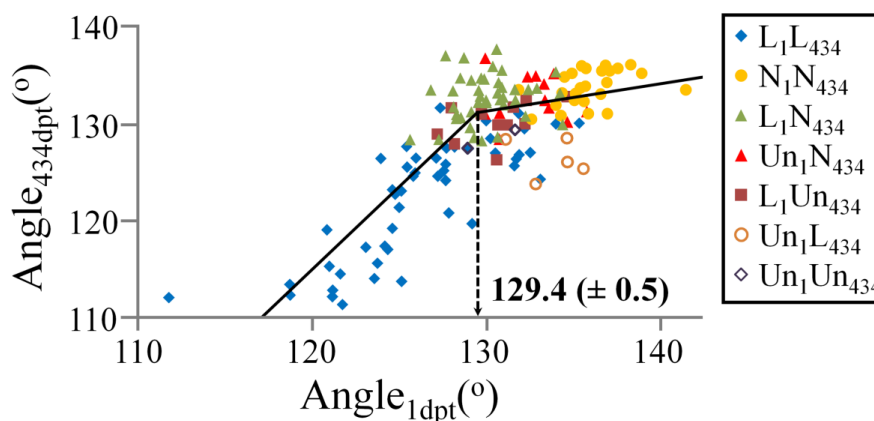
Εικόνα 3.15. Σχέση της RW1 με τη γωνία της αιματικής λόρδωσης, όπως αυτή υπολογίστηκε από τις ακτινογραφίες των ενηλίκων ατόμων. Οι ανυσματικές απεικονίσεις δείχνουν τις αλλαγές του σχήματος για τις ακραίες τιμές της RW1. Η απουσία τυπικού σφάλματος, οφείλεται στην αδυναμία υπολογισμού της γραμμικής παλινδρόμησης Piecewise, λόγω ευαισθησίας των δεδομένων.

Η ανάλυση παλινδρόμησης μεταξύ της εσωτερικής και της εξωτερικής γωνίας της αιματικής λόρδωσης, παρουσίασε σημείο καμπής ($125,3^\circ$) που διαχώρισε τα άτομα σε δύο ομάδες. Κάτω από αυτό το σημείο καμπής, η αιματική λόρδωση είχε σημαντικό αντίκτυπο στην εξωτερική μορφολογία, κάτι που δεν ίσχυε όταν η γωνία στην εξωτερική μορφολογία ήταν μεγαλύτερη του σημείου καμπής ($x > 125,3^\circ$, Εικόνα 3.16).



Εικόνα 3.16. Σχέση εξωτερικής γωνίας (φωτογραφίες εξωτερικής μορφολογίας) με εσωτερική γωνία (X-ray), που σχετίζεται άμεσα με την εμφάνιση της αιματικής λόρδωσης σε ενήλικες τσιπούρες. L_1L_{434} , άτομα που είχαν λορδωτική εξωτερική μορφολογία σε όλη τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης (Lordotic της Εικόνας 3.12). N_1N_{434} , άτομα με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία σε όλη τη διάρκεια της πάχυνσης (Normal της Εικόνας 3.12). L_1N_{434} , άτομα που ήταν λορδωτικά στην έναρξη της πάχυνσης και είχαν φυσιολογική εξωτερική μορφολογία στο τέλος της πάχυνσης (N-Rec# Εικόνας 3.12). Un_1Un_{434} , άτομα με αβέβαιη εξωτερική μορφολογία σε όλη τη διάρκεια της πάχυνσης. Un_1N_{434} , άτομα που είχαν αβέβαιη εξωτερική μορφολογία κατά την έναρξη και φυσιολογική εξωτερική μορφολογία στο τέλος της περιόδου πάχυνσης. L_1Un_{434} , άτομα που είχαν λορδωτική εξωτερική μορφολογία στην έναρξη της πάχυνσης και αβέβαιη εξωτερική μορφολογία στο τέλος της. Un_1L_{434} , άτομα που είχαν αβέβαιη εξωτερική μορφολογία κατά την έναρξη της πάχυνσης και λορδωτική εξωτερική μορφολογία στο τέλος της.

Τέλος η ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης της εξωτερικής μορφολογίας των δύο δειγμάτων (1 και 434 dpt) παρουσίασε ένα σημείο καμπής στις $129,4^\circ (\pm 0,5)$ που διαχώρισε τα άτομα σε δύο ομάδες. Στην πρώτη ομάδα ($x < 129,4^\circ$) παρατηρήθηκε ότι όσο μειωνόταν η εξωτερική γωνία της αιματικής λόρδωσης, τόσο πιο έντονη ήταν η επίδραση της στην εξωτερική μορφολογία και στις δύο δειγματοληψίες. Αντίθετα, στη δεύτερη ομάδα ($x > 129,4^\circ$) δεν παρατηρήθηκε το ίδιο (Εικόνα 3.17). Πιο αναλυτικά στη δεύτερη ομάδα, βρίσκονταν κυρίως άτομα που είτε παρουσίασαν επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης (L_1N_{434} , L_1Un_{434} , Un_1N_{434}) είτε είχαν φυσιολογική εξωτερική μορφολογία σε όλη τη διάρκεια της (N_1N_{434}) (Εικόνα 3.17).



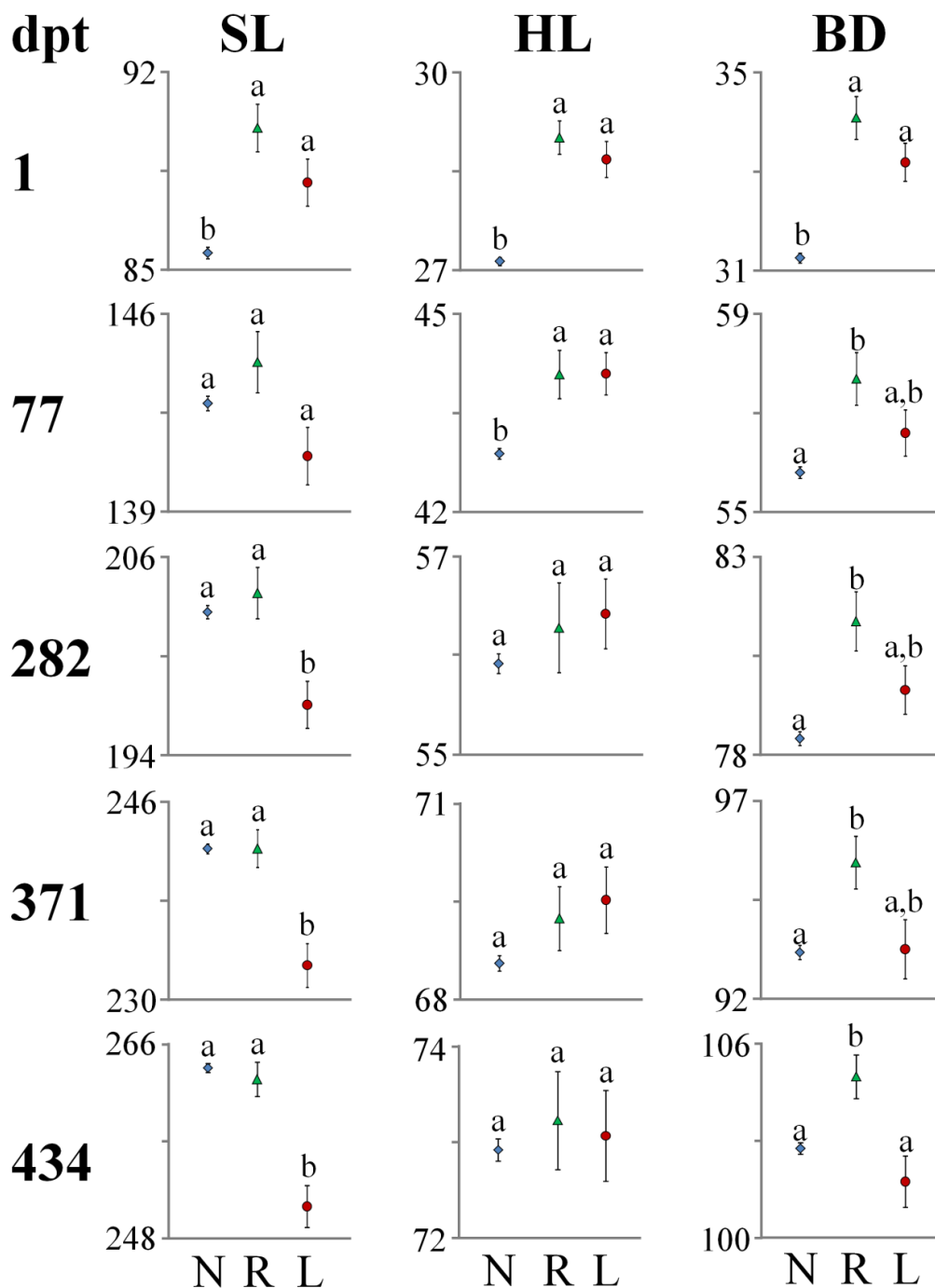
Εικόνα 3.17. Σχέση της εξωτερικής γωνίας της αιματικής λόρδωσης μεταξύ του πρώτου (1 dpt) και του πέμπτου (434 dpt) δείγματος. Τα άτομα της ανάλυσης είναι τα 146 άτομα στα οποία πραγματοποιήθηκε η ακτινογραφική εξέταση κατά το τέλος της περιόδου πάχυνσης (Πίνακας 3.2, σελ. 49).

3.3.7. Σχέση της αιματικής λόρδωσης με το ρυθμό σωματικής αύξησης

Στο παρόν υποκεφάλαιο εξετάστηκαν ποσοτικοί χαρακτήρες, όπως το τυπικό μήκος, το μήκος της κεφαλής και το ύψος του σώματος μεταξύ τριών κατηγοριών (φυσιολογικά, λорδωτικά και επιδιορθωμένα -ως προς τη λόρδωση- άτομα), προκειμένου να εξεταστεί το κατά πόσο η αύξηση των παραπάνω χαρακτήρων σχετίζεται με την εξέλιξη της αιματικής λόρδωσης.

Στην πρώτη δειγματοληψία (1 dpt) τα λорδωτικά ιχθύδια είχαν σημαντικά μεγαλύτερο τυπικό μήκος από τα φυσιολογικά ιχθύδια ($88,1 \pm 0,8$ mm έναντι $85,6 \pm 0,2$ mm, $p < 0,01$, Anova, Bonferroni test). Ωστόσο από την τρίτη δειγματοληψία (282 dpt) και έως την πέμπτη δειγματοληψία (434 dpt), τόσο τα φυσιολογικά όσο και τα επιδιορθωμένα άτομα παρουσίασαν μεγαλύτερο τυπικό μήκος από τα λорδωτικά ($p < 0,05$, Εικόνα 3.18).

Επειδή η αιματική λόρδωση έχει σημαντική επίδραση στο μήκος της σπονδυλικής στήλης και άρα στο SL, υπολογίστηκαν τόσο το μήκος της κεφαλής όσο και το ύψος του σώματος, επειδή δεν σχετίζονται ανατομικά με την αιματική λόρδωση. Όσον αφορά το μήκος της κεφαλής, στα φυσιολογικά άτομα παρατηρήθηκε σημαντικά μικρότερο μήκος από τα λорδωτικά τόσο στην πρώτη ($27,1 \pm 0,07$ mm, $p < 0,001$) όσο και στη δεύτερη δειγματοληψία ($42,9 \pm 0,08$ mm, $p < 0,001$), ενώ από την τρίτη δειγματοληψία και μέχρι το τέλος της περιόδου πάχυνσης, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών κατηγοριών (Εικόνα 3.18).

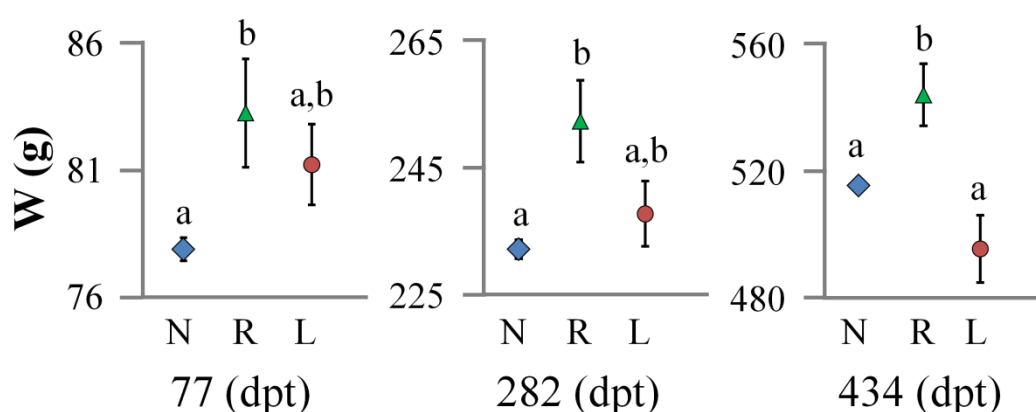


Εικόνα 3.18. Μέσες τιμές ποσοτικών χαρακτήρων (\pm SE) μεταξύ τριών κατηγοριών εξωτερικής μορφολογίας (Φυσιολογικά, επιδιορθωμένα, λορδωτικά) σε κάθε δειγματοληψία. Τα άτομα που χαρακτηρίζονται ως επιδιορθωμένα στις 1 dpt είναι τα αρχικά λορδωτικά ιχθύδια που εμφάνισαν επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία στο τέλος της περιόδου πάχυνσης. N, ψάρια με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία. L, ψάρια με λορδωτική εξωτερική μορφολογία. R, ψάρια με επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία. SL, τυπικό μήκος. HL, μήκος κεφαλής. BD, ύψος σώματος. Όλοι οι ποσοτικοί χαρακτήρες είναι υπολογισμένοι σε χιλιοστά (mm). Το κοινό γράμμα δηλώνει μη στατιστικά σημαντικές διαφορές (Ανονα, $p < 0,05$).

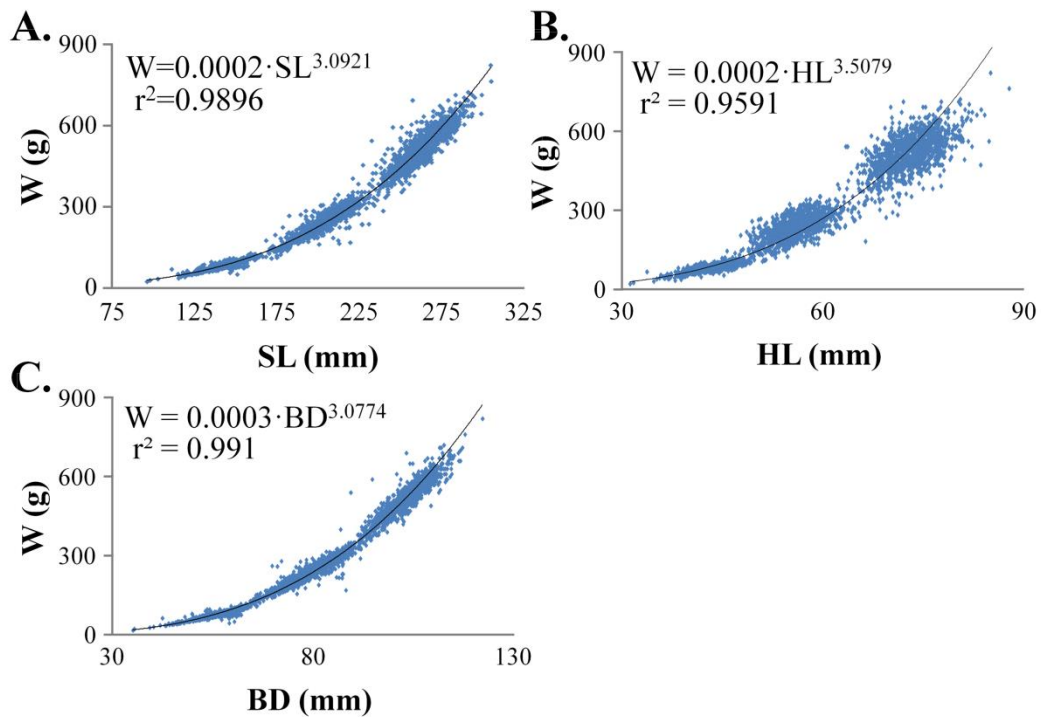
Επιπλέον τα φυσιολογικά άτομα στην πρώτη δειγματοληψία είχαν σημαντικά μικρότερο ύψος σώματος σε σχέση με τα λорδωτικά άτομα ($31,3 \pm 0,1$ mm, $p < 0,001$). Από τη δεύτερη (77 dpt) και μέχρι την τέταρτη δειγματοληψία (371 dpt), τα επιδιορθωμένα άτομα ήταν αυτά που παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερο ύψος σώματος σε σχέση με τα φυσιολογικά άτομα ($p < 0,05$, Εικόνα 3.18). Στην τελευταία δειγματοληψία τα επιδιορθωμένα άτομα παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερο ύψος σώματος από τις άλλες δύο κατηγορίες ($p < 0,05$, Εικόνα 3.18).

Πέραν των μορφομετρικών δεικτών, εξετάστηκε και το βάρος των ατόμων κατά την περίοδο της πάχυνσης. Επειδή η μέτρηση του βάρους δεν πραγματοποιήθηκε σε όλες τις δειγματοληψίες, τα δεδομένα περιορίστηκαν στη δεύτερη (77 dpt), τρίτη (282 dpt) και πέμπτη (434 dpt) δειγματοληψία. Αυτό που παρατηρήθηκε είναι ότι τα επιδιορθωμένα άτομα είχαν σημαντικά μεγαλύτερο βάρος από τα φυσιολογικά άτομα στην πρώτη και δεύτερη δειγματοληψία, ενώ στην τρίτη δειγματοληψία τα επιδιορθωμένα άτομα είχαν σημαντικά μεγαλύτερο βάρος και από τις δύο κατηγορίες ($p < 0,05$, Εικόνα 3.19).

Το βάρος παρουσίασε εκθετική αύξηση όταν συσχετιζόταν με όλους τους μορφομετρικούς δείκτες ($r^2 > 0,95$) με το ύψος του σώματος (BD) να έχει παρουσιάσει την υψηλότερη συσχέτιση ($r^2 = 0,991$, Εικόνα 3.20). Οι παράμετροι "a" και "b" των εξισώσεων, χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να υπολογιστούν οι δείκτες σχετικού βάρους για κάθε μορφομετρικό δείκτη ξεχωριστά.

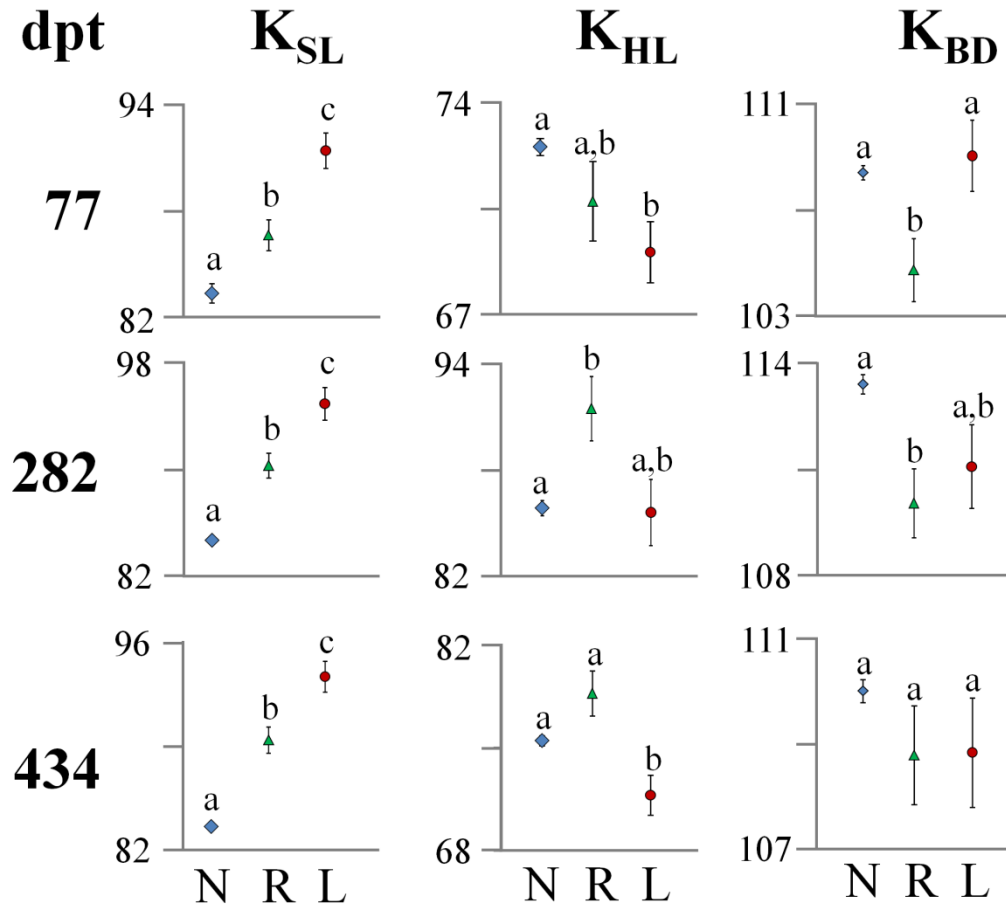


Εικόνα 3.19. Μέσα βάρη (\pm SE) κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. N, ψάρια με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία. L, ψάρια με λорδωτική εξωτερική μορφολογία. R, ψάρια με επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία. Τα κοινά γράμματα υποδηλώνουν μη στατιστικά σημαντικές διαφορές (Ανοva, $p < 0,05$).



Εικόνα 3.20. Σχέση του βάρους με το τυπικό μήκος (A), το μήκος της κεφαλής (B) και το ύψος του σώματος (C) σε πληθυσμό τσιπούρας κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης.

Όταν χρησιμοποιήθηκε το τυπικό μήκος για τον υπολογισμό του δείκτη σχετικού βάρους (K_{SL}), τα λорδωτικά ψάρια είχαν υψηλότερη τιμή σε σχέση με τις άλλες δύο ομάδες σε όλες τις δειγματοληψίες ($p < 0,05$). Όταν χρησιμοποιήθηκε το μήκος της κεφαλής για τον υπολογισμό του δείκτη σχετικού βάρους (K_{HL}), στη δεύτερη (77 dpt) και πέμπτη δειγματοληψία (434 dpt), τα φυσιολογικά άτομα είχαν σημαντικά υψηλότερες τιμές σε σχέση με τα λорδωτικά ($p < 0,05$), ενώ στην τρίτη δειγματοληψία (282 dpt) τα επιδιορθωμένα άτομα είχαν σημαντικά υψηλότερη τιμή του δείκτη σχετικού βάρους και από τις δύο άλλες ομάδες. Τέλος στην περίπτωση του δείκτη σχετικού βάρους για το ύψος του σώματος (K_{BD}), τα επιδιορθωμένα άτομα παρουσίασαν σημαντικά χαμηλότερη τιμή στη δεύτερη και τρίτη δειγματοληψία (77 και 282 dpt, $p < 0,05$) από τα φυσιολογικά, ενώ στην τελευταία δειγματοληψία (434 dpt) οι τρεις κατηγορίες ψαριών δεν διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ($p > 0,05$, Εικόνα 3.21).



Εικόνα 3.21. Μέσες τιμές δεικτών σχετικού βάρους (\pm SE) μεταξύ τριών κατηγοριών εξωτερικής μορφολογίας (φυσιολογικά, επιδιορθωμένα, λορδωτικά) σε κάθε δειγματοληψία. Τα άτομα που χαρακτηρίζονται ως επιδιορθωμένα στην 1 dpt είναι τα αρχικά λορδωτικά ιχθύδια που εμφάνισαν επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία στο τέλος της περιόδου πάχυνσης. N, ψάρια με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία. L, ψάρια με λορδωτική εξωτερική μορφολογία. R, ψάρια με επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία. SL, τυπικό μήκος. HL, μήκος κεφαλής. BD, ύψος σώματος. Το κοινό γράμμα δηλώνει μη στατιστικά σημαντικές διαφορές (Anova, $p < 0,05$).

3.4. Συζήτηση

Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε η εξέλιξη της αιματικής λόρδωσης σε εκτρεφόμενο πληθυσμό τσιπούρας κατά την περίοδο της πάχυνσης. Η μελέτη της εξωτερικής μορφολογίας των λорδωτικών ατόμων έδειξε ότι η αιματική λόρδωση επιδιορθώνεται κατά την περίοδο της πάχυνσης. Ο παρατηρούμενος βαθμός επιδιόρθωσης εξαρτιόνταν από την αρχική ένταση της παραμόρφωσης, καθώς κυμαινόταν από 43,6% για τις περιπτώσεις των ψαριών με σοβαρή λόρδωση, μέχρι 73,5% για τα ψάρια με λόρδωση ελαφριάς έντασης. Η ακτινογραφική εξέταση των ψαριών, έδειξε ότι η επιδιόρθωση της λорδωτικής εξωτερικής μορφολογίας συνοδευόταν με μερική έως ολική επιδιόρθωση της σπονδυλικής στήλης. Είναι η πρώτη φορά που καταγράφεται επιδιόρθωση σοβαρών αξονικών παραμορφώσεων στα ψάρια. Σε παρόμοια έρευνα, οι (Witten *et al.* 2006) έδειξαν αναδιαμόρφωση συντηγμένων σπονδυλικών κέντρων σε ένα μη παραμορφωμένο κέντρο, το οποίο ωστόσο είχε πολλαπλές αιματικές και νευρικές αποφύσεις.

Κατά την ανάπτυξη των ψαριών, η μείωση των ποσοστών εμφάνισης των παραμορφώσεων δεν είναι σπάνιο φαινόμενο. Κυρίως αποδίδεται είτε σε αυξημένο ρυθμό θνησιμότητας στα άτομα που φέρουν παραμόρφωση σοβαρής έντασης (Koumoundouros *et al.* 1997, Koumoundouros *et al.* 2002, Georgakopoulou *et al.* 2010, Loizides *et al.* 2014b) ή στην επιδιόρθωση παραμορφώσεων ελαφριάς έντασης, όπως συνέβη στην περίπτωση του βραγχιακού επικαλύμματος (Beraldo and Canavese 2011, Amoroso *et al.* 2016). Στη παρούσα διδακτορική διατριβή, η μείωση της συχνότητας εμφάνισης της αιματικής λόρδωσης κατά την ανάπτυξη της τσιπούρας, δεν θα μπορούσε να αποδοθεί σε θανατηφόρα επίδραση της παραμόρφωσης, μιας και οι διαφορές στη θνησιμότητα μεταξύ των φυσιολογικών και λорδωτικών ψαριών δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Η μορφολογική παρακολούθηση των ηλεκτρονικά σημασμένων ατόμων έδειξε ότι η μείωση των παραμορφωμένων ατόμων ήταν αποτέλεσμα επιδιόρθωσης του λорδωτικού φαινοτύπου. Στο τέλος της περιόδου πάχυνσης, η ανάλυση της γεωμετρικής μορφομετρίας έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στο σχήμα του σώματος μεταξύ των ψαριών με επιδιορθωμένο φαινότυπο και των ψαριών που είχαν φυσιολογικό φαινότυπο από την έναρξη της παρακολούθησης (Εικόνα 3.12). Τέλος η επιδιόρθωση της λόρδωσης επιβεβαιώνεται και με τα ευρήματα της ακτινογραφικής εξέτασης στο τέλος της περιόδου πάχυνσης (Εικόνα 3.10).

Οι προτιμήσεις του καταναλωτή είναι άρρηκτα συνδεδεμένες με την εξωτερική μορφολογία των ψαριών (Losada *et al.* 2014, Fragkoulis *et al.* 2017a). Για αυτό το λόγο, κρίνεται αναγκαία η σχέση της εξωτερικής μορφολογίας με το σκελετό, ως σημαντικό βήμα για τη βέλτιστη ποιότητα των εκτρεφόμενων ψαριών. Οι αλλαγές στο σχήμα του σώματος λόγω της αιματικής λόρδωσης εξαρτώνται σημαντικά από τη γωνία της παραμόρφωσης στη σπονδυλική στήλη, καθώς επίσης και από τον αριθμό των παραμορφωμένων σπονδύλων (Sfakianakis *et al.* 2006a,b). Η αιματική λόρδωση έχει συγκεκριμένες επιπτώσεις στην εξωτερική μορφολογία, με κύρια χαρακτηριστικά τον κοντύτερο ουραίο μίσχο, ο οποίος μετατοπίζεται ραχιαία, ενώ επιπλέον παρατηρείται μια κοιλιακή μετατόπιση του εδρικού πτερυγίου (Sfakianakis *et al.* 2006a, Koumoundouros 2010). Στη παρούσα διδακτορική διατριβή η ραχιαία μετατόπιση του ουραίου μίσχου χρησιμοποιήθηκε για να διακρίνει τα λорδωτικά από τα φυσιολογικά άτομα. Αυτή η μέθοδος μορφολογικής κατηγοριοποίησης επιβεβαιώθηκε επιτυχώς από την ακτινογραφική ανάλυση του δείγματος ελέγχου (validation sample), το οποίο είχε συλλεχθεί κατά την έναρξη της μελέτης. Όλα τα ιχθύδια που είχαν λорδωτική εξωτερική μορφολογία έφεραν λόρδωση στη σπονδυλική τους στήλη. Η μεθοδολογία που εφαρμόστηκε δεν κατάφερε να διακρίνει 5% (4 στα 78) των ιχθυδίων με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία. Τα άτομα αυτά έφεραν λόρδωση ελαφριάς έντασης (Εικόνα 3.5). Η αρχική κατηγοριοποίηση επιβεβαιώθηκε και από τις σημαντικές διαφορές που παρατηρήθηκαν στο σχήμα του σώματος μεταξύ ιχθυδίων με φυσιολογική, λорδωτική και αβέβαιη εξωτερική μορφολογία (Εικόνα 3.11A).

Ιδιαίτερα σημαντική είναι η εύρεση μεθόδων που θα μπορούν να ποσοτικοποιήσουν τη γωνία της λόρδωσης σε μικρό χρονικό διάστημα και με το χαμηλότερο δυνατό κόστος. Μέχρι σήμερα η μόνη μέθοδος που μπορούσε να το κάνει αυτό ήταν η μελέτη της γωνίας με τη χρήση των ακτινογραφιών (Koumoundouros *et al.* 2000b). Η συγκεκριμένη μέθοδος ωστόσο έχει υψηλό κόστος, ενώ η διαδικασία είναι ευαίσθητη και απαιτεί συγκεκριμένες συνθήκες για την εξαγωγή άρτιου αποτελέσματος. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τόσο ακτινογραφίες όσο και ψηφιακές φωτογραφίες των ίδιων ατόμων προκειμένου να μελετηθεί η γωνία της αιματικής λόρδωσης σε σχέση με την εξωτερική μορφολογία, στο τέλος της περιόδου πάχυνσης. Από τη συσχέτιση της RWA με τα δύο είδη γωνιών, μόνο η εξωτερική γωνία της λόρδωσης ήταν ανάλογη με τις μεταβλητές του σχήματος (Εικόνα 3.14). Στην περίπτωση της εσωτερικής γωνίας, η RWA ήταν ανάλογη μόνο σε ένα τμήμα του

εύρους της γωνίας ($x \leq 132,4^\circ$). Ωστόσο η συγκεκριμένη ανάλυση μπόρεσε να ποσοτικοποιήσει μόνο τις περιπτώσεις που έχουν σοβαρές αποκλίσεις από τον φυσιολογικό εξωτερικό φαινότυπο (Εικόνα 3.15, RW1-). Αναγνωρίζεται έτσι η έλλειψη ευαισθησίας της RWA να διακρίνει τις ελαφριές εσωτερικές αλλοιώσεις που δεν έχουν επίδραση στην εξωτερική μορφολογία. Παρόμοια αδυναμία διάκρισης, παρατηρήθηκε και στο δείγμα ελέγχου, όπου η φαινοτυπική κατηγοριοποίηση αδυνατούσε να διακρίνει ένα μικρό ποσοστό ιχθυδίων με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία και εσωτερική λόρδωση ελαφριάς έντασης (5% των ιχθυδίων με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία, Εικόνα 3.5).

Για την ιχθυοκαλλιέργεια η συσχέτιση της εξωτερικής με την εσωτερική μορφολογία θα επιτρέψει τον έγκαιρο εντοπισμό των παραμορφωμένων ατόμων από πρώιμα στάδια. Η συσχέτιση των δύο γωνιών, θα επιτρέψει στον έγκαιρο εντοπισμό ακόμη και των ελαφρά παραμορφωμένων ατόμων, γεγονός που θα βοηθήσει στην γρήγορη απομάκρυνσή τους από την διαδικασία της παραγωγής. Σε παραμορφώσεις μάλιστα, που έχουν ισχυρό αντίκτυπο στην εικόνα του τελικού προϊόντος, η ανάγκη είναι ακόμα μεγαλύτερη. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, έγινε συσχέτιση της εξωτερικής και της εσωτερικής γωνίας που σχηματίζονται λόγω της επίδρασης της αιματικής λόρδωσης. Παρατηρείται για πρώτη φορά ένα σημείο καμπής, πέραν του οποίου, η εσωτερική γωνία της αιματικής λόρδωσης δεν έχει αντίκτυπο στην εξωτερική μορφολογία ($x > 125,3^\circ$, Εικόνα 3.16). Επιπλέον σε όσα άτομα δεν πραγματοποιήθηκε επιδιόρθωση της αιματικής λόρδωσης, η εξωτερική τους μορφολογία επιδεινώθηκε. Αυτή η απλή αναλογική σχέση των δύο γωνιών, μπόρεσε να συσχετίσει μια χρονοβόρα και κοστοβόρα μέθοδο (X-rays) με μία μέθοδο εύκολη και οικονομική (ψηφιακές φωτογραφίες), επιτρέποντας τη γρήγορη ποσοτικοποίηση της αιματικής λόρδωσης κατά τη διάρκεια της παραγωγής, χωρίς τη χρήση πολυπαραγοντικών αναλύσεων ή ακτινογραφικής απεικόνισης, μόνο με τον υπολογισμό της εξωτερικής γωνίας.

Επιπλέον η συσχέτιση της εξωτερικής μορφολογίας των ίδιων ατόμων στην έναρξη και τη λήξη της περιόδου πάχυνσης, έκανε δυνατή την ποσοτικοποίηση της εξωτερικής γωνίας και της εξέλιξης της κατά τη διάρκεια της πάχυνσης. Η ανάλυση έδειξε ότι σχεδόν σε όλες τις ομάδες η γωνία δεν διαφοροποιήθηκε μετά το σημείο καμπής, ενώ σε μερικές περιπτώσεις λορδωτικών ατόμων η γωνία μειώθηκε 10 μοίρες από την έναρξη μέχρι τη λήξη της πάχυνσης. Μόνο στην περίπτωση των επιδιορθωμένων λορδωτικών ατόμων παρατηρήθηκε αύξηση της εξωτερικής γωνίας, λόγω της επιδιόρθωσης της αιματικής λόρδωσης. Η συγκεκριμένη ανάλυση θα μπορούσε να

χρησιμοποιηθεί στο μέλλον, προκειμένου να υπολογίζεται η εξέλιξη της γωνίας της αιματικής λόρδωσης, ενδεχομένως και για την πρόβλεψη της επιδιόρθωσης της. Ιδανικότερη περίπτωση θα ήταν η μελέτη της εξωτερικής και εσωτερικής μορφολογίας ηλεκτρονικά σημασμένων λορδωτικών ιχθυδίων από την έναρξη μέχρι τη λήξη της πάχυνσης, για τον ακριβέστερο προσδιορισμό του ορίου μεταξύ της επιδιόρθωσης και της χειροτέρευσης της αιματικής λόρδωσης. Η δυσκολία του εγχειρήματος ωστόσο, έγκειται στην αδυναμία πλήρους ακινησίας των αναισθητοποιημένων ατόμων για μεγάλο χρονικό διάστημα, ώστε η ακτινογραφική απεικόνιση να έχει το βέλτιστο αποτέλεσμα.

Ο σκελετός των τελεόστεων ιχθύων υπόκειται σε διαρκή απορρόφηση (resorption), αναδιαμόρφωση (remodeling) και αναμόρφωση (reshaping). Οι διεργασίες αυτές πραγματοποιούνται σε όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής των ψαριών, τόσο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες (αντικατάσταση χόνδρινου ιστού από οστίτη ιστό, ανάπτυξη λόγω αλλομετρικής αύξησης) αλλά και κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες (επούλωση τραυμάτων, ανάπτυξη σκελετικών παραμορφώσεων, μηχανική καταπόνηση) (Witten and Huysseune 2009). Είναι ευρέως γνωστό ότι ο σκελετός των ιχθύων μπορεί και προσαρμόζει τη δομή του, ανάλογα με τα μηχανικά φορτία (Printzi *et al.* 2020). Τέτοια προσαρμογή μπορεί να γίνει είτε σε επίπεδο ιστού (Kranenbarg *et al.* 2005a), είτε σε επίπεδο οργάνου ή οστού (Kihara *et al.* 2002, Kranenbarg *et al.* 2005b). Μια τέτοια περίπτωση είναι η αιματική λόρδωση που οφείλεται στην δράση των υψηλών μηχανικών φορτίων των μυών πάνω στη σπονδυλική στήλη, κατά τη διάρκεια της κολύμβησης των ιχθυδίων στις δεξαμενές (Kranenbarg *et al.* 2005b, Printzi *et al.* 2020). Από τη στιγμή που οι λορδωτικοί σπόνδυλοι χαρακτηρίζονται από αυξημένο οστέινο όγκο, πεπλατυσμένες ραχιαίες ζυγαποφύσεις και επιπλέον πλευρικές συνδέσεις, η λόρδωση είχε προταθεί ότι αναπτύσσεται ως προσαρμοστικός μηχανισμός της σπονδυλικής στήλης στα αυξημένα μηχανικά φορτία (Suniaga *et al.* 2018).

Στην παρούσα διατριβή η επιδιόρθωση της λόρδωσης φαίνεται να είναι αποτέλεσμα δύο διαφορετικών διαδικασιών. Στη μερική έως ολική επιδιόρθωση της σπονδυλικής στήλης (στο 75,6% των ψαριών με επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία) και στην ανάπτυξη αντίρροπης κύφωσης πρόσθια της αιματικής λόρδωσης (Εικόνα 3.10D, στο 24,4% των ψαριών με επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία). Στην πρώτη περίπτωση παρατηρούμε αναδιαμόρφωση οστού και ιστού, καθώς αρχικά λορδωτικοί σπόνδυλοι, είτε είναι απόλυτα φυσιολογικοί είτε φέρουν μικρές αλλοιώσεις (Εικόνα 3.10A,B). Ωστόσο άγνωστο παραμένει πως άλλαξε η μορφολογία του οστού. Αναδιαμόρφωση

οστού έχει περιγραφεί σε παραμορφωμένους σπονδύλους σολομού (Witten *et al.* 2006). Σε αυτήν την περίπτωση οι παραμορφωμένοι σπόνδυλοι συντήχθηκαν σε ένα σπόνδυλο με ενιαίο σώμα το οποίο έφερε πολλαπλές αιματικές και νευρικές αποφύσεις. Στο σολομό, οι επιδιορθωμένοι σπόνδυλοι είχαν φυσιολογική ακτινογραφική εικόνα, ακολουθούμενη από την ιστολογική εξέταση, όπου παρατηρήθηκε μετασχηματισμός του νωτοχονδριακού και χόνδρινου ιστού και αναδιαμόρφωση των συντηγμένων σπονδυλικών κέντρων. Στην παρούσα εργασία, η περίπτωση της αντίρροπης κύφωσης είναι αναδιαμόρφωση που έγινε σε επίπεδο οργάνου. Κύριο χαρακτηριστικό σε αυτήν την περίπτωση ήταν η προσαρμογή (adaptation) της σπονδυλικής στήλης στη λόρδωση, αναπτύσσοντας μια δεύτερη παραμόρφωση που στόχευε στην εξισορρόπηση των τάσεων της λόρδωσης.

Τόσο η αναδιαμόρφωση σε επίπεδο οστού/ιστού όσο και σε επίπεδο οργάνου, ενδέχεται να οφείλεται στη μεταφορά των ψαριών στους θαλάσσιους κλωβούς, ένα περιβάλλον που συγκριτικά με τις δεξαμενές, παρατηρούνται χαμηλότερες ταχύτητες ρευμάτων. Κάτω από αυτήν την υπόθεση, η παρατηρούμενη επιδιόρθωση της λόρδωσης θα μπορούσε να είναι αποτέλεσμα της προσαρμογής των αναπτυσσόμενων σπονδύλων στο νέο κολυμβητικό περιβάλλον.

Ένα αναγκαίο χαρακτηριστικό που αναζητείται στην ευρωπαϊκή ιχθυοκαλλιέργεια είναι η γρήγορη αύξηση των ψαριών, προκειμένου να μειωθεί ο κύκλος παραγωγής. Ωστόσο η ταχύτερη αύξηση των ψαριών κατά την εκτροφή τους μπορεί να έχει ως συνέπεια την πρόκληση σπονδυλικών παραμορφώσεων (Rauw *et al.* 1998, Bardon *et al.* 2009). Στην παρούσα εργασία ελέγχθηκαν οι διαφορές στο ρυθμό αύξησης μεταξύ φυσιολογικών και λорδωτικών ψαριών. Σε όλους τους μορφομετρικούς χαρακτήρες που μελετήθηκαν (SL, HL, BD) τα λорδωτικά ψάρια είχαν υψηλότερες τιμές από τα φυσιολογικά στην αρχή του πειράματος (1 dpi, Εικόνα 3.18). Ωστόσο κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης, οι διαφορές αμβλύθηκαν, ανάλογα με το μορφομετρικό χαρακτήρα που εξετάζονταν. Φαίνεται ότι η λόρδωση έχει αρνητικό αντίκτυπο στη σωματική αύξηση των ψαριών, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από παρόμοιες περιπτώσεις σε άλλα είδη (McKay and Gjerde 1986, Bardon *et al.* 2009). Πιθανόν ο μειωμένος ρυθμός σωματικής αύξησης των παραμορφωμένων ατόμων να οφείλεται στο γεγονός ότι η παραμόρφωση δεν επιτρέπει στα ψάρια να κολυπήσουν σωστά, με αποτέλεσμα να έχουν μειωμένη πρόσβαση στη τροφή ή μεγαλύτερη ενεργειακή δαπάνη. Οι Bardon *et al.* (2009) παρατήρησαν στο ευρωπαϊκό λαβράκι ότι τα ιχθύδια που έφεραν σκελετικές παραμορφώσεις παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερο βάρος

από τα φυσιολογικά άτομα στα πρώιμα στάδια της πάχυνσης (35 και 100 γρ.), ενώ στο εμπορεύσιμο μέγεθος (400 και 800 γρ.) είχαν το μικρότερο βάρος. Πρότειναν ότι ο ταχύτερος ρυθμός αύξησης είναι χαρακτηριστικό των λорδωτικών ατόμων, ο οποίος όμως διατηρείται μέχρι τα πρώτα στάδια της περιόδου πάχυνσης. Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας επιβεβαιώνουν τα ευρήματα των Bardou *et al.* (2009). Στην έναρξη της περιόδου πάχυνσης τα λорδωτικά ιχθύδια είχαν μεγαλύτερο τυπικό μήκος αλλά και μεγαλύτερο βάρος από τα φυσιολογικά (Εικόνα 3.18, 3.19). Επιπλέον στο τέλος της πάχυνσης τα λорδωτικά άτομα παρουσίασαν μικρότερο μήκος και βάρος τόσο από τα επιδιορθωμένα όσο και από τα φυσιολογικά άτομα. Αξιοσημείωτο είναι ότι στους δύο αυτούς ποσοτικούς χαρακτήρες, τα επιδιορθωμένα άτομα ήταν το ίδιο μεγάλα σε μέγεθος με τα φυσιολογικά, αλλά βαρύτερα και από τις άλλες δύο κατηγορίες.

Είναι η πρώτη φορά που μελετάται ο σωματικός ρυθμός αύξησης ατόμων με επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία. Και αυτό γιατί μέχρι σήμερα δεν είχαν παρατηρηθεί πολλές περιπτώσεις παραμορφώσεων που να επιδιορθώνονται. Ακόμα και στην περίπτωση του βραγχιακού επικαλύμματος, η παρατήρηση της επιδιόρθωσης ήταν κυρίως περιγραφικού χαρακτήρα (Beraldo and Canavese, 2011). Στην παρούσα εργασία τα επιδιορθωμένα άτομα παρουσίασαν υψηλότερες τιμές τόσο για το ύψος του σώματος όσο και για το βάρος, σε όλη τη διάρκεια της πάχυνσης. Ενδέχεται ο ταχύτερος ρυθμός αύξησης που είχαν ως λорδωτικά άτομα μέχρι την έναρξη της πάχυνσης, να οδήγησε στην ανάπτυξη περισσότερων μυών, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τους δύο ποσοτικούς χαρακτήρες (Εικόνα 3.18, 3.19). Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώνεται και από το δείκτη ευρωστία K_{SL} , αφού στο τέλος της περιόδου πάχυνσης, τα επιδιορθωμένα άτομα είχαν υψηλότερη τιμή του δείκτη από τα φυσιολογικά (Εικόνα 3.21). Από την άλλη, το υψηλότερο ύψος του σώματος που είχαν σε όλη τη διάρκεια της πάχυνσης, πιθανόν να οφείλεται και στην ανάπτυξη της αντίρροπης κύφωσης.

Τέλος από την ανάλυση των δεικτών σχετικού βάρους, φάνηκε ότι το τυπικό μήκος δεν είναι κατάλληλος δείκτης (K_{SL}), λόγω της εξάρτησής του από την ένταση της παραμόρφωσης. Αλλά και ο δείκτης με βάση το ύψος του σώματος (K_{BD}) δεν θα μπορούσε να θεωρηθεί κατάλληλος, πιθανόν λόγω της δευτερογενούς συμμετοχής της λорδωσης με την ανάπτυξη της αντίρροπης κύφωσης. Ωστόσο ο δείκτης σχετικού βάρους με βάση το μήκος της κεφαλής (K_{HL}) έδειξε ότι τα λорδωτικά ψάρια ήταν ελαφρύτερα από τις άλλες κατηγορίες ψαριών σε όλη τη διάρκεια της πάχυνσης,

ενδεχομένως λόγω ανεξαρτησίας του παράγοντα με την ανάπτυξη της αιματικής λórδωσης.

Στην ιχθυοκαλλιέργεια, η ποιότητα των ιχθυδίων στο τέλος της φάσης παραγωγής γόνου (1-10 γρ. μέσο βάρος) θεωρείται κατάλληλος δείκτης για την ποιότητα του τελικού προϊόντος (>300 γρ. μέσο βάρος). Η παρούσα διδακτορική διατριβή ανέδειξε την επιδιόρθωση της αιματικής λórδωσης κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Όπως φάνηκε από την ανάλυση του σχήματος του σώματος (Εικόνα 3.13), η αναγνώριση των λορδωτικών ιχθυδίων που αναμένεται να επιδιορθωθούν κατά την περίοδο της πάχυνσης είναι δυνατή μέσω της γεωμετρικής μορφομετρίας. Στο μέλλον, η αυτόματη απομάκρυνση των λορδωτικών ιχθυδίων με μικρή δυνατότητα επιδιόρθωσης μπορεί να επιτευχθεί με την ενσωμάτωση ψηφιακών και υπολογιστικών συστημάτων στον ποιοτικό έλεγχο των εκτρεφόμενων ψαριών.

Κεφάλαιο 4^ο

Εξέλιξη της κρανιακής μορφολογίας

4.1. Εισαγωγή

Σημαντική κατηγορία σκελετικών παραμορφώσεων είναι αυτές που αναπτύσσονται στο κρανίο των ιχθύων. Οι κυριότερες παραμορφώσεις που εμφανίζονται σε είδη της μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας, είναι η αναδίπλωση προς τα μέσα του βραγχιακού επικαλύμματος, η κοντή άνω γνάθος, οι διασταυρούμενες γνάθοι καθώς και η κοιλιακή προβολή του υοειδούς οστού (ανασκόπηση από Koumoundouros 2010). Καθώς το κρανίο προστατεύει σημαντικά αισθητήρια όργανα για την επιβίωση των ψαριών, οι παραμορφώσεις που εμφανίζονται σε αυτήν την περιοχή του σώματος, μπορεί να έχουν σημαντική δράση σε ζωτικές λειτουργίες τους, όπως είναι η αναπνοή και η τροφοληψία (ανασκόπηση από Boglione *et al.* 2013), παρόλο που θεωρούνται υποθησιγόνες. Η ανάπτυξη κρανιακών παραμορφώσεων έχειδειχθεί ότι επηρεάζει σημαντικά τον ρυθμό αύξησης των ψαριών, ενώ αυξάνει την ευαισθησία τους σε ασθένειες (Paperna *et al.* 1980, Barahona-Fernandes 1982, Koumoundouros *et al.* 1997).

Ιδιαίτερη κατηγορία κρανιακών παραμορφώσεων είναι αυτές που αναπτύσσονται στις γνάθους. Περιπτώσεις όπως η κοντή άνω γνάθος (pugheadness), αλλά και η μείωση ή επιμήκυνση της κάτω γνάθου (reduction or elongation of the lower jaw), σχετίζονται άμεσα με το μέγεθος των εμπλεκόμενων οστών, ενώ η περίπτωση των διασταυρωμένων γνάθων (crossbite) έχει να κάνει με την ασύμμετρη ανάπτυξη της κάτω γνάθου, με αποτέλεσμα να μην είναι παράλληλη με την άνω γνάθο (ανασκόπηση από Koumoundouros 2010). Οι παραμορφώσεις των γνάθων, εμφανίζονται κατά τα πρώιμα οντογενετικά στάδια, και ειδικότερα στα πρώιμα νυμφικά στάδια όπου και πρωτοσηματίζονται τα οστά των γνάθων (Koumoundouros *et al.* 2000a, Faustino and Power 2001). Παράγοντες όπως η θερμοκρασία (Polo *et al.* 1991, Georgakopoulou *et al.* 2010), η εντατική μέθοδος εκτροφής (Izquierdo *et al.* 2010) και η διατροφή (Cobcroft *et al.* 2001, Cobcroft *et al.* 2004, Villeneuve *et al.* 2005a, b, 2006, Cobcroft and Battaglione 2009), όταν βρίσκονται σε μη επιθυμητά επίπεδα αυξάνουν τη συχνότητα εμφάνισης των παραμορφώσεων. Τα τελευταία χρόνια μάλιστα, παρατηρούνται εργασίες που διερευνούν τη συμμετοχή του γενετικού υποβάθρου στην ανάπτυξη ορισμένων τύπων κρανιακών παραμορφώσεων (García-Celdrán *et al.* 2016, Nguyen *et al.* 2016, Sawayama and Takagi 2016, Fragkoulis *et al.* 2018).

Ενώ η κατηγοριοποίηση της εξωτερικής μορφολογίας των γναθικών παραμορφώσεων είναι σχετικά εύκολη, η ανατομία τους είναι μια δύσκολη διαδικασία εξαιτίας των σκελετικών στοιχείων που εμπλέκονται (χόνδρος του Meckel, οδοντικό

οστό, αρθρικά οστά, γναθικά οστά, προγναθικά οστά κ.α.). Η πολυπλοκότητα αυτή οφείλεται κυρίως στη σύνθετη δομή που έχει το κρανίο των ψαριών, με τα διαφορετικά σκελετικά στοιχεία να είναι διατεταγμένα σε επικαλυπτόμενα επίπεδα, αλλά επιπλέον και στο μεγάλο οντογενετικό εύρος, κατά το οποίο ολοκληρώνεται η ανάπτυξη του κρανίου (στάδιο λεκιθοφόρου νύμφης μέχρι την έναρξη της μεταμόρφωσης, Koumoundouros *et al.* 2000a, Faustino and Power 2001).

Παρόλο που οι παραμορφώσεις της άνω γνάθου δεν είναι ειδο-ειδικές, παρατηρούνται πιο συχνά σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς τσιπούρας (Koumoundouros 2010). Πιο συχνά εμφανιζόμενη είναι αυτή της κοντής άνω γνάθους, με τα εμπλεκόμενα οστά να είναι το γναθικό (maxillary) και το προγναθικό (pre-maxillary) οστό και ενίοτε ο μεσογναθικός χόνδρος (rostral cartilage). Οι Fragkoulis *et al.* (2018) που μελέτησαν τις παραμορφώσεις της άνω γνάθου κατά την οντογένεσή τους, παρατήρησαν διαφορετικές παραμορφώσεις των εμπλεκόμενων οστών (σύντηξη, μείωση μεγέθους και κάμψη των εμπλεκόμενων οστών). Οι παραμορφώσεις αυτές θεωρούνται σιωπηλές, όταν η έντασή τους δεν επηρεάζει την εξωτερική μορφολογία. Άγνωστο παραμένει όμως, ποια είναι η εξέλιξη των παραπάνω παραμορφώσεων κατά την περίοδο της πάχυνσης εκτρεφόμενων πληθυσμών τσιπούρας.

Μέχρι σήμερα η μελέτη της οντογένεσης του σχήματος της κεφαλής, πραγματοποιούνταν ως μέρος του συνολικού σχήματος, χωρίς κάποια ιδιαίτερη έμφαση. Οι Fragkoulis *et al.* (2017a) παρατήρησαν πως όταν εκτρεφόμενοι πληθυσμοί τσιπούρας αναπτύσσονταν σε διαφορετικές συνθήκες κατά την περίοδο της πάχυνσης, η μορφολογία της κεφαλής παρουσίαζε διαφορές. Ωστόσο οι διαφορές αυτές πιθανόν να μην ανταποκρίνονται στις πραγματικές, καθώς η ανάλυση κανονικών μεταβλητών μπορεί να επηρεάζεται από τις αλλαγές που υπάρχουν σε άλλες περιοχές του σώματος. Είναι σημαντικό να δοθεί έμφαση στη μελέτη της οντογένεσης του σχήματος της κεφαλής, ξεχωριστά από το υπόλοιπο σώμα. Αυτό θα επιτρέψει την λεπτομερή και ακριβή μελέτη των οντογενετικών αλλαγών τόσο των παραμορφωμένων όσο και των φυσιολογικών ατόμων.

Στο παρόν κεφάλαιο, έγινε διερεύνηση της εξέλιξης των παραμορφώσεων της άνω γνάθου στην εξωτερική μορφολογία της τσιπούρας κατά την περίοδο της πάχυνσης. Επιπλέον μελετήθηκε η οντογένεση της φυσιολογικής μορφολογίας της κεφαλής. Λόγω της έντονης μορφολογίας που υπάρχει στο κρανίο εξαιτίας των πολλών εμπλεκόμενων στοιχείων (οστά των γνάθων, οστά του βραγχιακού επικαλύμματος κ.α.), χρησιμοποιήθηκαν περισσότερα μορφομετρικά ορόσημα επί της κεφαλής για την

ακριβέστερη και λεπτομερή μελέτη των οντογενετικών αλλαγών τόσο των παραμορφωμένων όσο και των φυσιολογικών ατόμων.

4.2 Υλικά και μέθοδοι

4.2.1. Πειραματικός σχεδιασμός

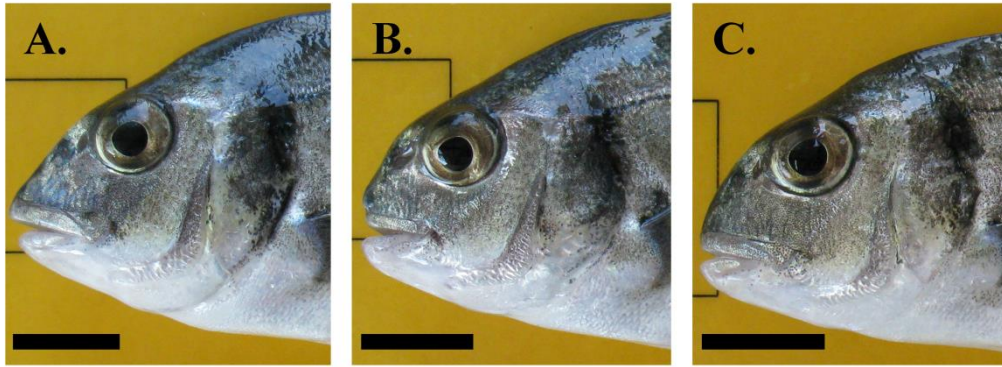
Για τη μελέτη της εξέλιξης των παραμορφώσεων και την οντογένεση της κεφαλής χρησιμοποιήθηκε δείγμα του πειραματικού πληθυσμού που σημάνθηκε ηλεκτρονικά (Πίνακας 4.1). Οι συνθήκες εκτροφής, οι παράμετροι, η διαδικασία ηλεκτρονικής σήμανσης αλλά και η διαδικασία φωτογράφισης, περιγράφονται στο δεύτερο κεφάλαιο (§2.2.1 σελίδα 22).

Πίνακας 4.1. Αριθμός των ενηλίκων ψαριών τα οποία μελετήθηκαν κατά την περίοδο της πάχυνσης για την εξέλιξη της κρανιακής μορφολογίας. Abn#, ψάρια με παραμορφωμένα οστά της άνω γνάθου, Abn*, ψάρια με φυσιολογικά οστά της άνω γνάθου και παραμορφωμένο προφίλ κεφαλής, Nor, ψάρια με φυσιολογική κρανιακή μορφολογία. dpt, days post tagging, μέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.

Final phenotype (434 dpt)	Initial phenotype (1 dpt)	n
	Nor	142
Nor	Abn*	25
	Abn#	2
	Nor	3
Abn*	Abn*	30
	Abn#	1
	Nor	0
Abn#	Abn*	2
	Abn#	114

4.2.2. Κατηγοριοποίηση της εξωτερικής μορφολογίας

Σε κάθε δειγματοληψία ο έλεγχος της εξωτερικής μορφολογίας γινόταν ανεξάρτητα από την ταυτοποίηση των ψαριών με τον αριθμό της ηλεκτρονικής μάρκας. Ο διαχωρισμός των παραμορφωμένων ατόμων από τα φυσιολογικά στηρίχτηκε στην ύπαρξη σκελετικών παραμορφώσεων στα γναθικά και προγναθικά οστά της άνω γνάθου (Abn#, Εικόνα 4.1B). Επιπλέον παρατηρήθηκε μια κατηγορία ιχθύων τα οποία δεν έφεραν αλλοιώσεις στα οστά της άνω γνάθου, αλλά παρουσίαζαν μια κάθετη προβολή του προφίλ τους (Abn*, Εικόνα 4.1C).



Εικόνα 4.1. Αντιπροσωπευτικές περιπτώσεις ιχθυδίων τσιπούρας κατά την ηλεκτρονική σήμανση (1 dpt). A. Ιχθύδιο με φυσιολογική κρανιακή μορφολογία. B. Ιχθύδιο με παραμορφωμένα οστά της άνω γνάθου (Abn#). C. Ιχθύδιο με παραμορφωμένο προφίλ κεφαλής (Abn*). Οι κλίμακες ισούται με 1 cm.

4.2.3. Μορφομετρική ανάλυση

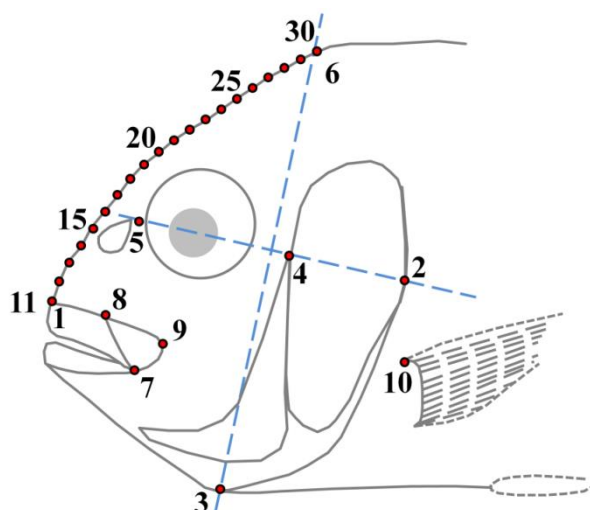
4.2.3.1. Σκελετικές παραμορφώσεις κεφαλής

Για τη μελέτη των διαφορών στο σχήμα της κεφαλής μεταξύ φυσιολογικών και παραμορφωμένων ατόμων στην πρώτη δειγματοληψία (1dpt) χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της γεωμετρικής μορφομετρίας. Η ανάλυση περιλάμβανε όλα τα ιχθύδια που είχαν παραμορφωμένα τα οστά της άνω γνάθου (Abn#, n=117), όλα τα ιχθύδια που έφεραν κάθετη προβολή στο προφίλ τους (Abn*, n=57) και τυχαίο δείγμα φυσιολογικών ιχθυδίων (Nor, n=145). Η ίδια ανάλυση πραγματοποιήθηκε για όλα τα άτομα και στις 434 dpt (Πίνακας 4.1).

Κατά τη διάρκεια της πάχυνσης, φάνηκε ότι η εξωτερική μορφολογία των ατόμων με παραμορφωμένο προφίλ (Abn*) επιδιορθώνεται. Έτσι πραγματοποιήθηκε γεωμετρική μορφομετρική ανάλυση προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσο η επιδιόρθωση αυτής της μορφο-ανατομικής ανωμαλίας μπορεί να προβλεφθεί από το στάδιο του ιχθυδίου (1 dpt). Τα ιχθύδια κατηγοριοποιήθηκαν ως προς την εξωτερική μορφολογία που είχαν στο τέλος της πάχυνσης (434 dpt). Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα ιχθύδια που διατήρησαν την παραμορφωμένη εξωτερική τους μορφολογία (Abn*) και τα άτομα που παρουσίασαν βελτιωμένη εξωτερική μορφολογία (N-Rec#). Επιπλέον συμπεριλήφθηκαν 36 τυχαία φυσιολογικά ιχθύδια ως ομάδα ελέγχου.

Σε όλες τις αναλύσεις τοποθετήθηκαν πάνω στις ψηφιακές φωτογραφίες των ατόμων 10 μορφομετρικά ορόσημα landmarks) και 20 ημι-ορόσημα (semi-landmarks), με τη χρήση του λογισμικού tpsDig2 (Rohlf 2010a, version 2.17, Εικόνα 4.2). Τα δέκα

μορφομετρικά ορόσημα τοποθετήθηκαν σε συγκεκριμένες ανατομικές περιοχές της κεφαλής, ενώ τα ημι-ορόσημα τοποθετήθηκαν πάνω στο προφίλ της κεφαλής, στη νοητή γραμμή που οριζόταν από τα ορόσημα 1 και 6, σε ίσες αποστάσεις (Εικόνα 4.2). Για τις μορφομετρικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MorphoJ (Klingenberg, 2011). Για τη μέση διαμόρφωση του σχήματος αλλά και του κεντροειδούς μεγέθους, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Προκρούστη (Procrustes superimposition). Οι νέες μεταβλητές που προέκυψαν (Procrustes coordinates), αξιοποιήθηκαν στη συνέχεια για την αφαίρεση κάθε επίδρασης που θα μπορούσε να έχει το μέγεθος και η αλλομετρία. Τέλος πραγματοποιήθηκε ανάλυση κανονικών συνιστωσών (Canonical Variate Analysis, CVA) προκειμένου να εκτιμηθούν οι διαφορές του σχήματος μεταξύ των διαφορετικών ομάδων.



Εικόνα 4.2. Θέσεις των 30 μορφομετρικών οροσήμων (landmarks). (1) άνω πρόσθιο άκρο του ρύγχους, (2) οπίσθιο άκρο του βραγχιακού επικαλύμματος, (3) κοιλιακή βάση του βραγχιακού επικαλύμματος, (4) ραχιαίο άκρο του προ-επικαλυμματικού οστού, (5) διάκενο μεταξύ ρώθωνα και οφθαλμικής κόγχης, (6) ανώτατο ραχιαίο σημείο τομής όπως ορίζεται από την προέκταση των καθέτων προβολών στο ύψος της κοιλιακής βάσης του βραγχιακού επικαλύμματος, (7) κατώτατο όριο της βάσης του γναθικού οστού, (8) πρόσθιο ραχιαίο σημείο της βάσης του γναθικού οστού, (9) οπίσθιο ραχιαίο σημείο της βάσης του γναθικού οστού, (10) ραχιαία βάση των θωρακικών πτερυγίων, (11-30) ισαπέχοντα ορόσημα που ορίζουν το προφίλ της κεφαλής, μεταξύ των οροσήμων (1) και (6). Η απόσταση μεταξύ των οροσήμων 1 και 2 ορίζεται ως μήκος κεφαλής (Head Length, HL).

4.2.3.2. Οντογένεση της κεφαλής των φυσιολογικών ατόμων

Για τη μελέτη της οντογένεσης της κεφαλής στα φυσιολογικά άτομα, χρησιμοποιήθηκαν 142 ιχθύδια που είχαν φυσιολογική μορφολογία κεφαλής σε όλη τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης (Πίνακας 4.1). Η μεθοδολογία για τη μελέτη της

οντογένεσης των φυσιολογικών ατόμων, αλλά και τη συσχέτιση του σχήματος μεταξύ διαφορετικών σταδίων, περιγράφεται στο δεύτερο κεφάλαιο (§2.2.2).

Επιπλέον για την ποσοτικοποίηση του μεγέθους της κεφαλής, χρησιμοποιήθηκε το κεντροειδές μέγεθος (centroid size, CS). Το κεντροειδές μέγεθος είναι ένας δείκτης κλίμακας μεγέθους, που χρησιμοποιείται ευρέως στις αναλύσεις γεωμετρικής μορφομετρίας (Klingenberg 2016) και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$CS = \sqrt{\sum (CP - L_i)^2}$$

(Εξίσωση 4.1) (Zelditch 2012)

όπου CS είναι το κεντροειδές μέγεθος, CP το κεντροειδές σημείο και L_i είναι κάθε ορόσημο. Το κεντροειδές σημείο κάθε ατόμου είναι το σημείο του οποίου οι συντεταγμένες είναι οι μέσες τιμές των X και Y συντεταγμένων των μορφομετρικών οροσήμων. Το κεντροειδές σημείο υπολογίζεται από τις εξισώσεις:

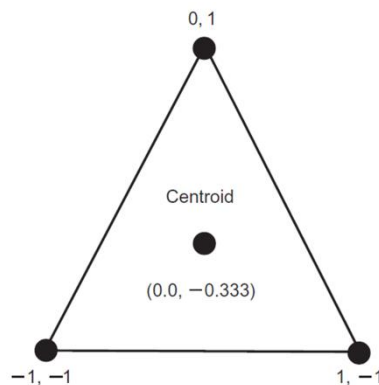
$$X_{CP} = \frac{1}{K} \sum_{j=1}^K X_j$$

(Εξίσωση 4.2)

$$Y_{CP} = \frac{1}{K} \sum_{j=1}^K Y_j$$

(Εξίσωση 4.3)

όπου X_{CP} και Y_{CP} είναι οι συντεταγμένες X και Y του κεντροειδούς σημείου αντίστοιχα, K ο αριθμός των μορφομετρικών οροσήμων και X_j , Y_j είναι οι X και Y συντεταγμένες του κάθε ορόσημου (Εικόνα 4.3).



Εικόνα 4.3. Συντεταγμένες κεντροειδούς σημείου όπως υπολογίστηκαν από τις εξισώσεις 4.2 και 4.3. (η εικόνα είναι από Zelditch 2012).

Για τον υπολογισμό του σημείου καμπής στη σχέση της RW1 και του κεντροειδούς μεγέθους, εφαρμόστηκε ειδική μορφή γραμμικής παλινδρόμησης (κατά τμήματα γραμμική παλινδρόμηση, piecewise linear regression):

$$RW1=b_0+b_1*CS+b_2*(CS - b_3)*(CS \geq b_3),$$

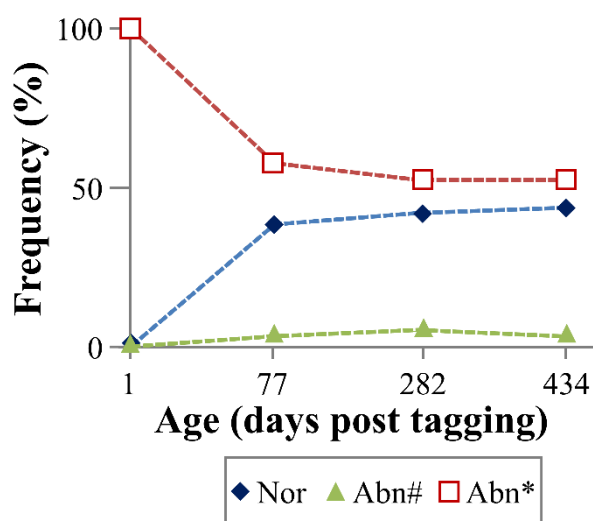
όπου RW1 είναι η εξεταζόμενη μεταβλητή, b_0 είναι το σημείο τομής με τον y άξονα, b_1 η κλίση της ευθείας RW1 - CS κατά το πρώτο κομμάτι της ευθείας, b_2 είναι η αλλαγή κλίσης που οδηγεί στο δεύτερο κομμάτι της σχέσης RW1 - CS και b_3 είναι η γωνία στο σημείο καμπής (Nikolioudakis *et al.* 2010).

4.3. Αποτελέσματα

4.3.1. Κρανιακές παραμορφώσεις

Εξέλιξη των κρανιακών παραμορφώσεων κατά την περίοδο της πάχυνσης

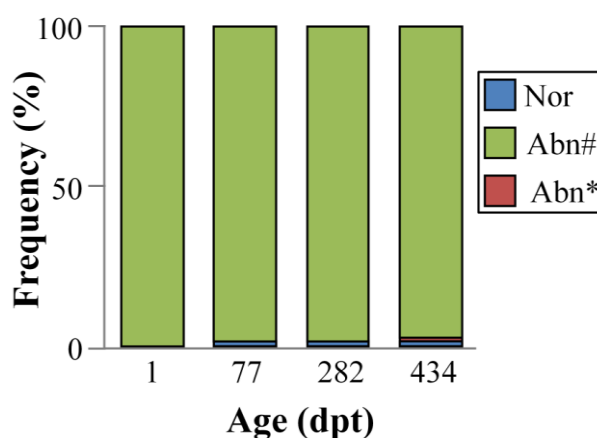
Από την εξατομικευμένη παρακολούθηση των παραμορφωμένων ατόμων, σημαντικές αλλαγές παρατηρήθηκαν κυρίως στα άτομα που ήταν παραμορφωμένα ως προς το προφίλ (Abn*, Εικόνα 4.4), ενώ κάτι τέτοιο δεν παρατηρήθηκε για τα άτομα που ήταν παραμορφωμένα ως προς τα γναθικά οστά (Abn#, Εικόνα 4.5). Πιο συγκεκριμένα, η εξατομικευμένη παρακολούθηση των Abn* ατόμων, έδειξε ότι το 38,6% από αυτά παρουσίασαν φυσιολογική εξωτερική μορφολογία στις 77 dpt, ενώ στο τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt) τα άτομα που παρουσίασαν φυσιολογική μορφολογία ανήλθαν σε ποσοστό 43,9%. Στην ίδια περίοδο το 3,5% των Abn* ατόμων εμφάνισε αλλοιώσεις στα οστά τις άνω γνάθου (Εικόνα 4.4).



Εικόνα 4.4. Εξέλιξη της κεφαλικής μορφολογίας των αρχικά παραμορφωμένων (ως προς το προφίλ τους) ιχθυδίων σε όλη τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Nor, ψάρια με φυσιολογική κεφαλική μορφολογία. Abn#, ψάρια με παραμορφωμένα γναθικά οστά. Abn*, παραμορφωμένα ψάρια ως προς το προφίλ τους. dpt, days post tagging, μέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.

Όσον αφορά τα ψάρια που ήταν παραμορφωμένα ως προς τα οστά της άνω γνάθου (Abn#), δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στην εξωτερική τους μορφολογία κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Κατά την εξατομικευμένη παρακολούθηση, μόλις το 1,7% των Abn# παρουσίασε φυσιολογική εξωτερική μορφολογία από τις 77 dpt και μέχρι το τέλος της περιόδου πάχυνσης. Τέλος το 0,9% των Abn#, φάνηκε να

επιδιορθώνεται ως προς τα οστά της άνω γνάθου, ενώ ταυτόχρονα παρουσίασε παραμορφωμένο προφίλ το τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt, Εικόνα 4.5).



Εικόνα 4.5. Εξέλιξη της κεφαλικής μορφολογίας των αρχικά παραμορφωμένων (ως προς τα γναθικά οστά) ιχθυδίων σε όλη τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Nor, ψάρια με φυσιολογική κεφαλική μορφολογία. Abn#, ψάρια με παραμορφωμένα γναθικά οστά. Abn*, παραμορφωμένα ψάρια ως προς το προφίλ τους. dpt, days post tagging, μέρες μετά την ηλεκτρονική σήμανση.

Επίδραση των σκελετικών παραμορφώσεων στο σχήμα της κεφαλής

Η ανάλυση κανονικών μεταβλητών έδειξε ότι οι σκελετικές παραμορφώσεις της άνω γνάθου επηρεάζουν σημαντικά το σχήμα της κεφαλής, τόσο στην αρχή (1 dpt) όσο και στο τέλος (434 dpt) της περιόδου πάχυνσης (Εικόνα 4.6). Και στις δύο αναλύσεις, η πρώτη κανονική μεταβλητή (CV1) εξήγησε το μεγαλύτερο ποσοστό της διακύμανσης του σχήματος (74,8 - 84,8%), διαχωρίζοντας τα παραμορφωμένα άτομα ως προς τα γναθικά οστά (Abn#) από τα φυσιολογικά ψάρια (Nor) (Εικόνα 4.6). Τα παραμορφωμένα άτομα ως προς το προφίλ (Abn*), βρίσκονταν ανάμεσα στις δύο ομάδες (Εικόνα 4.6, Πίνακας 4.2). Οι ανυσματικές απεικονίσεις έδειξαν ότι τα ορόσημα που διακρίνουν τα φυσιολογικά από τα παραμορφωμένα βρίσκονται στην περιοχή της άνω γνάθου (L1, L7, L8, L9, Εικόνα 4.6A). Επιπλέον στα φυσιολογικά άτομα τα ορόσημα που σχετίζονται με το βραγχιακό επικάλυμμα (L2, L3, L4, L10) παρουσίασαν μια ραχιαία μετατόπιση, έναντι των παραμορφωμένων, στα οποία τα αντίστοιχα ορόσημα ήταν μετατοπισμένα κοιλιακά (Εικόνα 4.6A).

Όσον αφορά στη δεύτερη κανονική μεταβλητή (CV2, 15,2 - 25,2% της συνολικής διακύμανσης), διακρίθηκαν τα παραμορφωμένα άτομα ως προς το προφίλ τους (Abn*), έναντι των άλλων δύο ομάδων και στις δύο δειγματοληψίες. Ωστόσο στην πρώτη

δειγματοληψία οι ανυσματικές απεικονίσεις των Abn*, έδειξαν ραχιαία μετατόπιση των ημι-οροσήμεων που βρίσκονται στην περιοχή του οφθαλμού (15 - 24), ενώ τα υπόλοιπα ημι-ορόσημα παρουσίασαν κοιλιακή μετατόπιση (Εικόνα 4.6A), ενώ στις 434 dpt, τα ημι-ορόσημα (15 - 24) δεν παρουσίασαν σημαντικές αλλαγές μεταξύ των ομάδων (Εικόνα 4.6B).

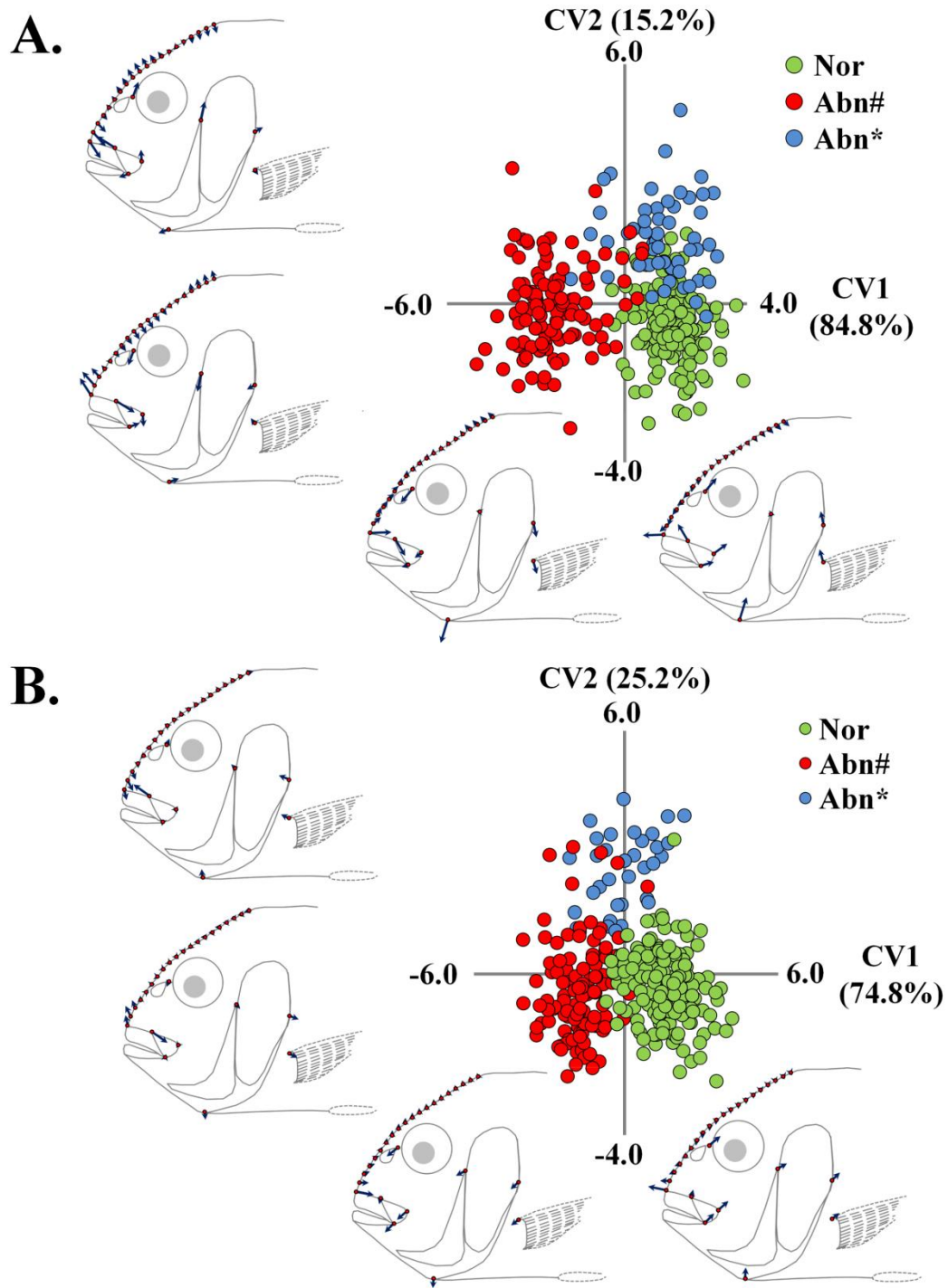
Πίνακας 4.2. Τετράγωνα των αποστάσεων Mahalanobis μεταξύ των διαφορετικών ομάδων καθώς και τα επίπεδα σημαντικότητάς τους στην αρχή και στο τέλος της περιόδου πάχυνσης (1 και 434 dpt αντίστοιχα). Nor, ιχθύδια με φυσιολογική μορφολογία κεφαλής. Abn*, παραμορφωμένα ιχθύδια ως προς το προφίλ της κεφαλής. Abn#, παραμορφωμένα ιχθύδια ως προς τα γναθικά οστά. ***, $p < 0,01$. n, αριθμός ατόμων σε κάθε ομάδα.

	Sample	Nor	Abn*	Abn#
Nor		-	2,3044	4,133
Abn*	1 dpt	***	-	4,1602
Abn#		***	***	-
n		145	57	117
Nor		-	3,2929	3,3347
Abn*	434 dpt	***	-	3,4349
Abn#		***	***	-
n		169	34	116

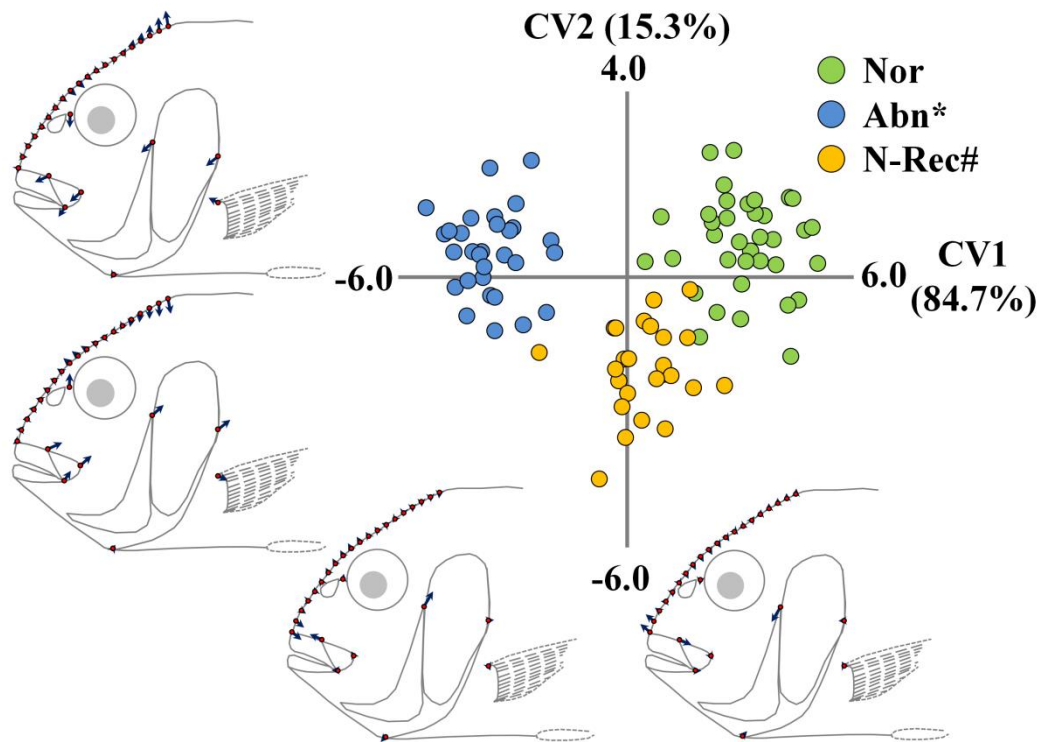
Με βάση την εξέλιξη των σκελετικών παραμορφώσεων πραγματοποιήθηκε επιπλέον μορφομετρική ανάλυση, προκειμένου να εντοπιστούν μορφολογικές αποκλίσεις των ιχθυδίων που παρουσίασαν βελτιωμένη εξωτερική μορφολογία στο τέλος της περιόδου πάχυνσης. Για την ανάλυση αποκλείστηκαν τα ιχθύδια με παραμορφωμένα γναθικά οστά (Abn#), καθώς το 97,4% αυτής της κατηγορίας δεν παρουσίασε καμία βελτίωση ως το τέλος της περιόδου πάχυνσης.

Η πρώτη κανονική μεταβλητή, που εξηγεί το 84,7% της συνολικής διακύμανσης, διέκρινε τα φυσιολογικά άτομα (Nor) από τα παραμορφωμένα ως προς το προφίλ (Abn*), ενώ τα άτομα στα οποία βελτιώνεται η μορφολογία τους (N-Rec#), βρίσκονται ενδιάμεσα. Η ενδιάμεση θέση των N-Rec# προτείνει ότι είχαν μικρότερες διαφορές σχήματος από τα φυσιολογικά (Πίνακας 4.3).

Στην δεύτερη κανονική μεταβλητή (CV2, 15,3% της συνολικής διακύμανσης), διακρίθηκε η ομάδα των N-Rec# από τις άλλες δύο μορφολογικές κατηγορίες. Σύμφωνα με τις ανυσματικές απεικονίσεις, οι κύριες μορφολογικές διαφορές εντοπίστηκαν στην περιοχή ραχιαία του οφθαλμού (ημι-ορόσημα 26 - 30), τα οποία στην ομάδα των N-Rec# παρουσίασαν κοιλιακή μετατόπιση, ενώ στις άλλες δύο ομάδες η μετατόπιση αυτών των οροσήμεων ήταν ραχιαία (Εικόνα 4.7).



Εικόνα 4.6. Κατανομή των ιχθυδίων στην A) έναρξη (1 dpt) και B) στο τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt), με φυσιολογική μορφολογία (Nor), παραμορφωμένα γναθικά οστά (Abn*) και παραμορφωμένο προφίλ (Abn#) κατά μήκος των δύο αξόνων της ανάλυσης κανονικών μεταβλητών (CV1, CV2). Στις παρενθέσεις δίνονται τα ποσοστά της φαινοτυπικής διακύμανσης που εξηγούνται από κάθε κανονική μεταβλητή. Οι ανυσματικές απεικονίσεις (x10) δείχνουν την αλλαγή στο σχήμα της κεφαλής κατά μήκος των δύο αξόνων.



Εικόνα 4.7. Κατανομή των παραμορφωμένων ιχθυδίων ως προς το προφίλ στην έναρξη της πάχυνσης (1 dpt) κατά μήκος των δύο πρώτων κανονικών μεταβλητών (CV1, CV2). Τα ιχθύδια κατηγοριοποιήθηκαν με βάση την εξωτερική μορφολογία που είχαν στο τέλος της πάχυνσης (434 dpt). Τα ιχθύδια διακρίθηκαν σε ψάρια με παραμορφωμένο προφίλ (Abn*), ψάρια με επιδιορθωμένη μορφολογία κεφαλής (N-Rec#) και ψάρια με φυσιολογική μορφολογία κεφαλής (Nor). Στις παρενθέσεις δίνονται τα ποσοστά της συνολικής φαινοτυπικής διακύμανσης που εξηγούνται από κάθε κανονική μεταβλητή. Οι ανυσματικές απεικονίσεις (x10) δείχνουν τις μορφολογικές διαφορές στις ακραίες τιμές κατά μήκος των CV1, CV2 αξόνων.

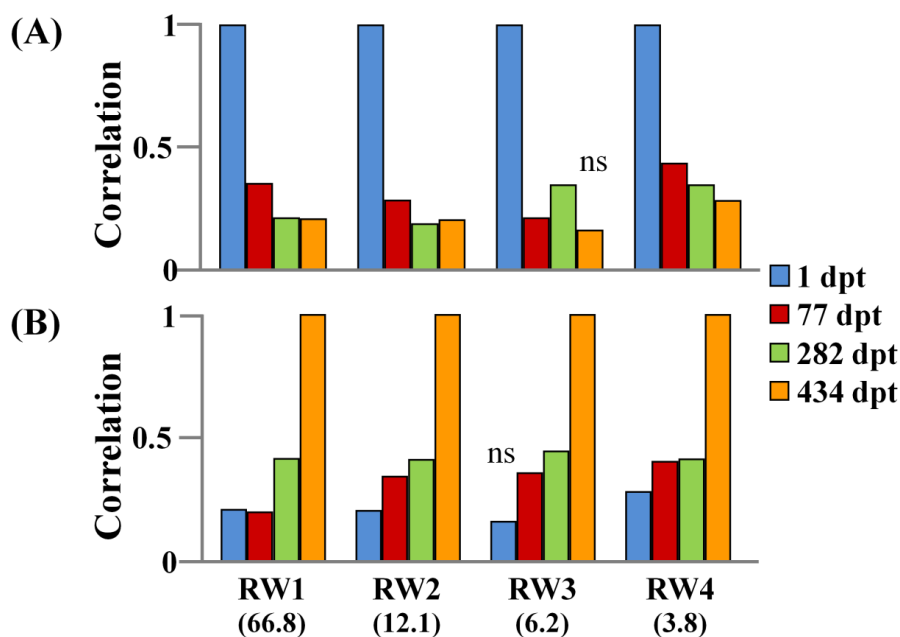
Πίνακας 4.3. Τετράγωνα των αποστάσεων Mahalanobis μεταξύ των διαφορετικών ομάδων καθώς και τα επίπεδα σημαντικότητάς τους στην έναρξη της περιόδου πάχυνσης (1 dpt). Nor, ψάρια με φυσιολογική μορφολογία κεφαλής. Abn*, παραμορφωμένα ψάρια ως προς το προφίλ της κεφαλής. N-Rec#, ιχθύδια που θα έχουν επιδιορθωμένη μορφολογία κεφαλής στο τέλος της περιόδου πάχυνσης (434 dpt). ***, $p < 0,01$. n, αριθμός ατόμων σε κάθε ομάδα.

	Nor	Abn*	N-Rec#
Nor	-	6,1069	3,2454
Abn*	***	-	4,7742
N-Rec#	***	***	-
n	36	30	25

4.3.2. Φυσιολογική μορφολογία της κεφαλής

Συσχέτιση του σχήματος της κεφαλής μεταξύ των ιχθυδίων και των ενηλίκων

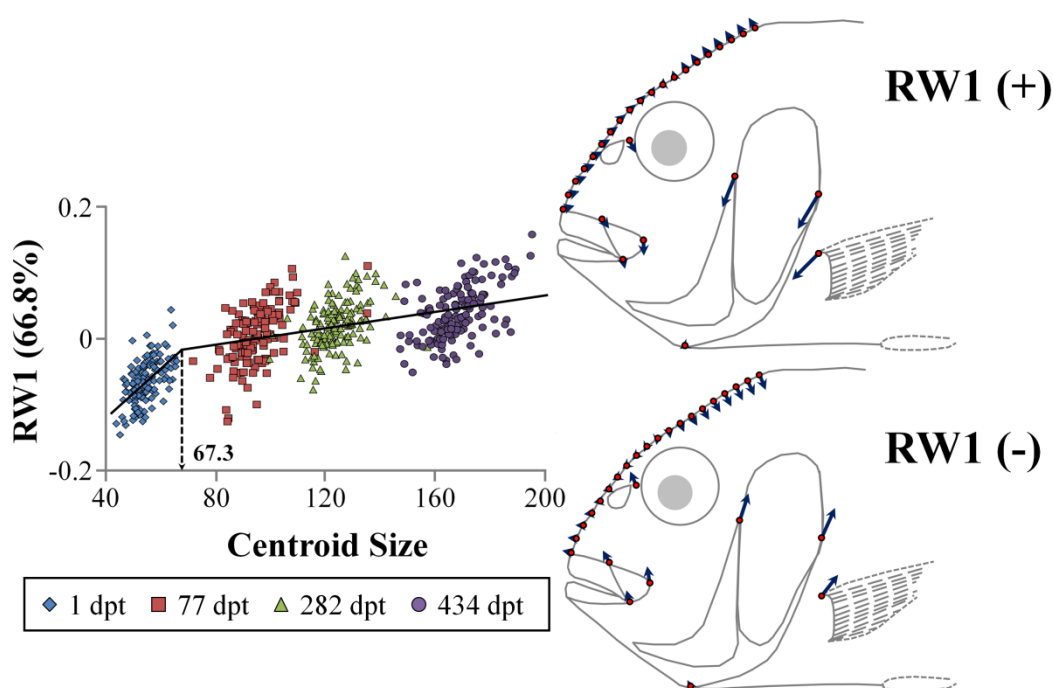
Η ανάλυση σχετικών στρεβλώσεων από όλα τα άτομα και όλες τις δειγματοληψίες, διέκρινε πενήντα έξι μεταβλητές, εκ των οποίων οι πρώτες τέσσερις εξήγησαν αθροιστικά το 88,9% της συνολικής διακύμανσης (Εικόνα 4.8). Προκειμένου να εξεταστεί το κατά πόσο διαφορετικές παράμετροι του σχήματος παρουσίασαν διαφορετικές συσχετίσεις μεταξύ των δειγματοληψιών, ελέγχθηκαν οι συσχετίσεις μεταξύ της πρώτης και της τελευταίας δειγματοληψίας (εφεξής δείγματα αναφοράς) για τις RW1 - RW4. Σημαντικές συσχετίσεις ($p < 0,05$) παρατηρήθηκαν στις περισσότερες των περιπτώσεων, είτε έχοντας ως δείγμα αναφοράς την πρώτη δειγματοληψία (Εικόνα 4.8A), είτε την τελευταία (Εικόνα 4.8B). Η μόνη συσχέτιση που δεν ήταν στατιστικά σημαντική, εντοπίστηκε στην RW3 μεταξύ της πρώτης και της τελευταίας δειγματοληψίας ($r = 0,16$). Όσον αφορά στις υπόλοιπες μεταβλητές, οι συσχετίσεις κυμαίνονταν μεταξύ 0,19 και 0,45 με την υψηλότερη να σημειώνεται στην RW3 μεταξύ της τρίτης και πέμπτης δειγματοληψίας.



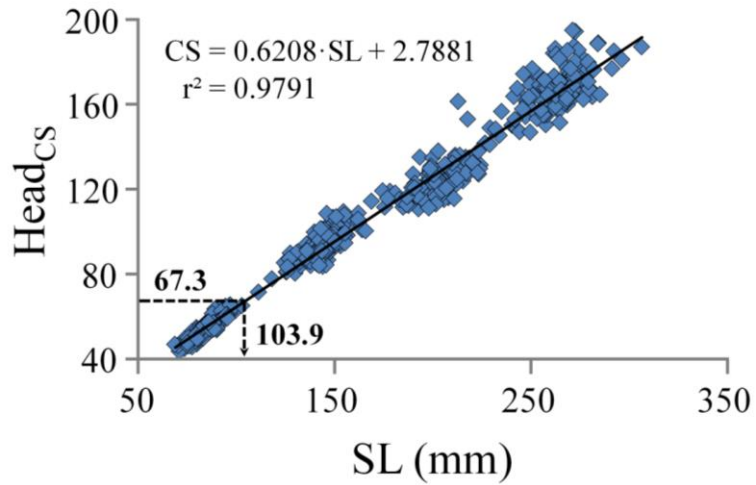
Εικόνα 4.8. Α. Συντελεστής συσχέτισης Pearson's μεταξύ των μεταβλητών των σχετικών στρεβλώσεων (RWs) του σταδίου των ιχθυδίων (1 dpt) με τις επόμενες δειγματοληψίες μέχρι το τέλος της πάχυνσης (434 dpt). Β. Συντελεστής συσχέτισης Pearson's μεταξύ των RW του τελευταίου σταδίου (434 dpt) με τις προηγούμενες δειγματοληψίες (1 – 371 dpt). Ο συντελεστής συσχέτισης υπολογίστηκε για τις πρώτες τέσσερις σχετικές μεταβλητές, που εξηγούσαν το 88,9% της συνολικής διακύμανσης του σχήματος του σώματος. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις εξηγούν το ποσοστό της διακύμανσης της κάθε σχετικής μεταβλητής. ns, $p > 0,05$. Όλες οι συσχετίσεις ήταν στατιστικά σημαντικές ($p < 0,05$) εκτός των RW3 συσχετίσεων με το σύμβολο "ns".

Οντογένεση της κεφαλής των φυσιολογικών ατόμων

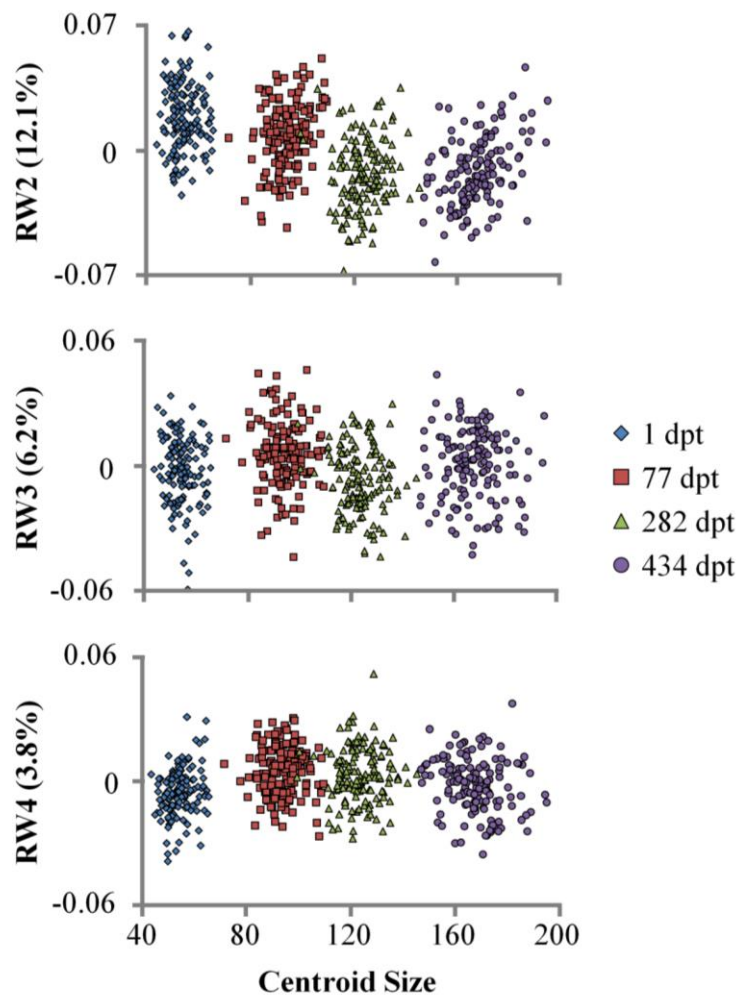
Για τη μελέτη της οντογένεσης της κεφαλής πραγματοποιήθηκε ανάλυση σχετικών στρεβλώσεων (RWA). Η RW1 (66,8% της συνολικής διακύμανσης) παρουσίασε σημαντικές οντογενετικές αλλαγές όταν συσχετιζονταν με το κεντροειδές μέγεθος (CS, Εικόνα 4.9). Το σημείο καμπής παρατηρήθηκε στο CS=67,3 που αντιστοιχούσε σε SL=103,9 mm (Εικόνα 4.10). Μετά το σημείο καμπής δεν παρατηρήθηκαν έντονες οντογενετικές αλλαγές μέχρι το τέλος της περιόδου πάχυνσης. Οι οντογενετικές αλλαγές μεταξύ του σταδίου των ιχθυδίων και του σταδίου των ενηλίκων αφορούσαν κυρίως την περιοχή του βραγχιακού επικαλύμματος, την θέση των θωρακικών πτερυγίων αλλά και την περιοχή που βρίσκεται πίσω από τον οφθαλμό. Πιο συγκεκριμένα, τα ιχθυόδια (RW1-), παρουσίασαν μια οπισθιο-ραχιαία μετατόπιση των οροσήμων 2,4,10, ενώ τα ημι-ορόσημα 22 - 30 ήταν μετατοπισμένα κοιλιακά. Από την άλλη τα ενήλικα άτομα (RW1+) είχαν μετατοπισμένα τα ορόσημα 2,4,10 πιο προσθιο-κοιλιακά, ενώ τα ορόσημα 22 - 30 ήταν μετατοπισμένα ραχιαία (Εικόνα 4.9). Σε αντίθεση με την RW1, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στις υπόλοιπες υπό εξέταση μεταβλητές σχετικών στρεβλώσεων (RW2 - RW4) όταν αυτές σχετιζονταν με το κεντροειδές μέγεθος (Εικόνα 4.11).



Εικόνα 4.9. Σχέση της πρώτης μεταβλητής σχετικών στρεβλώσεων με το κεντροειδές μέγεθος (centroid size, CS) κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Τα διανυσματικά διαγράμματα δείχνουν τις αλλαγές στη μορφολογία της κεφαλής στις ακραίες τιμές του Y-άξονα.



Εικόνα 4.10. Συσχέτιση του κεντροειδούς μεγέθους (CS) με το τυπικό μήκος (SL) με όλα τα ψάρια που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ($r^2=0,9791$, $p<0,01$).



Εικόνα 4.11. Σχέση της δεύτερης (RW2), τρίτης (RW3) και τέταρτης (RW4) μεταβλητής σχετικών στρεβλώσεων με το CS κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης.

4.4. Συζήτηση

Στο παρόν κεφάλαιο εξετάστηκε η μορφολογία της κεφαλής σε εκτρεφόμενο πληθυσμό τσιπούρας κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης τόσο σε παραμορφωμένα όσο και σε φυσιολογικά άτομα.

Η οντογένεση του σχήματος των ψαριών είναι μια διαδικασία που μελετάται κυρίως κατά τα πρώιμα οντογενετικά στάδια, εξαιτίας των σημαντικών μορφολογικών αλλαγών που γίνονται προκειμένου οι οργανισμοί να μεταμορφωθούν από νύμφες σε ιχθύδια (Osse *et al.* 1997, van Snik *et al.* 1997). Κατά τα πρώιμα οντογενετικά στάδια η περιοχή της κεφαλής παρουσιάζει θετική αλλομετρική αύξηση, προκειμένου να αναπτύξει τις δομές εκείνες που θα αυξήσουν την ικανότητα για εντοπισμό θηραμάτων, αλλά και την κατάποση (Fuiman 1983, Koumoundouros *et al.* 1999). Στην τσιπούρα, η περιοχή της κεφαλής παρουσίασε θετική αλλομετρική αύξηση, από το στάδιο της λεκιθοφόρου νύμφης και μέχρι τα τελευταία νυμφικά στάδια (Russo *et al.* 2007). Στη συνέχεια το κεφάλι της τσιπούρας παρουσιάζει ισομετρική αύξηση μέχρι την ενηλικίωση της (Russo *et al.* 2007). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή το σχήμα της κεφαλής συνέχιζε να αλλάζει κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Ενώ οι Russo *et al.* (2007), παρατήρησαν ισομετρική και αρνητική αλλομετρική αύξηση μετά τα 70 mm TL, στην παρούσα διατριβή τα αποτελέσματα έδειξαν μόνο θετική αλλομετρική αύξηση (Εικόνα 4.9). Μάλιστα ο ρυθμός αυτός ήταν εντονότερος από την έναρξη της πάχυνσης και μέχρι τα 103,9 mm SL, ενώ ύστερα ο ρυθμός ήταν μικρότερος.

Στο παρελθόν οι Loy *et al.* (1999) εξέτασαν τη μορφολογία της κεφαλής στον οξύρυγχο της Αδριατικής (*Acipenser naccarii*) προκειμένου να μελετήσουν το πρότυπο αλλαγής της από τα 350 στα 1480 χιλιοστά ολικού μήκους (TL). Παρατήρησαν σύγκλιση των οροσήμων που όριζαν το πρόσθιο και οπίσθιο τμήμα της κεφαλής, υποδηλώνοντας ότι η περιοχή της κεφαλής μικραίνει σε μέγεθος όσο το τυπικό μήκος των ψαριών αυξάνει. Τα αποτελέσματα του παρόντος κεφαλαίου συμφωνούν με τους Loy *et al.* (1999), καθώς οι ανυσματικές απεικονίσεις των ενηλίκων ατόμων έδειξαν ότι τα ορόσημα που οριοθετούσαν το πρόσθιο και το οπίσθιο τμήμα της κεφαλής σύγκλιναν μεταξύ τους (Εικόνα 4.9). Φαίνεται ότι τα ευρήματα στην τσιπούρα έχουν παρατηρηθεί και σε άλλα είδη, όπως ο οξύρυγχος της Αδριατικής. Επιπλέον στην παρούσα διδακτορική διατριβή παρατηρήθηκε μια κοιλιακή μετατόπιση των οροσήμων της γνάθου και του βραγχιακού επικαλύμματος. Παρόμοιες αλλαγές παρατήρησαν και οι Russo *et al.* (2007), οι οποίοι απέδωσαν αυτές τις αλλαγές, στην

αλλαγή των διατροφικών συνηθειών της τσιπούρας. Και αυτό γιατί από την έναρξη της ενηλικίωσης η τσιπούρα κυρίως τρέφεται με δεκάποδα, δίθυρα, γαστερόποδα και πολύχαιτους (Ferrari and Chiericato 1981, Tancioni *et al.* 2003, Pita *et al.* 2002, Chaoui *et al.* 2005). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή, ο πληθυσμός τρέφονταν με ξηρή εμπορική τροφή από τις 27 dph (§2.2.1, σελ. 22), ενώ η διαβίωση των ψαριών γινόταν σε θαλάσσιο κλωβό. Παρόλο όμως που το περιβάλλον διαβίωσης δεν άλλαξε κατά την έναρξη της πάχυνσης, το σχήμα της κεφαλής συνέχιζε να αλλάζει σε όλη τη διάρκεια της, με το στόμα να γίνεται πιο κοιλιακό όσο μεγάλωναν τα ψάρια. Προφανώς οι οντογενετικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν είναι κάτω από το στενό έλεγχο του γονιδιώματος.

Σκελετικές παραμορφώσεις μπορεί να εμφανιστούν ακόμα και στην περιοχή της κεφαλής και αποτελούν σημαντικό πρόβλημα για τη μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια. Οι παραμορφώσεις των γνάθων είναι από τις πιο σημαντικές κρνιακές παραμορφώσεις, καθώς όχι μόνο επηρεάζουν αρνητικά την άποψη των καταναλωτών σχετικά με τα εκτρεφόμενα ψάρια, αλλά επηρεάζουν και αρνητικά την αύξηση των ψαριών, καθώς σχετίζονται με τη διαδικασία της τροφοληψίας (ανασκόπηση από Boglione *et al.* 2013). Η πιο συχνά εμφανιζόμενη γναθική παραμόρφωση σε εκτρεφόμενους πληθυσμούς τσιπούρας είναι αυτή της κοντής άνω γνάθου (pugheadness, Koumoundouros 2010). Χαρακτηρίζεται από προσθοπίσθια συμπίεση της ηθμοειδούς περιοχής και της άνω γνάθου και πρωτοεμφανίζεται κατά τα πρώιμα οντογενετικά στάδια (Koumoundouros *et al.* 2000a, Faustino and Power 2001). Πρόσφατα η παραμόρφωση της κοντής άνω γνάθου συσχετίστηκε με πολλαπλές εσωτερικές παραμορφώσεις των γναθικών και προγναθικών οστών στο νυμφικό στάδιο (39 dph, Fragkoulis *et al.* 2018). Παρόλο που η μακροσκοπική εικόνα ήταν παρόμοια, η μικροσκοπική εξέταση έδειξε να υπάρχουν πολλές διαφορετικές παραμορφώσεις των εμπλεκόμενων οστών. Οι κύριες αλλοιώσεις που παρατηρήθηκαν ήταν η μείωση μεγέθους τόσο των γναθικών όσο και των προγναθικών οστών, αλλά και η αλλοίωση των οστών αυτών, είτε με τη μορφή της εσωτερικής κάμψης είτε με τη μορφή της στένωσης. Όσο πιο έντονες ήταν οι συγκεκριμένες εσωτερικές παραμορφώσεις, τόσο πιο έντονη ήταν η αλλοίωση της εξωτερικής μορφολογίας. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή η παραμόρφωση της άνω γνάθου (Abn#) φαίνεται να σχετίζεται με αλλοιώσεις των εσωτερικών οστών. Επειδή η μορφολογία της άνω γνάθου ήταν κοντύτερη σε μέγεθος σε σχέση με αυτήν των φυσιολογικών ατόμων, πιθανόν να σχετίζεται με μείωση του μεγέθους των εμπλεκόμενων οστών. Ωστόσο το προχωρημένο στάδιο και η ύπαρξη χρωματοφόρων

δεν μπόρεσε να κάνει δυνατή την εσωτερική ανατομική εξέταση της άνω γνάθου. Επιπλέον το γεγονός ότι η συχνότητα εμφάνισης της παραμόρφωσης δεν άλλαξε σημαντικά κατά την περίοδο της πάχυνσης, επιβεβαιώνει την υπάρχουσα βιβλιογραφία που αναφέρει ότι η συγκεκριμένη μορφο-ανατομική παραμόρφωση αναπτύσσεται από το νυμφικό στάδιο και μέχρι τη μεταμόρφωση (Koumoundouros 2010, Boglione *et al.* 2013).

Τέλος στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκε μια μορφολογική απόκλιση από την φυσιολογική εξωτερική μορφολογία, χωρίς εμφανή ένδειξη για σκελετικές παραμορφώσεις. Παρατηρήθηκε ότι η συγκεκριμένη μορφολογική απόκλιση επιδιορθώνεται κατά την περίοδο της πάχυνσης. Μέχρι τώρα οι μορφο-ανατομικές παραμορφώσεις που φάνηκαν να επιδιορθώνονται, είχαν εμφανή χαρακτηριστικά σκελετικών παραμορφώσεων. Στην περίπτωση της επιδιόρθωσης του βραγχιακού επικαλύμματος στην τσιπούρα (Beraldo and Canavese 2011), παρατηρήθηκαν ιστολογικές ενδείξεις για επιδιόρθωση. Ωστόσο η επιδιόρθωση παρατηρήθηκε μόνο σε παραμορφώσεις ελαφριών εντάσεων, ενώ δεν είχε προηγηθεί ηλεκτρονική σήμανση των παραμορφωμένων ατόμων, προκειμένου να υπάρχει εξατομικευμένη παρακολούθηση. Από την άλλη στην περίπτωση της επιδιόρθωσης της αιματικής λόρδωσης (Κεφάλαιο 3), τα άτομα έφεραν ηλεκτρονική σήμανση, οπότε η παρακολούθηση έγινε σε ατομικό επίπεδο. Σε αυτήν την περίπτωση, ιχθύδια με αιματική λόρδωση σοβαρής έντασης, έδειξαν να επιδιορθώνονται σε τέτοιο βαθμό, όπου η ακτινογραφική τους απεικόνιση στο ενήλικο στάδιο δεν διέφερε εσωτερικά με την ακτινογραφική απεικόνιση των αρχικά φυσιολογικών ατόμων. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, έδειξαν ότι υπάρχει επιδιόρθωση αυτής της μορφολογικής απόκλισης, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστή η εμπλοκή σκελετικών στοιχείων. Δυστυχώς η ακτινογραφική εξέταση δεν ήταν εφικτό να πραγματοποιηθεί, καθώς η αμφίπλευρη ανατομία των γνάθων, δεν επέτρεπε την ευκρινή μελέτη τους. Εικάζεται ότι ο διαφορετικός ρυθμός αλλομετρικής αύξησης μεταξύ των μυοσκελετικών στοιχείων που εμπλέκονται, να προκάλεσαν αυτήν την μορφολογική εικόνα. Μάλιστα τα υψηλότερα ποσοστά επιδιόρθωσης παρατηρήθηκαν κατά το πρώτο διάστημα της περιόδου πάχυνσης (1 - 77 dpt), όπου ο ρυθμός αύξησης κατά την οντογένεση των φυσιολογικών ατόμων ήταν μεγαλύτερος (Εικόνα 4.9). Ενδέχεται τα δύο αυτά φαινόμενα να συνδέονται μεταξύ τους. Η συγκεκριμένη μορφολογική απόκλιση χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, όχι μόνο όσον αφορά τον τρόπο της επιδιόρθωσης, αλλά και ως προς τα ποσοτικά χαρακτηριστικά της (εύρος γωνίας της αρχικής παραμορφωμένης

απεικόνισης, εύρος γωνίας που επιδιορθώνεται, κ.α.). Επιπλέον η ιστολογική εξέταση (ή/και η μέθοδος της αξονικής μικροτομογραφίας) θα έδειχνε αν αυτή η μορφο-ανατομική ανωμαλία, είναι αποτέλεσμα αλλομετρικής φύσεως (οστών ή/και μυών) ή μόνο οστεολογική ανωμαλία.

Κεφάλαιο 5^ο

Γενική συζήτηση

Η εξωτερική μορφολογία των ιχθύων είναι σημαντικός δείκτης ποιότητας για τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς. Ειδικά όταν ο καταναλωτής έδειξε να έχει σημαντικές προτιμήσεις για συγκεκριμένα χαρακτηριστικά του σχήματος του σώματος (Fragkoulis *et al.* 2017a). Παρά την έντονη πλαστικότητα που παρουσιάζει στα περιβαλλοντικά ερεθίσματα, το σχήμα του σώματος επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό και από την ανάπτυξη σκελετικών παραμορφώσεων. Αποτελούν ένα ιδιαίτερο πρόβλημα για την ευρωπαϊκή ιχθυοκαλλιέργεια, καθώς υποβαθμίζουν σημαντικά την ποιότητα του τελικού προϊόντος (Boglione *et al.* 2013). Μέχρι σήμερα ήταν γνωστό ότι τόσο η οντογένεση του φυσιολογικού φαινοτύπου, όσο και η ανάπτυξη σκελετικών παραμορφώσεων περιορίζονταν ως επί το πλείστον μέχρι το στάδιο του ιχθυδίου και ότι η σχέση του φαινοτύπου μεταξύ του ιχθυδίου και του ενήλικου σταδίου ήταν απόλυτη (Russo *et al.* 2007, Koumoundouros 2010).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η οντογένεση του σχήματος του σώματος κατά την περίοδο της πάχυνσης σε εκτρεφόμενο πληθυσμό τσιπούρας. Η μελέτη αυτή έγινε από το στάδιο του ιχθυδίου (μ. β. $15,2 \pm 4,5$ γρ.) μέχρι το ενήλικο στάδιο (μ. β. 512 ± 76 γρ.). Τα άτομα των οποίων εξετάστηκε η εξωτερική μορφολογία είχαν σημανθεί ηλεκτρονικά (με τη μέθοδο Pit-tag) από την έναρξη της έρευνας, επιτρέποντας την εξατομικευμένη παρακολούθηση, δίνοντας την ευκαιρία να μελετηθούν τα αλλομετρικά τροχιακά τους. Η ανάλυση του σχήματος του σώματος πραγματοποιήθηκε σε ψηφιακές φωτογραφίες των ιχθύων με τη μέθοδο της γεωμετρικής μορφομετρίας.

Η μελέτη της οντογένεσης του σχήματος του σώματος έγινε σε ιχθύες που δεν έφεραν καθόλου σκελετικές παραμορφώσεις σε όλη τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Η παρακολούθηση του πληθυσμού επέτρεψε τη μελέτη της οντογένεσης του σχήματος του σώματος της τσιπούρας, ενώ η εξατομικευμένη παρακολούθηση επέτρεψε την μελέτη των ατομικών αλλομετρικών τροχιακών. Επιπλέον έγινε εφικτή η συσχέτιση του σχήματος μεταξύ διαφορετικών σταδίων, προκειμένου να εντοπιστούν χαρακτηριστικά του σχήματος των ενήλικων ψαριών από προγενέστερα στάδια.

Μέσω της εξατομικευμένης παρακολούθησης έγινε εφικτή και η μελέτη της εξέλιξης δύο σκελετικών παραμορφώσεων με έντονο εμπορικό ενδιαφέρον. Η αιματική λόρδωση είναι μια σημαντική σκελετική παραμόρφωση της σπονδυλικής στήλης που απασχολεί σε σημαντικό βαθμό την μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια. Η συγκεκριμένη παραμόρφωση παρουσιάζει υψηλά ποσοστά εμφάνισης ειδικά μετά το στάδιο του ιχθυδίου (Koumoundouros 2010). Κύριοι γενεσιουργοί παράγοντες θεωρούνται τα υψηλά μηχανικά φορτία που ασκούνται στην σπονδυλική στήλη κατά τη διάρκεια της

προ-πάχυνσης (Kranenbarg *et al.* 2005b). Για την εξέλιξη της αιματικής λόρδωσης πραγματοποιήθηκαν ακτινογραφίες τόσο στην έναρξη όσο και στο τέλος της περιόδου πάχυνσης προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της αιματικής λόρδωσης και στην σπονδυλική στήλη.

Επιπλέον μελετήθηκαν οι σκελετικές παραμορφώσεις που εντοπίζονται στην περιοχή της άνω γνάθου. Σε αντίθεση με την αιματική λόρδωση, οι γναθικές παραμορφώσεις εμφανίζονται από τα πρώιμα οντογενετικά στάδια και ολοκληρώνουν την ανάπτυξη τους μέχρι το στάδιο της μεταμόρφωσης. Παρατηρήθηκε μια νέα παραμόρφωση που δεν έφερε αλλοιώσεις στα οστά της άνω γνάθου, αλλά είχε έντονα παραμορφωμένο προφίλ. Τέλος μελετήθηκε η εξέλιξη τόσο των δύο κρανιακών παραμορφώσεων, όσο και των ατόμων που είχαν φυσιολογική κρανιακή ανάπτυξη.

Τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής έδειξαν ότι υπάρχει κενό στην γνώση σχετικά με την οντογένεση της μορφολογίας μετά το στάδιο του ιχθυδίου. Ήταν διαδεδομένο ότι μετά τη μεταμόρφωση, η τσιπούρα δεν αλλάζει οντογενετικά ή μορφολογικά, αλλά κυρίως αναπτύσσεται σε μέγεθος (Russo *et al.* 2007). Η παρούσα διατριβή ανέδειξε περαιτέρω οντογενετικές αλλαγές και μετά τη μεταμόρφωση (Εικόνα 2.7), κάτι που μέχρι σήμερα αγνοούνταν. Φάνηκε ότι τα ψάρια μετά την μεταμόρφωση και την πρώτη οντογενετική περίοδο αλλάζουν περαιτέρω, πιθανόν, διαμορφώνοντας δευτερογενή μορφολογικά χαρακτηριστικά. Αυτή η άποψη ενισχύεται και από την ύπαρξη διαφορετικών αλλομετρικών τροχιακών, δείχνοντας τη σημασία της ατομικότητας ακόμα και όταν οι οργανισμοί αναπτύσσονται κάτω από τις ίδιες συνθήκες εκτροφής. Οι έντονες αυτές οντογενετικές αλλαγές από το στάδιο του ιχθυδίου και μέχρι το σημείο που σταθεροποιείται το σχήμα του σώματος, δεν έκαναν εφικτή την πλήρη ταύτιση αυτού του σταδίου με το ενήλικο στάδιο. Ενδεχομένως η εκτενέστερη περιγραφή των οντογενετικών αλλαγών τη συγκεκριμένη περίοδο των ψαριών, πραγματοποιώντας περισσότερες δειγματοληψίες, να επέτρεπε την πλήρη καταγραφή τους, προκειμένου να γίνει πιο κατανοητή η μετάβαση από το ένα στάδιο στο άλλο.

Παρόμοιο εγχείρημα είχε γίνει στο παρελθόν όταν προσπάθησαν να χαρτογραφήσουν τις οντογενετικές αλλαγές του κρανίου μεταξύ ανθρώπων (Bulygina *et al.* 2006). Με τη χρήση ακτινογραφιών έγινε εφικτό να παρατηρήσουν τις οντογενετικές αλλαγές που συμβαίνουν όταν οι άνθρωποι μεγαλώνουν. Κύριος στόχος ήταν να παρατηρήσουν τις διαφορές μεταξύ των δύο φύλων, καθώς μέχρι τότε ήταν γενικά αποδεκτό, ότι οι κύριες μορφολογικές αλλαγές συμβαίνουν μετά το δέκατο τρίτο

έτος της ανθρώπινης ζωής (Enlow 1990). Από τις ατομικές συσχετίσεις μεταξύ του νεογέννητου (1 μήνα) και του ενήλικου σταδίου (πάνω από 21 χρονών) με τις υπόλοιπες ηλικίες, παρατήρησαν ότι μέχρι το τρίτο έτος της ηλικίας τους, η μορφολογία του κρανίου παρουσιάζει χαμηλές συσχετίσεις με τον ενήλικο φαινότυπο. Αυτή η χαμηλή συσχέτιση οφείλεται στο γεγονός των διαφορετικών ατομικών τροχιακών που παρατηρούνται μεταξύ των ατόμων του ίδιου σταδίου. Μετά τον τρίτο χρόνο ζωής, οι ατομικές διαφορές που αναπτύχθηκαν, παραμένουν σταθερές μέχρι και την ηλικία του εικοστού πρώτους έτους. Δυστυχώς κάτι τόσο χρονοβόρο δεν είναι εφικτό να γίνει στα πλαίσια μιας διδακτορικής διατριβής.

Για πρώτη φορά φάνηκε η αναδιαμόρφωση οστών στους οστεϊχθύες, σε σημείο που οι επιδιορθωμένοι σπόνδυλοι, να μην διαφέρουν από τους φυσιολογικούς (Εικόνα 3.11A). Η αναδιαμόρφωση (remodeling) των οστών είναι μια διεργασία αρκετά γνωστή στα θηλαστικά. Οφείλεται στη συντονισμένη δράση οστεοκλαστών και οστεοβλαστών (Witten and Huysseune 2009). Στα θηλαστικά οι οστεοκλάστες θεωρούνται τα κύρια κύτταρα συμμετοχής για την αναδιαμόρφωση των οστών, σε ένα σύστημα πιο δυναμικό από αυτό των ψαριών. Και αυτό γιατί στα θηλαστικά οι οστεοκλάστες προέρχονται από αιμοποιητικά κύτταρα του μυελού των οστών (Holtrop *et al.* 1982). Σε αυτήν την κατηγορία των οργανισμών, η αναδιαμόρφωση του σκελετικού συστήματος, γίνεται για ποικίλους λόγους (αντικατάσταση χόνδρινου ιστού, επούλωση τραυμάτων). Αντιθέτως στους τελεόστεους ιχθύες, το σκελετικό σύστημα είναι ακυτταρικό και οποιαδήποτε αλλαγή γίνεται περιφερικά του κυρίου σώματος, με την οστεόλυση να πραγματοποιείται από τη μία μεριά και την οστεογένεση από την άλλη (Witten and Huysseune 2009). Το γεγονός ότι η αναδιαμόρφωση των οστών στους τελεόστεους ιχθύες πραγματοποιείται χωρίς την ύπαρξη οστεοκυττάρων και αιμοποιητικών κυττάρων, οφείλεται σε διεργασίες που μέχρι σήμερα είναι άγνωστες. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε για πρώτη φορά το φαινόμενο της ολικής επιδιόρθωσης της αιματικής λόρδωσης. Ωστόσο δεν ήταν εφικτή η ιστολογική μελέτη της, επειδή η προετοιμασία και η μονιμοποίηση για την ιστολογική μελέτη δεν ήταν εύκολο να πραγματοποιηθεί κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας. Για την ιστολογική μελέτη της επιδιόρθωσης της αιματικής λόρδωσης θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί το zebrafish, δεδομένου των εύκολων χειρισμών του. Οι Printzi *et al.* (2020) έδειξαν ότι σε σύντομο χρονικό διάστημα μπορεί να προκληθεί αιματική λόρδωση σε φυσιολογικά ιχθύδια του zebrafish. Είναι μια γρήγορη και εύκολη μέθοδος που μέσα σε διάστημα επτά ημερών μπορεί να προκληθεί αιματική λόρδωση σοβαρής έντασης. Ενδεχομένως

μετά την πρόκληση της λόρδωσης, τα ιχθύδια θα μπορούσαν να τοποθετηθούν σε περιβάλλον ηρεμίας και ανά τακτά χρονικά διαστήματα να παίρνονται δείγματα, προκειμένου να μελετηθεί ο μηχανισμός της επιδιόρθωσης και να εξακριβωθούν ιστολογικά οι διεργασίες που γίνονται κατά τη διάρκειά της.

Τα αποτελέσματα της διδακτορικής διατριβής έδειξαν ότι σημαντικές σπονδυλικές παραμορφώσεις μπορούν και επιδιορθώνονται κατά τη διάρκεια της πάχυνσης (Κεφάλαιο 3). Μάλιστα τα υψηλότερα ποσοστά επιδιόρθωσης, συνέπεσαν με την πρώτη φάση της οντογένεσης των φυσιολογικών ατόμων (Εικόνα 3.6, 3.8). Πιθανόν οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι για τις αλλαγές στο σχήμα του σώματος των φυσιολογικών ιχθυδίων μπορεί να παίζουν σημαντικό ρόλο και στην επιδιόρθωση της αιματικής λόρδωσης. Ωστόσο η παρατήρηση του φαινομένου της επιδιόρθωσης τέτοιων αξονικών παραμορφώσεων είναι μόνο η αρχή. Σίγουρο είναι ότι χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση ο συγκεκριμένος μηχανισμός. Έχει αποδειχθεί άλλωστε ότι το σκελετικό σύστημα των τελεόστεων ιχθύων έχει έντονη πλαστικότητα, τόσο σε φυσιολογικές όσο και πειραματικές συνθήκες (Hall and Witten 2018, Printzi *et al.* 2020). Ενδιαφέρουσα θα ήταν η μελέτη του μηχανισμού της επιδιόρθωσης υπό διαφορετικές συνθήκες (διατροφικές ή περιβαλλοντικές) προκειμένου να μελετηθεί η επιτάχυνση ή επιβράδυνση της διαδικασίας. Πάντως έχει δειχθεί επανειλημμένα ότι η κολυμβητική δραστηριότητα μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις στην ανάπτυξη των σπονδύλων (Fiaz *et al.* 2012, Suniaga *et al.* 2018).

Ωστόσο δεν επιδιορθώνονται όλες οι σκελετικές παραμορφώσεις. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή φάνηκε ότι μορφολογικές αποκλίσεις της άνω γνάθου που σχετίζονται με αλλοιώσεις των οστών της δεν επιδιορθώνονται. Αντιθέτως, όταν η παραμόρφωση σχετίζεται με το προφίλ της κεφαλής, υπάρχει υψηλή πιθανότητα να επιδιορθωθεί (Εικόνα 4.5). Μετά τη δημοσίευση του Wolff σχετικά με τον "νόμο περί μεταμόρφωσης των οστών" (Maquet *et al.* 2012), έγινε γνωστό ότι ο σκελετός των σπονδυλωτών μπορεί να δείξει έντονη πλαστικότητα, ακόμα και όταν ασκούνται διαφορετικά μηχανικά φορτία (Witten and Huysseune 2009). Στηριζόμενος σε παρατηρήσεις που έκανε σε φυσιολογικές ανατομικές δομές, παθολογικά δείγματα αλλά και σε πειραματικές μελέτες σε ζωντανά δείγματα οστού, ο Wolff (1892) συμπέρανε ότι ο οστέινος ιστός μπορεί να αλλάξει σε μέγεθος και όγκο, ανάλογα με την ένταση των δυνάμεων που ασκούνται. Ο σκελετός των τελεόστεων ιχθύων έχει παρουσιάσει έντονη φαινοτυπική πλαστικότητα, καθώς μπορεί και προσαρμόζεται στις

εξωτερικές δυνάμεις, ενώ ο βαθμός της μορφολογικής πλαστικότητας των τελεόστεων είναι έντονος και συναντάται σε αρκετά είδη (Meyer, 1987). Τόσο στους τελεόστεους ιχθύες όσο και στα άλλα τετράποδα, παρατηρείται μια τάση να οστεοποιούνται οι σύνδεσμοι των τενόντων που εκφύονται στα οστά, ως απόκριση στις τάσεις που ασκούνται (Benjamin *et al.* 2000, Hall 2015). Επιπλέον στοιχεία που προκύπτουν από μελέτη στον κυπρίνο, έδειξαν ότι η κίνηση της γναθικής γέφυρας, μπορεί να οφείλεται σε δύο προσαγωγούς μύες (Gidmark *et al.* 2012). Πιθανόν οι συγκεκριμένοι μύες να υπάρχουν και στην τσιπούρα και να παρουσίασαν καθυστερημένη ανάπτυξη, περιορίζοντας τη διεύρυνση των οστών, με αποτέλεσμα να παρουσιάζεται η συγκεκριμένη μορφολογική ανωμαλία που παρατηρήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή.

Μέχρι σήμερα η φυσιολογική μορφολογική οντογένεση της κεφαλής της τσιπούρας δεν μελετιούνταν ξεχωριστά, αλλά ως ένα τμήμα του ολικού σχήματος του σώματος (Russo *et al.* 2007, Fragkoulis *et al.* 2017a). Πειραματικές έρευνες έχουν δείξει ότι η μορφολογία και η δομή των γνάθων μπορεί να διαφοροποιηθεί ως απόκριση στις διατροφικές συνθήκες (Meyer, 1987). Στο *Cichlasoma managuense*, η μορφολογία ολόκληρου του κρανίου μπορεί να διαφοροποιηθεί σημαντικά ανάλογα με το είδος της τροφής (Meyer 1986, 1987). Σε είδη που έχουν σημαντικό ρόλο στην ιχθυοκαλλιέργεια όπως το ευρωπαϊκό χέλι, οι μελέτες επικεντρώθηκαν στις οντογενετικές αλλαγές του κρανίου κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής. Το ευρωπαϊκό χέλι ως κατάδρομο είδος, περνάει το περισσότερο μέρος της ζωής του σε γλυκά νερά και μεταναστεύει στους ωκεανούς μόνο για την αναπαραγωγική του περίοδο (Durif *et al.* 2009). Στην εργασία τους οι Baan *et al.* (2020), μελέτησαν την οντογένεση του κρανίου από το στάδιο του κιτρινόχελου (yellow eel) μέχρι αυτό του ασημόχελου (silver eel), τόσο μέσω φυσιολογικής όσο και τεχνητής ωρίμανσης (με ορμονικές ενέσεις). Παρατήρησαν ότι τα άτομα που είχαν υποστεί τεχνητή αναπαραγωγική ωρίμανση, παρουσίασαν μεγαλύτερο και ψηλότερο κρανίο ενώ και οι μύες των γνάθων ήταν μεγαλύτεροι, σε σχέση με τα ασημόχελα που είχαν φυσιολογική αναπαραγωγική ωρίμανση. Πιθανόν το περιβάλλον εκτροφής κατά το στάδιο του κιτρινόχελου αλλά και η μέθοδος της ορμονικής έγχυσης μπορεί να οφείλονται για αυτές τις μορφολογικές αλλαγές. Επιπλέον οι De Meyer *et al.* (2018) παρατήρησαν δύο φαινοτύπους στο ευρωπαϊκό χέλι, που σχετίζονταν με τις διατροφικές συνήθειες των εξεταζόμενων πληθυσμών. Όταν η διατροφή κατά το στάδιο του υαλόχελου (glass eel) περιλάμβανε σκληρά ή/και μεγάλα θηράματα, είχε σαν αποτέλεσμα το κρανίο στο στάδιο του κιτρινόχελου να έχει

μεγαλύτερο μέγεθος. Παρατήρησαν ότι αυτή η μορφολογική αλλαγή δεν ήταν μόνο οστεολογική, αλλά και μυϊκή, καθώς οι μύες των γνάθων ήταν μεγαλύτεροι. Επιπλέον το μεγαλύτερο κρανίο, επέτρεψε την ανάπτυξη υψηλότερων δυνάμεων κατά τη μάσηση σε σχέση με τα άτομα που είχαν στενότερα κρανία. Από την άλλη, η μελέτη της κρανιακής μορφολογίας βρίσκει τεράστια απήχηση στις παλαιοντολογικές και εξελικτικές μελέτες. Οι Urošenić *et al.* (2014) μελέτησαν τις κύριες μορφολογικές διαφορές στο κρανίο διαφορετικών σαυρών της οικογένειας *Lacertidae* κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές και διατροφικές συνθήκες. Επίσης και οι μελέτες κρανίων μεταξύ διαφορετικών ειδών *Homo* είναι ευρέως διαδεδομένες, στην προσπάθεια να βρεθεί ο συνδετικός κρίκος μεταξύ του *Homo sapiens* με τα συγγενικά είδη (Bruner 2007).

Για πρώτη φορά έγινε εφικτή η μελέτη της οντογένεσης της κεφαλής της τσιπούρας κατά την περίοδο της πάχυνσης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η οντογένεση της κεφαλής στην τσιπούρα δεν παρουσιάζει πλατό, όπως συμβαίνει με το υπόλοιπο σχήμα του σώματος (Εικόνα 4.10). Θα μπορούσε να πει κανείς ότι η μορφολογία της κεφαλής συνεχίζει να αλλάζει, ενδεχομένως λόγω διατροφικών αλλαγών. Είναι γνωστό ότι στο φυσικό περιβάλλον, η τσιπούρα κατά την έναρξη της ενηλικίωσης της επιλέγει βενθικά ενδιαιτήματα, προκειμένου να τρέφεται από δεκάποδα, δίθυρα, γαστερόποδα και πολύχαιτους (Ferrari and Chierigato 1981, Pita *et al.* 2002, Tancioni *et al.* 2003, Chaoui *et al.* 2005). Ωστόσο ο πληθυσμός της παρούσας διδακτορικής διατριβής προέρχεται από ιδιωτική εταιρεία ιχθυοκαλλιέργειας, όπου όλη η περίοδος της πάχυνσης πραγματοποιήθηκε σε θαλάσσιο κλωβό.

Οι τελεόστειοι ιχθύες είναι η μεγαλύτερη ομάδα στην κλάση των ακτινοπτερύγιων με περισσότερα από 30000 καταγεγραμμένα είδη (Froese and Pauly, 2019). Αποτελούν το 96% των ζωντανών ψαριών, ενώ πιστεύεται ότι υπάρχουν ακόμη πέντε με δέκα χιλιάδες μη καταγεγραμμένα είδη. Επιδεικνύουν έντονη προσαρμογή στο περιβάλλον, δεδομένου ότι συναντώνται σε κάθε τύπο ενδιαιτήματος, ενώ ορισμένα είδη παρουσιάζουν αντοχή σε ακραίες θερμοκρασίες. Κάποια είδη έχουν τεράστια εμπορική και οικονομική σημασία για τον άνθρωπο, είτε ως προϊόντα διατροφής (τσιπούρα, λαβράκι, σολομός, πέστροφα), ενώ άλλα είδη χρησιμοποιούνται για ψυχαγωγία (sport fishing), είτε ως διακοσμητικά σε ενυδρεία (Kisia 2010). Ορισμένα είδη ιχθύων όπως το zebrafish αλλά και το medaka (*Oryzias latipes*), έχουν σημαντικό ρόλο και σε βιοιατρικές μελέτες, καθώς χρησιμοποιούνται ως οργανισμοί μοντέλα. Η μικρή διάρκεια γενεάς, το μικρό μέγεθος, η υψηλή γονιμότητα και η εξωτερική ανάπτυξη, είναι μερικά

από τα χαρακτηριστικά των ειδών που επιτρέπουν την χρήση τους έναντι των παραδοσιακών ποντικών. Επιπλέον οι εύκολοι εμβρυικοί χειρισμοί και η υψηλή γενετική ομοιότητα με τον άνθρωπο, επιτρέπουν τη χρήση τους σε μεγάλης κλίμακας μελέτες (Veldman and Lin 2008, Teame *et al.* 2019). Το zebrafish θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την εφαρμογή διαφορετικών αβιοτικών παραγόντων (θερμοκρασία, διατροφή, pH, συγκέντρωση οξυγόνου, ταχύτητα κολύμβησης), προκειμένου να μελετηθούν τα αλλομετρικά τροχιακά του σχήματος του σώματος. Αυτό θα επέτρεπε την διερεύνηση και την πλήρη χαρτογράφηση των αλλαγών του σχήματος του σώματος τόσο κατά την κρίσιμη πρώιμη οντογενετική περίοδο, όσο και μετά την μεταμόρφωση. Η μελέτη σε όλο τον κύκλο ζωής του zebrafish (από το στάδιο της λεκιθοφόρου νύμφης μέχρι το ενήλικο άτομο) θα μπορούσε να δείξει τόσο τον βαθμό όσο και την ένταση με την οποία επιδρούν οι διαφορετικοί παράγοντες στο σχήμα του σώματος των ψαριών.

Κεφάλαιο 6^ο

Συμπεράσματα

1. Ο φαινότυπος των ιχθυδίων τσιπούρας δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης πρόβλεψης του φαινοτύπου του τελικού προϊόντος. Αυτό συμβαίνει γιατί το σχήμα του σώματος των ιχθυδίων τσιπούρας συνεχίζει να παρουσιάζει σημαντικές οντογενετικές αλλαγές μέχρι το μέγεθος των 200 mm SL, όπου και φτάνει στον ενήλικο φαινότυπο. Από αυτό το μέγεθος και μέχρι το τέλος της περιόδου πάχυνσης, η εξωτερική μορφολογία δεν αλλάζει. Οι κύριες μορφολογικές διαφορές μεταξύ των σταδίων του ιχθυδίου και του ενήλικου, εντοπίζονται στην πρόσθια περιοχή του, με τις σημαντικότερες να αφορούν την περιοχή της κεφαλής και την πρόσθια περιοχή του κορμού, μέχρι το ύψος της βάσης των κοιλιακών πτερύγιων.
2. Το σχήμα του σώματος της τσιπούρας κατά τη διάρκεια της πάχυνσης δεν ακολουθεί καθορισμένο πρότυπο ανάπτυξης. Η εξατομικευμένη παρακολούθηση έδειξε την ύπαρξη διακριτών αλλομετρικών τροχιακών τα οποία σε μεγάλο βαθμό διαφέρουν από το μέσο πληθυσμιακό τροχιακό. Τα ατομικά τροχιακά διαφέρουν και ως προς το ρυθμό αύξησης κατά την φάση της έντονης αλλομετρικής αύξησης, αλλά και ως προς το τελικό φαινότυπο σε σχέση με το μέσο πληθυσμιακό τροχιακό. Επιπλέον η σχέση μεταξύ του ατομικού σχήματος του σώματος και του πληθυσμιακού μέσου σχήματος σώματος του ίδιου σταδίου, δεν είναι πάντα σταθερή, καθώς παρατηρήθηκαν ατομικά τροχιακά που παρουσίασαν σημαντική αλλαγή στα τροχιακά τους μέχρι το τέλος της πάχυνσης.
3. Η αιματική λόρδωση επιδιορθώνεται σε μεγάλο ποσοστό (43,6%) κατά την περίοδο της πάχυνσης της τσιπούρας. Η επιδιόρθωση αφορά είτε στη μορφολογία της σπονδυλικής στήλης, είτε στην πλήρη επιδιόρθωση των εμπλεκόμενων σπονδύλων. Η ακτινογραφική εξέταση στο τέλος της πάχυνσης των επιδιορθωμένων λορδωτικών ιχθυδίων, έδειξε την μερική έως ολική επιδιόρθωση των παραμορφωμένων σπονδύλων σε τέτοιο βαθμό, που δεν διέφεραν από τα άτομα που ήταν φυσιολογικά σε όλη τη διάρκεια της πάχυνσης. Επιπλέον σε ορισμένα άτομα που παρουσίασαν επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία, η ακτινογραφική απεικόνιση έδειξε την ανάπτυξη κύφωσης πρόσθια της αιματικής λόρδωσης, ως απόκριση στην αρχική σκελετική παραμόρφωση.
4. Τα λορδωτικά ιχθύδια που κατά τη διάρκεια της πάχυνσης θα επιδιορθώσουν τη λόρδωση, μπορούν σε μεγάλο βαθμό να διακριθούν από τα υπόλοιπα άτομα με τη

μέθοδο της γεωμετρικής μορφομετρίας. Μέσω της συσχέτισης της εξωτερικής γωνίας της αιματικής λόρδωσης μεταξύ των σταδίων του ιχθυδίου και του ενηλίκου παρατηρήθηκε ένα σημείο καμπής ($129,4^\circ$), το οποίο διακρίνει τα άτομα που θα επιδιορθωθούν από τα άτομα που θα παραμείνουν λорδωτικά. Είναι μια μέθοδος που θα μπορούσε να εφαρμοστεί σε προγράμματα ποιοτικού ελέγχου για την απομάκρυνση των λорδωτικών ιχθυδίων που δεν θα παρουσιάσουν επιδιόρθωση.

5. Η μορφολογία της φυσιολογικής κεφαλής της τσιπούρας συνεχίζει να αλλάζει και μετά το στάδιο του ιχθυδίου. Σε αντίθεση με την ολική εξωτερική μορφολογία, το σχήμα της κεφαλής δεν σταθεροποιείται κατά τη διάρκεια της πάχυνσης. Από το στάδιο του ιχθυδίου, η μορφολογία της κεφαλής παρουσιάζει έντονη αλλομετρική αύξηση μέχρι τα $103,9 \text{ mm SL}$, με το ρυθμό αύξησης να μειώνεται μέχρι να τέλος της πάχυνσης, χωρίς να παρατηρείται πλατό. Αυτή η συνεχιζόμενη αύξηση, δικαιολογεί τις χαμηλές συσχετίσεις μεταξύ των σταδίων του ιχθυδίου και του ενηλίκου. Οι κύριες μορφολογικές διαφορές μεταξύ των σταδίων του ιχθυδίου και του ενηλίκου, σχετίζονται με το μέγεθος της κεφαλής αλλά και τη θέση του στόματος, με τα ενήλικα να παρουσιάζουν μικρότερο μέγεθος κεφαλής ενώ το στόμα είναι κοιλιακά μετατοπισμένο.
6. Κατά την περίοδο της πάχυνσης της τσιπούρας παρατηρήθηκαν δύο τύποι κρανιακών μορφο-ανατομικών ανωμαλιών, εκ των οποίων η μία επιδιορθώθηκε κατά τη διάρκειά της. Στην πρώτη μορφο-ανατομική ανωμαλία τα ιχθύδια έφεραν ένα έντονα κάθετο προφίλ, ενώ στην δεύτερη περίπτωση παρατηρήθηκαν παραμορφώσεις στα οστά της άνω γνάθου. Όσον αφορά τα ιχθύδια με έντονα κάθετο προφίλ, παρατηρήθηκε επιδιόρθωση της συγκεκριμένης μορφο-ανατομικής ανωμαλίας σε μεγάλο ποσοστό ($43,9\%$) μέχρι το τέλος της περιόδου πάχυνσης. Το υψηλότερο ποσοστό επιδιόρθωσης παρατηρήθηκε μέχρι τη δεύτερη δειγματοληψία (77 dpt , $38,6\%$). Από την άλλη το $97,4\%$ των ιχθυδίων που έφεραν παραμορφώσεις στα γναθικά οστά δεν παρουσίασαν επιδιόρθωση όταν έφτασαν στο εμπορεύσιμο μέγεθος (434 dpt). Η περίοδος που παρατηρήθηκαν τα υψηλά ποσοστά επιδιόρθωσης συμπίπτει με την περίοδο όπου υπάρχει έντονη αλλομετρική αύξηση στα φυσιολογικά άτομα. Πιθανόν η συγκεκριμένη μορφο-ανατομική ανωμαλία που επιδιορθώνεται, να οφείλεται σε διαφορετικό αλλομετρικό ρυθμό αύξησης μεταξύ οστών και μυών που έχει ως αποτέλεσμα αυτήν την μορφολογική εικόνα.

Περίληψη

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η εξωτερική μορφολογία σε εκτρεφόμενο πληθυσμό τσιπούρας από το στάδιο του ιχθυδίου μέχρι το ενήλικο στάδιο. Η μελέτη έγινε σε άτομα με φυσιολογική εξωτερική μορφολογία αλλά και σε άτομα που έφεραν σκελετικές παραμορφώσεις. Η μελέτη των φυσιολογικών ατόμων είχε στόχο τη συσχέτιση των δύο σταδίων (ιχθύδιο και ενήλικο), προκειμένου να βρεθούν πρώιμοι δείκτες της ποιότητας των ενηλίκων από προηγούμενα στάδια. Οι σκελετικές παραμορφώσεις που εξετάστηκαν ήταν η αιματική λόρδωση και οι παραμορφώσεις των άνω γνάθων, με απώτερο στόχο τη μελέτη της εξέλιξης τους στη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης.

Για την παρακολούθηση τόσο των φυσιολογικών όσο και των παραμορφωμένων ψαριών, 1700 ιχθύδια τσιπούρας σημάνθηκαν ηλεκτρονικά με τη μέθοδο pit-tag (1 dpt, day post-tag), επιτρέποντας την εξατομικευμένη παρακολούθηση τους. Για τη μελέτη της εξέλιξης της εξωτερικής μορφολογίας πραγματοποιήθηκαν επιπλέον τέσσερις δειγματοληψίες κατά τη διάρκεια της πάχυνσης (77, 282, 371, 434 dpt). Η μελέτη του σχήματος του σώματος έγινε με τη βοήθεια της γεωμετρικής μορφομετρίας στις ψηφιακές φωτογραφίες των σημασμένων ιχθύων. Επιπλέον για την εξέλιξη της αιματικής λόρδωσης πραγματοποιήθηκαν ακτινογραφίες στην έναρξη (1 dpt) και τη λήξη (434 dpt) της περιόδου πάχυνσης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το σχήμα του σώματος σε φυσιολογικές τσιπούρες συνεχίζει να αλλάζει και μετά το στάδιο του ιχθυδίου. Η οντογένεση του σχήματος διακρίθηκε σε δύο ξεχωριστές φάσεις, με το σημείο καμπής να βρίσκεται στα $202 \pm 1,7$ mm SL (με την ανάλυση των σχετικών στρεβλώσεων). Η πρώτη φάση χαρακτηρίζονταν από έντονη αλλομετρική αύξηση, ενώ η δεύτερη φάση παρουσίασε πλατό. Οι κύριες μορφολογικές διαφορές εστιάζονταν στην περιοχή της κεφαλής, με τα ιχθύδια να έχουν μεγαλύτερο κεφάλι από τα ενήλικα ψάρια. Οι έντονες αλλομετρικές αλλαγές κατά την πρώτη φάση της οντογένεσης, ήταν ο κύριος λόγος που η συσχέτιση μεταξύ του σχήματος των ιχθυδίων και των ενηλίκων ήταν χαμηλή ($r=0,35$). Μέσω της εξατομικευμένης παρακολούθησης, παρατηρήθηκε η ύπαρξη διαφορετικών αλλομετρικών τροχιακών προτύπων, τα οποία σε ορισμένες περιπτώσεις δεν ακολουθούσαν το πληθυσμιακό αλλομετρικό πρότυπο. Για πρώτη φορά καταγράφεται η επιδιόρθωση της αιματικής λόρδωσης σε εκτρεφόμενο πληθυσμό τσιπούρας. Κατά την περίοδο της πάχυνσης τα ποσοστά της λόρδωσης μειώθηκαν κατά 49,1%. Η εξατομικευμένη παρακολούθηση έδειξε ότι το 43,6% των αρχικά λορδωτικών ιχθυδίων (1 dpt) είχαν απόλυτα φυσιολογική εξωτερική μορφολογία στο

τέλος της παρακολούθησης (434 dpt). Η ακτινογραφική εξέταση στο τέλος της περιόδου πάχυνσης, έδειξε δύο κύριες κατηγορίες επιδιόρθωσης της σπονδυλικής στήλης. Στην πρώτη περίπτωση παρατηρήθηκε μερική ή ολική αναδιαμόρφωση των σπονδύλων. Στην δεύτερη περίπτωση παρατηρήθηκε η ανάπτυξη μιας αντίρροπης κύφωσης, πρόσθια της λόρδωσης. Οι αναλύσεις της γεωμετρικής μορφομετρίας δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα ψάρια με επιδιορθωμένη εξωτερική μορφολογία και στα ψάρια με φυσιολογικό φαινότυπο από την έναρξη της περιόδου πάχυνσης. Επιπλέον η γεωμετρική μορφομετρία ξεχώρισε τα ιχθύδια που θα επιδιορθώσουν την εξωτερική τους μορφολογία από τα άτομα που θα παραμείνουν λορδωτικά, θέτοντας ένα σημαντικό βήμα για την εξέλιξη των σκελετικών παραμορφώσεων κατά τη διαδικασία της παραγωγής.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής έδειξαν ότι οι κρανιακές παραμορφώσεις που φέρουν αλλοιώσεις των γναθικών οστών, δεν επιδιορθώνονται κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Επιπλέον παρατηρήθηκε μια διαφορετική μορφο-ανατομική παραμόρφωση, με κύριο χαρακτηριστικό το έντονο κάθετο προφίλ της. Η συγκεκριμένη παραμόρφωση φαίνεται να μην φέρει αλλοιώσεις οστών, ενώ μέχρι το τέλος της περιόδου πάχυνσης τα ιχθύδια που είχαν διαγνωστεί με τη συγκεκριμένη αλλοίωση, παρουσίασαν βελτιωμένη εξωτερική μορφολογία στο 43,9% των περιπτώσεων. Τέλος η μελέτη της κρανιακής μορφολογίας των φυσιολογικών ατόμων έδειξε ότι η περιοχή της κεφαλής συνεχίζει να αλλάζει κατά τη διάρκεια της πάχυνσης. Η οντογένεση της κρανιακής μορφολογίας διακρίθηκε σε δύο φάσεις με το σημείο καμπής να εντοπίζεται στα 103,9 mm SL. Σε όλη τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης, ο ρυθμός αλλομετρικής αύξησης ήταν υψηλός, αλλά στην πρώτη φάση ήταν υψηλότερος. Κύριες μορφολογικές διαφορές μεταξύ των ιχθυδίων και των ενηλίκων ατόμων αφορούσαν το μέγεθος της κεφαλής, αλλά και τη θέση του στόματος.

Τα αποτελέσματα τόσο των οντογενετικών μελετών και των σκελετικών παραμορφώσεων, έδειξαν ότι η εξωτερική μορφολογία της τσιπούρας συνεχίζει να αλλάζει κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης. Τόσο η επιδιόρθωση σημαντικών σκελετικών παραμορφώσεων όσο και οι έντονες οντογενετικές αλλαγές των φυσιολογικών ατόμων κατά την περίοδο της πάχυνσης θα μπορούσαν να αποτελέσουν σημαντικά εργαλεία για τη βελτίωση της ποιότητας του τελικού προϊόντος, την εξέλιξη των προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης, αλλά και την διεύρυνση της γνώσης που σχετίζεται με την αρχιτεκτονική του σχήματος του σώματος.

Abstract

In the present doctoral thesis, the external morphology of reared gilthead sea bream (*Sparus aurata*) was studied. The examination took place during the on-growing period, starting from the juvenile stage and up to the harvest size. During the study, fish with normal phenotype and skeletal abnormalities were examined. Concerning the fish with normal phenotype, the main goal was to correlate the most significant ontogenetic stages (juvenile and adult stages), in order to determine early predictors of the commercial size product quality from previous life stages. The skeletal abnormalities that were examined were those of haemal lordosis and upper jaw deformities, which have significant effect upon the external morphology. Main goal was to examine their evolution throughout the on-growing period.

For the follow-up examination of both normal and deformed specimens, 1700 juveniles were pit-tagged, allowing the examination at an individual level. In order to examine the evolution of the external morphology, four additional samplings took place during the on-growing period (77, 282, 371, 434 dpt). The examination of the body shape was conducted with the method of geometric morphometry on the digital photos of the pit-tagged fish. For the evaluation of the haemal lordosis, X-ray examination was conducted on juveniles (1 dpt) and adult (434 dpt) fish, additionally to the digital photos.

The results showed that the body shape of normal sea bream continues to change even after the juvenile stage. The ontogeny of the shape was discriminated in two separated phases with an inflection point at 202 ± 1.7 mm SL (through relative warp analysis). The first phase was characterized by rapid allometric growth, whereas the second phase showed a plateau. The main morphological differences were observed at the head region. These allometric changes during the first phase of the ontogeny were the main reason for the low correlation between the juvenile and adult stage ($r=0.35$). The individual examination revealed different allometric trajectory patterns, which in some cases were aligned with the population allometric pattern.

This was the first time that recovery of haemal lordosis in reared sea bream population was recorded. During the on-growing period the lordosis was reduced at a rate of 49.1%. The individual examination showed that 43.6% of lordotic juveniles (1 dpt) presented normal external morphology at the end of the trial (434 dpt). The radiographic examination at the end of the on-growing period revealed two different cases of haemal lordosis recovery. Either there was partial to complete remodeling of the vertebrae, or a counter-balanced kyphosis was developed prior to lordosis. The

geometric morphometric analysis did not reveal significant differences between the fish with recovered external morphology and fish with normal external morphology since the beginning of the trial. Additionally, the geometric morphometry discriminated the juveniles with the recovery potential from the juveniles that will remain lordotic, revealing a new aspect for the evolution of skeletal abnormalities during the rearing process.

However, not all skeletal abnormalities can recover. The results of the doctoral thesis revealed that jaw abnormalities with deformed skeletal elements, do not recover during the on-growing period. Moreover, a new morpho-anatomical abnormality was observed. The main feature of that cranial abnormality was the presence of a severely vertical profile. That specific morpho-anatomical abnormality seems not to have any deformed skeletal elements. At the end of the on-growing period, that abnormality was recovered in the 43.9% of the cases. Finally, the ontogenetic analysis of the specimens with normal cranial morphology showed that the head region keeps changing during the on-growing period. The ontogeny of the cranial morphology was discriminated in two phases with an inflexion point at 103.9 mm SL. Throughout the whole period, allometric growth was significantly high, but being higher during the first phase. Main morphological differences between the juvenile and the adult stages concerned the head size and the jaw position.

Both the results of ontogeny and those of skeletal deformities, revealed that sea bream external morphology keeps changing during the on-growing period. So the repair of skeletal deformities as well as the significant ontogenetic changes of the normal specimen during, can be used as significant tools for the quality improvement of the commercial size product, the enhancement of the selective breeding programs, but also the expansion of knowledge that concerns the architect of body shape.

Βιβλιογραφία

- Alberch P., Gould S.J., Oster G.F. & Wake D.B. (1979) Size and Shape in Ontogeny and Phylogeny. *Paleobiology*, 5, 296-317.
- Amoroso G., Cobcroft J.M., Adams M.B., Ventura T. & Carter C.G. (2016) Concurrence of lower jaw skeletal anomalies in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the effect on growth in freshwater. *Journal of Fish Diseases*, 39, 1509-1521.
- Andrades J.A., Becerra J. & Fernández-Llebrez P. (1996) Skeletal deformities in larval, juvenile and adult stages of cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 141, 1-11.
- Arechavala-Lopez P., Sanchez-Jerez P., Bayle-Sempere J.T., Sfakianakis D.G. & Somarakis S. (2012) Morphological differences between wild and farmed Mediterranean fish. *Hydrobiologia*, 679, 217-231.
- Atchley W.R. (1987) DEVELOPMENTAL QUANTITATIVE GENETICS AND THE EVOLUTION OF ONTOGENIES. *Evolution*, 41, 316-330.
- Audouin J. (1962) La daurade de l'étang de Thau *Chrysophrys Aurata* (LINNÉ). *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 26(1), 105-126. Open Access version: <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/4245/>
- Baan J., De Meyer J., De Kegel B. & Adriaens D. (2020) From yellow to silver: Transforming cranial morphology in European eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Anatomy*, n/a.
- Backiel T., Kokurewicz B. & Ogorzałek A. (1984) High incidence of skeletal anomalies in carp, *Cyprinus carpio*, reared in cages in flowing water. *Aquaculture*, 43, 369-380.
- Bacon P., Gurney W., Jones W., McLaren I. & Youngson A. (2004) Seasonal Growth Patterns of Wild Juvenile Fish: Partitioning Variation Among Explanatory Variables, Based on Individual Growth Trajectories of Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Parr. *Journal of Animal Ecology*, 74, 1-11.
- Barahona-Fernandes M.H. (1982) Body deformation in hatchery reared European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L). Types, prevalence and effect on fish survival. *Journal of Fish Biology*, 21, 239-249.
- Bardon A., Vandeputte M., Dupont-Nivet M., Chavanne H., Haffray P., Vergnet A. & Chatain B. (2009) What is the heritable component of spinal deformities in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Aquaculture*, 294, 194-201.
- Béné C., Arthur R., Norbury H., Allison E.H., Beveridge M., Bush S., Campling L., Leschen W., Little D., Squires D., Thilsted S.H., Troell M. & Williams M. (2016) Contribution of Fisheries and Aquaculture to Food Security and Poverty Reduction: Assessing the Current Evidence. *World Development*, 79, 177-196.
- Benjamin M., Rufai A. & Ralphs J.R. (2000) The mechanism of formation of bony spurs (enthesophytes) in the achilles tendon. *Arthritis Rheum*, 43, 576-583.
- Beraldo P. & Canavese B. (2011) Recovery of opercular anomalies in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.: Morphological and morphometric analysis. *Journal of Fish Diseases*, 34, 21-30.
- Blackwell B.G., Brown M.L. & Willis D.W. (2000) Relative Weight (Wr) Status and Current Use in Fisheries Assessment and Management. *Reviews in Fisheries Science*, 8, 1-44.
- Blonk R.J.W., Komen J., Tenghe A., Kamstra A. & Van Arendonk J.a.M. (2010) Heritability of shape in common sole, *Solea solea*, estimated from image analysis data. *Aquaculture*, 307, 6-11.
- Boglione C., Gisbert E., Gavaia P., Witten P.E., Moren M., Fontagne S. & Koumoundouros G. (2013) Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Reviews in Aquaculture*, 5, S121-S167.
- Boglione C., Marino G., Giganti M., Longobardi A., De Marzi P. & Cataudella S. (2009) Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. *Aquaculture*, 291, 48-60.
- Bowen H.L. & Marchetti M.P. (2016) Ecomorphological plasticity of juvenile fall-run chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) in perennial and ephemeral streams. *Environmental Biology of Fishes*, 99, 67-78.

- Brown E.E., Baumann H. & Conover D.O. (2014) Temperature and photoperiod effects on sex determination in a fish. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 461, 39-43.
- Bruner E. (2007) Cranial shape and size variation in human evolution: structural and functional perspectives. *Child's Nervous System*, 23, 1357-1365.
- Bulygina E., Mitteroecker P. & Aiello L. (2006) Ontogeny of facial dimorphism and patterns of individual development within one human population. *American Journal of Physical Anthropology*, 131, 432-443.
- Cahu C., Zambonino Infante J. & Takeuchi T. (2003) Nutritional components affecting skeletal development in fish larvae. *Aquaculture*, 227, 245-258.
- Cao L., Naylor R., Henriksson P., Leadbitter D., Metian M., Troell M. & Zhang W. (2015) China's aquaculture and the world's wild fisheries. *Science*, 347, 133-135.
- Carmichael G.J. & Tomasso J.R. (1984) Swim bladder stress syndrome in largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Texas Journal of Science*, 35, 321-324.
- Castro J., Pino-Querido A., Hermida M., Chavarrias D., Romero R., Garcia-Cortes L.A., Toro M.A. & Martinez P. (2008) Heritability of skeleton abnormalities (lordosis, lack of operculum) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) supported by microsatellite family data. *Aquaculture*, 279, 18-22.
- Chaoui L., Derbal F., Kara M.H. & Quignard J.P. (2005) Alimentation et condition de la dorade *Sparus aurata* (Teleostei:Sparidae) dans la lagune du Mellah (Algérie nord-est). *Cahiers de Biologie Marine*, 46, 221-225.
- Chaoui L., Kara H., Faure E. & Jean-Pierre Q. (2006) Growth and reproduction of the gilthead seabream *Sparus aurata* in Mellah lagoon (north-eastern Algeria). *Scientia Marina*, 70.
- Chatain B. (1994) Abnormal Swimbladder Development and Lordosis in Sea Bass (*Dicentrarchus-Labrax*) and Sea Bream (*Sparus-Auratus*). *Aquaculture*, 119, 371-379.
- Chen C.-L. & Qiu G.-H. (2014) The long and bumpy journey: Taiwan's aquaculture development and management. *Marine Policy*, 48, 152-161.
- Cobcroft J.M. & Battaglione S.C. (2009) Jaw malformation in striped trumpeter *Latris lineata* larvae linked to walling behaviour and tank colour. *Aquaculture*, 289, 274-282.
- Cobcroft J.M., Pankhurst P.M., Poortenaar C., Hickman B. & Tait M. (2004) Jaw malformation in cultured yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) larvae. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 38, 67-71.
- Cobcroft J.M., Pankhurst P.M., Sadler J. & Hart P.R. (2001) Jaw development and malformation in cultured striped trumpeter *Latris lineata*. *Aquaculture*, 199, 267-282.
- Cobcroft J.M., Shu-Chien A.C., Kuah M.K., Jaya-Ram A. & Battaglione S.C. (2012) The effects of tank colour, live food enrichment and greenwater on the early onset of jaw malformation in striped trumpeter larvae. *Aquaculture*, 356-357, 61-72.
- Colangelo P., Ventura D., Piras P., Pagani Guazzugli Bonaiuti J. & Ardizzone G. (2019) Are developmental shifts the main driver of phenotypic evolution in *Diplodus* spp. (Perciformes: Sparidae)? *BMC Evolutionary Biology*, 19, 106.
- Corti M., Loy A. & Cataudella S. (1996) Form changes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Moronidae: Teleostei), after acclimation to freshwater: An analysis using shape coordinates. *Environmental Biology of Fishes*, 47, 165-175.
- Costa C., Vandeputte M., Antonucci F., Boglione C., Menesatti P., Cenadelli S., Parati K., Chavanne H. & Chatain B. (2010) Genetic and environmental influences on shape variation in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 101, 427-436.
- De Azevedo A.M., Losada A.P., Ferreira I., Rianza A., Vázquez S. & Quiroga M.I. (2017) New insight on vertebral anomalies in cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) at early stages of development. *Journal of Fish Diseases*, 40, 987-1000.
- De Meyer J., Van Wassenbergh S., Bouilliart M., Dhaene J. & Adriaens D. (2018). Built to bite? Differences in cranial morphology and bite performance between narrow- and broad-headed European glass eels. *Journal of Morphology*, 279, 349-360.
- Diggles B.K. (2013) Saddleback deformities in yellowfin bream, *Acanthopagrus australis* (Günther), from South East Queensland. *Journal of Fish Diseases*, 36, 521-527.

- Dimitriou E., Katselis G., Moutopoulos D., Akovitiotis C. & Koutsikopoulos C. (2007) Possible influence of reared gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) on wild stocks in the area of the Messolonghi lagoon (Ionian Sea, Greece). *Aquaculture Research*, 38, 398-408.
- Divanach P., Papandroulakis N., Anastasiadis P., Koumoundouros G. & Kentouri M. (1997) Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase. *Aquaculture*, 156, 145-155.
- Domingos J.A., Smith-Keune C., Robinson N., Loughnan S., Harrison P. & Jerry D.R. (2013) Heritability of harvest growth traits and genotype–environment interactions in barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*, 402-403, 66-75.
- Durif C., Guibert A. & Elie P. (2009). Morphological discrimination of the silvering stages of the European eel. *American Fisheries Society Symposium*, 58, 103-111.
- Eklöv P. & Svanbäck R. (2006) Predation Risk Influences Adaptive Morphological Variation in Fish Populations. *The American Naturalist*, 167, 440-452.
- Emre Y., Balik I., Sümer C., Oskay D. & Yeşilçimen H. (2009) Growth and reproduction studies on gilthead seabream (*Sparus aurata*) in Beymelek Lagoon, Turkey. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 8, 103-114.
- Enlow D.H. (1990) *Facial growth*, SPCK Publishing.
- FAO 2005-2014. Cultured Aquatic Species Programme. *Sparus aurata*. Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Colloca, F.; Cerasi, S. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Rome. Updated 8 February 2005.
- FAO (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture 2014. Rome.
- FAO (2018) The State of World Fisheries and Aquaculture: Meeting the Sustainable Development Goals. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Faustino M. & Power D.M. (1998) Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex. *Journal of Fish Biology*, 52, 11-22.
- Faustino M. & Power D.M. (1999) Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream. *Journal of Fish Biology*, 54, 1094-1110.
- Faustino M. & Power D.M. (2001) Osteologic development of the viscerocranial skeleton in sea bream: Alternative ossification strategies in teleost fish. *Journal of Fish Biology*, 58, 537-572.
- FEAP. European Aquaculture Production Report 2008-2016
- Ferrari I. & Chiericato A.R. (1981) Feeding habits of juvenile stages of *Sparus auratus* *Dicentrarchus labrax* and Mugilidae in a brackish embayment of the Po River Delta, Italy. *Aquaculture*, 25 (2–3), 243–258.
- Fernández I., Hontoria F., Ortiz-Delgado J.B., Kotzamanis Y., Estévez A., Zambonino-Infante J.L. & Gisbert E. (2008) Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture*, 283, 102-115.
- FGM 2017. Aquaculture in Greece 2017. Annual report
- Fiaz A.W., Léon-Kloosterziel K.M., Gort G., Schulte-Merker S., Van Leeuwen J.L. & Kranenbarg S. (2012) Swim-training changes the spatio-temporal dynamics of skeletogenesis in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *PLoS ONE*, 7, e34072.
- Fischer-Rousseau L., Chu K.P. & Cloutier R. (2010) Developmental plasticity in fish exposed to a water velocity gradient: a complex response. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 314B, 67-85.
- Fjellidal P.G., Hansen T., Breck O., Ornsrud R., Lock E.J., Waagbo R., Wargelius A. & Witten P.E. (2012) Vertebral deformities in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) - etiology and pathology. *Journal of Applied Ichthyology*, 28, 433-440.
- Fragkoulis S., Batargias C., Kolios P. & Koumoundouros G. (2018) Genetic parameters of the upper-jaw abnormalities in Gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquaculture*, 497, 226-233.
- Fragkoulis S., Christou M., Karo R., Ritas C., Tzokas C., Batargias C. & Koumoundouros G. (2017a) Scaling of body-shape quality in reared gilthead seabream *Sparus aurata* L.

- Consumer preference assessment, wild standard and variability in reared phenotype. *Aquaculture Research*, 48, 2402-2410.
- Fragkoulis S., Paliogiannis H., Kokkinias P., Chiers K., Adriaens D. & Koumoundouros G. (2017b) Saddleback syndrome in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758): anatomy, ontogeny and correlation with lateral-line, anal and pelvic fin abnormalities. *Journal of Fish Diseases*, 40, 83-95.
- Fragkoulis S., Economou I., Moukas G., Koumoundouros G. & Batargias C. (2020) Caudal fin abnormalities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) have a strong genetic variance component. *Journal of Fish Diseases*, 43, 825-828.
- Fraser T.W.K., Hansen T., Fleming M.S. & Fjellidal P.G. (2015) The prevalence of vertebral deformities is increased with higher egg incubation temperatures and triploidy in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 38, 75-89.
- Froese R. and D. Pauly. Editors. 2019. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (12/2019).
- Fuiman L.A. (1983) Growth gradients in fish larvae. *Journal of Fish Biology*, 23, 117-123.
- Fuiman L.A., Poling K.R. & Higgs D.M. (1998) Quantifying Developmental Progress for Comparative Studies of Larval Fishes. *Copeia*, 1998, 602-611.
- García-Celdrán M., Cutáková Z., Ramis G., Estévez A., Manchado M., Navarro A., María-Dolores E., Peñalver J., Sánchez J.A. & Armero E. (2016) Estimates of heritabilities and genetic correlations of skeletal deformities and uninflated swimbladder in a reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) juvenile population sourced from three broodstocks along the Spanish coasts. *Aquaculture*, 464, 601-608.
- Georga I., Glynatsi N., Baltzois A., Karamanos D., Mazurais D., Darias M.J., Cahu C.L., Zambonino-Infante J.L. & Koumoundouros G. (2011) Effect of vitamin A on the skeletal morphogenesis of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture Research*, 42, 684-692.
- Georga I. & Koumoundouros G. (2010) Thermally Induced Plasticity of Body Shape in Adult Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Journal of Morphology*, 271, 1319-1327.
- Georgakopoulou E., Katharios P., Divanach P. & Koumoundouros G. (2010) Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 308, 13-19.
- Georgakopoulou E., Sfakianakis D.G., Kouttouki S., Divanach P., Kentouri M. & Koumoundouros G. (2007) The influence of temperature during early life on phenotypic expression at later ontogenetic stages in sea bass. *Journal of Fish Biology*, 70, 278-291.
- Gidmark N.J., Staab K.L., Brainerd E.L. & Hernandez L.P. (2012) Flexibility in starting posture drives flexibility in kinematic behavior of the kinethmoid-mediated premaxillary protrusion mechanism in a cyprinid fish, *Cyprinus carpio*. *J Exp Biol*, 215, 2262-2272.
- Gisbert E., Asgari R., Rafiee G., Agh N., Eagderi S., Eshaghzadeh H. & Alcaraz C. (2014) Early development and allometric growth patterns of beluga *Huso huso* (Linnaeus, 1758). *Journal of Applied Ichthyology*, 30, 1264-1272.
- Gjerde B., Pante M.J.R. & Baeverfjord G. (2005) Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 244, 77-87.
- Grigorakis K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*, 272, 55-75.
- Grigorakis K., Alexis M.N., Anthony Taylor K.D. & Hole M. (2002) Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology*, 37, 477-484.
- Hall B. (2015) *Bones and Cartilage*. Developmental and Evolutionary Skeletal Biology. 2nd edition. Elsevier Academic Press, San Diego.
- Hall B. & Witten P. (2018) Plasticity and Variation of Skeletal Cells and Tissues and the Evolutionary Development of Actinopterygian Fishes. In, pp. 126-143.

- Hjelm J., Svanbäck R., Byström P., Persson L. & Wahlström E. (2001) Diet-dependent body morphology and ontogenetic reaction norms in Eurasian perch. *Oikos*, 95, 311-323.
- Holtrop M.E., Cox K.A. & Glowacki J. (1982) Cells of the mononuclear phagocytic system resorb implanted bone matrix: A histologic and ultrastructural study. *Calcified Tissue International*, 34, 488-494.
- Hough C. (2009) Improving the sustainability of European fish aquaculture by the control of malformations. Oral communication at the FINEFISH Final Workshop, 7 Sep 2009, held during Larvi 2009 - 5th Fish & Shellfish Larviculture Symposium; 7–10 Sep 2009, Ghent University, Belgium.
- Izquierdo M.S., Socorro J. & Roo J. (2010) Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live preys. *Journal of Applied Ichthyology*, 26, 320-326.
- Jakubavičiūtė E., De Blick Y., Dainys J., Ložys L. & Olsson J. (2018) Morphological divergence of three-spined stickleback in the Baltic Sea—Implications for stock identification. *Fisheries Research*, 204, 305-315.
- Kamachi H.O., Firat K., Saka S. & Bulut M. (2005) Determination of embryonic development stages of Sharpsnout Seabream (*Diplodus puntazzo* Cetti, 1777) eggs in rearing conditions. *Journal of Applied Sciences*, 5, 546–552.
- Katselis G., Koutsikopoulos C., Dimitriou E. & Rogdakis Y. (2003) Spatial patterns and temporal trends in the fisheries landings of the Messolonghi-Etoliko lagoons (Western Greek Coast). *Scientia Marina*, 67, 501-511.
- Kendall A. (1984) Early life history stages of fishes and their characters. In: Ontogeny and systematics of fishes, (Moser HG, Richards WJ, Cohen DM, Fahay MP, Kendall AW, Richardson SL, eds). American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special Publication No 1, pp 11-22. Allen Press Inc, Lawrence, Kansas
- Khemis I.B., Gisbert E., Alcaraz C., Zouiten D., Besbes R., Zouiten A., Masmoudi A.S. & Cahu C. (2013) Allometric growth patterns and development in larvae and juveniles of thick-lipped grey mullet *Chelon labrosus* reared in mesocosm conditions. *Aquaculture Research*, 44, 1872-1888.
- Kihara M., Ogata S., Kawano N., Kubota I. & Yamaguchi R. (2002) Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. *Aquaculture*, 212, 149-158.
- Kisia S.M. (2010) Vertebrates : structures and functions. In. CRC Press, Hoboken.
- Kitajima C., Tsukashima Y., Fujita S., Watanabe T. & Yone Y. (1981) Relationship between Uninflated Swim Bladders and Lordotic Deformity in Hatchery-reared Red Sea Bream *Pagrus major*. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, 47, 1289-1294.
- Klingenberg C. (2011) MorphoJ: An Integrated Software Package for Geometric Morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11, 353-357.
- Klingenberg C.P. (2016) Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics. *Development Genes and Evolution*, 226, 113-137.
- Kocour M., Mauger S., Rodina M., Gela D., Linhart O., Flajshans M. & Vandeputte M. (2007) Heritability estimates for growth and dress out traits in common carp (*Cyprinus carpio* L.) using a molecular pedigree. *Aquaculture*, 272, S277-S278.
- Koumoundouros G. (2010) *Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture*, Transworld Research Network, Kerala, India.
- Koumoundouros G., Carrillo J., Divanach P. & Kentouri M. (2004) The rearing of common dentex *Dentex dentex* (L.) During the hatchery and on-growing phases. *Aquaculture*, 240, 165-173.
- Koumoundouros G., Divanach P., Anezaki L. & Kentouri M. (2001a) Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Marine Biology*, 139, 817-830.
- Koumoundouros G., Divanach P. & Kentouri M. (1999) Ontogeny and allometric plasticity of *Dentex dentex* (Osteichthyes: Sparidae) in rearing conditions. *Marine Biology*, 135, 561-572.

- Koumoundouros G., Divanach P. & Kentouri M. (2001b) The effect of rearing conditions on development of saddleback syndrome and caudal fin deformities in *Dentex dentex* (L.). *Aquaculture*, 200, 285-304.
- Koumoundouros G., Divanach P. & Kentouri M. (2000a) Development of the skull in *Dentex dentex* (Osteichthyes : Sparidae). *Marine Biology*, 136, 175-184.
- Koumoundouros G., Divanach P., Savaki A. & Kentouri M. (2000b) Effects of three preservation methods on the evolution of swimbladder radiographic appearance in sea bass and sea bream juveniles. *Aquaculture*, 182, 17-25.
- Koumoundouros G., Gagliardi F., Divanach P., Boglione C., Cataudella S. & Kentouri M. (1997a) Normal and abnormal osteological development of caudal fin in *Sparus aurata* L Fry. *Aquaculture*, 149, 215-226.
- Koumoundouros G., Kouttoui S., Georgakopoulou E., Papadakis I., Maingot E., Kaspiris P., Kiriakou Y., Georgiou G., Divanach P., Kentouri M. & Mylonas C.C. (2005) Ontogeny of the shi drum *Umbrina cirrosa* (Linnaeus 1758), a candidate new species for aquaculture. *Aquaculture Research*, 36, 1265-1272.
- Koumoundouros G., Maingot E., Divanach P. & Kentouri M. (2002) Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture*, 209, 49-58.
- Koumoundouros G., Oran G., Divanach P., Stefanakis S. & Kentouri M. (1997) The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquaculture*, 156, 165-177.
- Kouttoui S., Georgakopoulou E., Kaspiris P., Divanach P. & Koumoundouros G. (2006) Shape ontogeny and variation in the sharpnout seabream, *Diplodus puntazzo* (Cetti 1777). *Aquaculture Research*, 37, 655-663.
- Kranenbarg S., Van Cleynenbreugel T., Schipper H. & Van Leeuwen J. (2005a) Adaptive bone formation in acellular vertebrae of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *J Exp Biol*, 208, 3493-3502.
- Kranenbarg S., Waarsing J.H., Muller M., Weinans H. & Van Leeuwen J.L. (2005b) Lordotic vertebrae in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) are adapted to increased loads. *J Biomech*, 38, 1239-1246.
- Kupren K., Nowosad J., Źarski D., Targońska K., Hakuć-Błażowska A. & Kucharczyk D. (2015) Early development and allometric growth in laboratory-reared European chub *Leuciscus cephalus* (Linnaeus, 1758). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 15, 391-398.
- Lall S.P. & Lewis-McCrea L.M. (2007) Role of nutrients in skeletal metabolism and pathology in fish — An overview. *Aquaculture*, 267, 3-19.
- Laporte M., Claude J., Berrebi P., Perret P. & Magnan P. (2016) Shape plasticity in response to water velocity in the freshwater blenny *Salaria fluviatilis*. *Journal of Fish Biology*, 88, 1191-1203.
- Lee-Montero I., Navarro A., Negrín-Báez D., Zamorano M.J., Berbel C., Sánchez J.A., García-Celdran M., Manchado M., Estévez A., Armero E. & Afonso J.M. (2015) Genetic parameters and genotype-environment interactions for skeleton deformities and growth traits at different ages on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) in four Spanish regions. *Animal Genetics*, 46, 164-174.
- Leu M.-Y., Tai K.-Y., Meng P.-J., Tang C.-H., Wang P.-H. & Tew K.S. (2018) Embryonic, larval and juvenile development of the longfin batfish, *Platax teira* (Forsskål, 1775) under controlled conditions with special regard to mitigate cannibalism for larviculture. *Aquaculture*, 493, 204-213.
- Lindsey C.C. (1988) Factors Controlling Meristic Variation. In: *Fish Physiology* (ed. by W.S. Hoar & D.J. Randall), pp. 197-274. Academic Press.
- Loizides M., Georgakopoulou E., Christou M., Iliopoulou M., Papadakis I., Katharios P., Divanach P. & Koumoundouros G. (2014a) Thermally-induced phenotypic plasticity in gilthead seabream *Sparus aurata* L. (Perciformes, Sparidae). *Aquaculture*.
- Loizides M., Georgiou A.N., Somarakis S., Witten P.E. & Koumoundouros G. (2014b) A new type of lordosis and vertebral body compression in Gilthead sea bream, *Sparus aurata*

- L.: Aetiology, anatomy and consequences for survival. *Journal of Fish Diseases*, 37, 949-957.
- Losada A.P., De Azevedo A.M., Barreiro A., Barreiro J.D., Ferreiro I., Riaza A., Quiroga M.I. & Vázquez S. (2014) Skeletal malformations in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858): Gross morphology and radiographic correlation. *Journal of Applied Ichthyology*, 30, 804-808.
- Loukovitis D., Batargias C., Sarropoulou E., Apostolidis A.P., Kotoulas G., Magoulas A., Tsigenopoulos C.S. & Chatziplis D. (2013) Quantitative trait loci affecting morphology traits in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Animal Genetics*, 44, 480-483.
- Loy A., Bronzi P. & Molteni S. (1999) Geometric morphometries in the characterisation of the cranial growth pattern of Adriatic sturgeon *Acipenser naccarii*. *Journal of Applied Ichthyology*, 15, 50-53.
- Magwene P. M. (2001) Comparing Ontogenetic Trajectories Using Growth Process Data. *Systematic Biology*, 50, 640-656.
- Maquet P., Wolff J. & Furlong R. (2012) *The Law of Bone Remodelling*, Springer Berlin Heidelberg.
- Marks C., West T.N., Bagatto B. & Moore F.B.-G. (2005) Developmental Environment Alters Conditional Aggression in Zebrafish. *Copeia*, 2005, 901-908, 908.
- Mazurais D., Glynatsi N., Darias M.J., Christodouloupoulou S., Cahu C.L., Zambonino-Infante J.L. & Koumoundouros G. (2009) Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. *Aquaculture*, 294, 262-270.
- Mckay L.R. & Gjerde B. (1986) Genetic variation for a spinal deformity in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 52, 263-272.
- Meyer A. (1986) Morphologic Measurements From Specimens and Their X-Rays: Test of a Method for the Study of Allometry and Phenotypic Plasticity in Fishes. *Netherlands Journal of Zoology*, 37, 315-321.
- Meyer A. (1987) Phenotypic plasticity and heterochrony in *Cichlasoma managuense* (Pisces, Cichlidae) and their implications for speciation in cichlid fishes. *Evolution*, 41, 1357-1369.
- Muir J. (2005) Managing to harvest? Perspectives on the potential of aquaculture. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360, 191-218.
- Negrín-Báez D., Navarro A., Afonso J.M., Ginés R. & Zamorano M.J. (2015) Detection of QTL associated with three skeletal deformities in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): Lordosis, vertebral fusion and jaw abnormality. *Aquaculture*, 448, 123-127.
- Nguyen N.H., Whatmore P., Miller A. & Knibb W. (2016) Quantitative genetic properties of four measures of deformity in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* Valenciennes, 1833. *Journal of Fish Diseases*, 39, 217-228.
- Nikolioudakis N., Koumoundouros G., Kiparissis S. & Somarakis S. (2010) Defining length-at-metamorphosis in fishes: A multi-character approach. *Marine Biology*, 157.
- Ørnsrud R., Graff I.E., Høie S., Totland G.K. & Hemre G.-I. (2002) Hypervitaminosis A in first-feeding fry of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, 8, 7-13.
- Osse J.W.M., Boogaart, J.G.M & Den V. (2004) Allometric Growth in Fish Larvae: Timing and Function. In: J.J. Govoni (ed.). *The Development of Form and Function in Fishes and the Question of Larval Adaptation*, pp. 167-194. American Fisheries Society, Symposium 40, Bethesda, Maryland.
- Osse J.W.M., Van Den Boogaart J.G.M., Van Snik G.M.J. & Van Der Sluys L. (1997) Priorities during early growth of fish larvae. *Aquaculture*, 155, 249-258.
- Paperna I., Ross B., Colorni A. & Colorni B. (1980) Diseases of marine fish in Eilat mariculture project based at the Gulf of Aqaba, Red Sea. General Fisheries Council for the Mediterranean (FAO). 57, 29

- Parichy D.M., Elizondo M.R., Mills M.G., Gordon T.N. & Engeszer R.E. (2009) Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*, 238, 2975-3015.
- Paul B.G. & Vogl C.R. (2011) Impacts of shrimp farming in Bangladesh: Challenges and alternatives. *Ocean & Coastal Management*, 54, 201-211.
- Peña R. & Dumas S. (2009) Development and allometric growth patterns during early larval stages of the spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* (Percoidei: Serranidae). *Scientia Marina*, 73, 183-189.
- Pita C., Gamito S. & Erzini K. (2002) Feeding habits of the gilthead seabream (*Sparus aurata*) from the Ria Formosa (southern Portugal) as compared to the black seabream (*Spondylisoma cantharus*) and the annular seabream (*Diplodus annularis*). *Journal of Applied Ichthyology*, 18, 81-86.
- Polo A., Yúfera M. & Pascual E. (1991) Effects of temperature on egg and larval development of *Sparus aurata* L. *Aquaculture*, 92, 367-375.
- Prestinicola L., Boglione C., Makridis P., Spano A., Rimatori V., Palamara E., Scardi M. & Cataudella S. (2013) Environmental conditioning of skeletal anomalies typology and frequency in gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) juveniles. *PLoS ONE*, 8, e55736.
- Printzi A., Fragkoulis S., Dimitriadi A., Keklikoglou K., Arvanitidis C., Witten P.E. & Koumoundouros G. (2020) Exercise-induced lordosis in zebrafish *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Journal of Fish Biology*, n/a.
- Quansah J.E., Rochon G.L., Quagraine K.K., Amisah S., Muchiri M. & Ngugi C. (2007) Remote sensing applications for sustainable aquaculture in Africa. In: 2007 IEEE International Geoscience and Remote Sensing Symposium, pp. 1255-1259.
- Ragland G.J. & Carter P.A. (2004) Genetic covariance structure of growth in the salamander *Ambystoma macrodactylum*. *Heredity*, 92, 569-578.
- Ramler D., Palandačić A., Delmastro G.B., Wanzenböck J. & Ahnelt H. (2016) Morphological divergence of lake and stream Phoxinus of Northern Italy and the Danube basin based on geometric morphometric analysis. *Ecology and evolution*, 7, 572-584.
- Rauw W.M., Kanis E., Noordhuizen-Stassen E.N. & Grommers F.J. (1998) Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science*, 56, 15-33.
- Rogdakis Y., Koukou K., Ramfos A., Dimitriou E. & Katselis G. (2011) Comparative morphology of wild, farmed and hatchery-released gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in western Greece. *International Journal of Fisheries and Aquaculture*, 3, 1-9.
- Rohlf F. J. (1993) Relative-warp analysis and an example of its application to mosquito wings. In: *Contribution to Morphometrics* (ed. By L.F. Marcus, E. Bello & L. Garcia-Valdecasas), pp. 131-159. Monografias del Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid, Spain.
- Rohlf F.J. (2010a) tpsDig2, Digitize Landmarks and Outlines. In, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY, USA.
- Rohlf F.J. (2010b) TpsRelw, Relative Warps Analysis. In, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY, USA.
- Rohlf F.J. (2011) TpsRegr, Shape Regression. In, Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY, USA.
- Russo T., Costa C. & Cataudella S. (2007) Correspondence between shape and feeding habit changes throughout ontogeny of gilthead sea bream *Sparus aurata* L., 1758. *Journal of Fish Biology*, 71, 629-656.
- Sakaguchi S., Hara T., Matsusato T., Shibahara T., Yamagata Y., Kawai H. & Maeno Y. (1987) Scoliosis of cultured yellowtail caused by parasitic *Myxobolus buri*. *Bulletin of National Research Institute of Aquaculture*; 12, 79-86.
- Sánchez-González J.R. & Nicieza A.G. (2017) Phenotypic convergence of artificially reared and wild trout is mediated by shape plasticity. *Ecology and evolution*, 7, 5922-5929.

- Sawayama E. & Takagi M. (2016) Morphology and parentage association of shortened upper jaw deformity in hatchery-produced Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel, 1846). *Journal of Applied Ichthyology*, 32, 486-490.
- Sfakianakis D.G., Georgakopoulou E., Kentouri M. & Koumoundouros G. (2006a) Geometric quantification of lordosis effects on body shape in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 256, 27-33.
- Sfakianakis D.G., Georgakopoulou E., Papadakis I.E., Divanach P., Kentouri A. & Koumoundouros G. (2006b) Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture*, 254, 54-64.
- Sfakianakis D.G., Leris I., Laggis A. & Kentouri M. (2011) The effect of rearing temperature on body shape and meristic characters in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles. *Environmental Biology of Fishes*, 92, 197.
- Shang E.H., Yu R.M. & Wu R.S. (2006) Hypoxia affects sex differentiation and development, leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science & Technology*, 40, 3118-3122.
- Sheets H.D. (2001) CoordGen6h. In: *IMP*, p. Coordinate Generating Utility.
- Song Y., Cheng F., Zhao S. & Xie S. (2019) Ontogenetic development and otolith microstructure in the larval and juvenile stages of mandarin fish *Siniperca chuatsi*. *Ichthyological Research*, 66, 57-66.
- Standen E.M., Du T.Y. & Larsson H.C.E. (2014) Developmental plasticity and the origin of tetrapods. *Nature*, 513, 54-58.
- Stockard C.R. (1921) Developmental rate and structural expression: An experimental study of twins, 'double monsters' and single deformities, and the interaction among embryonic organs during their origin and development. *American Journal of Anatomy*, 28, 115-277.
- Suau P. & Lopez J. (1976) Contribucion al estudio de la dorada, *Sparus aurata* L., *Investigacion Pesquera*, 40: 169-199, 1976
- Suniaga S., Rolvien T., Vom Scheidt A., Fiedler I.a.K., Bale H.A., Huysseune A., Witten P.E., Amling M. & Busse B. (2018) Increased mechanical loading through controlled swimming exercise induces bone formation and mineralization in adult zebrafish. *Scientific Reports*, 8, 3646.
- Sutthakiet O., Koonawootrittriron S., Sukhavachana S., Chatchaiphan S., Thaitungchin C. & Na-Nakorn U. (2020) Heritability and genetic correlation of body shape and deformity in snakeskin gourami, *Trichopodus pectoralis* Regan, 1910. *Aquaculture*, 523, 735208.
- Taieb A., Mohamed G., Ben Hadj Hamida N. & Jarboui O. (2013) Sex ratio, reproduction, and growth of the gilthead sea bream, *Sparus aurata* (Pisces: Sparidae), in the Gulf of Gabes, Tunisia. *Ciencias Marinas*, 39, 101-112.
- Tancioni L., Mariani S., Maccaroni A., Mariani A., Massa F., Scardi M. & Cataudella S. (2003) Locality-specific variation in the feeding of *Sparus aurata* L.: evidence from two Mediterranean lagoon systems. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 57, 469-474.
- Teame T., Zhang Z., Ran C., Zhang H., Yang Y., Ding Q., Xie M., Gao C., Ye Y., Duan M. & Zhou Z. (2019) The use of zebrafish (*Danio rerio*) as biomedical models. *Animal Frontiers*, 9, 68-77.
- Thuong N.P., Verstraeten B., Kegel B.D., Christiaens J., Wolf T.D., Sorgeloos P., Bonte D. & Adriaens D. (2017) Ontogenesis of opercular deformities in gilthead sea bream *Sparus aurata*: a histological description. *Journal of Fish Biology*, 91, 1419-1434.
- Troell M., Naylor R.L., Metian M., Beveridge M., Tyedmers P.H., Folke C., Arrow K.J., Barrett S., Crépin A.-S., Ehrlich P.R., Gren Å., Kautsky N., Levin S.A., Nyborg K., Österblom H., Polasky S., Scheffer M., Walker B.H., Xepapadeas T. & De Zeeuw A. (2014) Does aquaculture add resilience to the global food system? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 13257-13263.
- United Nations (2014) Fish More Important than Ever in Providing Jobs, Feeding the World. UN report [WWWDocument]. United Nations News Cent. URL. <http://www.un.org/apps/news/story.asp?NewsIDO47824#.VP7uCC70XGx> (accessed 2.27.15).

- Urošević A., Ljubisavljević K. & Ivanovic A. (2014) Variation in skull size and shape of the common wall lizard (*Podarcis muralis*): Allometric and non-allometric shape changes. *Contributions to zoology Bijdragen tot de dierkunde*, 83, 67-77.
- Vagner M., Zambonino-Infante J.L. & Mazurais D. (2019) Fish facing global change: are early stages the lifeline? *Marine Environmental Research*, 147, 159-178.
- Van Snik G.M.J., Van Den Boogaart J.G.M. & Osse J.W.M. (1997) Larval growth patterns in *Cyprinus carpio* and *Clarias gariepinus* with attention to the finfold. *Journal of Fish Biology*, 50, 1339-1352.
- Valderrama, D., Hishamunda, N. & Zhou, X. (2010) Estimating employment in world aquaculture. *FAO Aquaculture Newsletter* 45, 24-25.
- Vehanen T. & Huusko A. (2011) Brown trout *Salmo trutta* express different morphometrics due to divergence in the rearing environment. *Journal of Fish Biology*, 79, 1167-1181.
- Veldman M.B. & Lin S. (2008) Zebrafish as a developmental model organism for pediatric research. *Pediatric Research*, 64, 470-476.
- Villeneuve L., Gisbert E., Le Delliou H., Cahu C.L. & Zambonino-Infante J.L. (2005a) Dietary levels of all-trans retinol affect retinoid nuclear receptor expression and skeletal development in European sea bass larvae. *British Journal of Nutrition*, 93, 791-801.
- Villeneuve L., Gisbert E., Zambonino-Infante J.L., Quazuguel P. & Cahu C.L. (2005b) Effect of nature of dietary lipids on European sea bass morphogenesis: Implication of retinoid receptors. *British Journal of Nutrition*, 94, 877-884.
- Villeneuve L.a.N., Gisbert E., Moriceau J., Cahu C.L. & Zambonino Infante J.L. (2006) Intake of high levels of vitamin A and polyunsaturated fatty acids during different developmental periods modifies the expression of morphogenesis genes in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *British Journal of Nutrition*, 95, 677-687.
- Von Cramon-Taubadel N., Ling E.N., Cotter D. & Wilkins N.P. (2005) Determination of body shape variation in Irish hatchery-reared and wild Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 66, 1471-1482.
- Wargelius A., Fjellidal P.G. & Hansen T. (2005) Heat shock during early somitogenesis induces caudal vertebral column defects in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Developmental Genes and Evolution*, 215, 350-357.
- Whitmarsh D. & Palmieri M.G. (2008) Aquaculture in the Coastal Zone: Pressures, Interactions and Externalities. In: *Aquaculture in the Ecosystem* (ed. by M. Holmer, K. Black, C.M. Duarte, N. Marbà & I. Karakassis), pp. 251-269. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Widmer S., Moore F.B.-G. & Bagatto B. (2006) The effects of chronic developmental hypoxia on swimming performance in zebrafish. *Journal of Fish Biology*, 69, 1885-1891.
- Witten P.E. & Huysseune A. (2009) A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biological Reviews*, 84, 315-346.
- Witten P.E., Obach A., Huysseune A. & Baeverfjord G. (2006) Vertebrae fusion in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Development, aggravation and pathways of containment. *Aquaculture*, 258, 164-172.
- Wolff J. (1892) *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. A. Hirschwald, Berlin. Translation available as: Wolff, J. (1986) *The Law of Bone Remodelling*. Translated by P. Maquet and R. Furlong. Springer Verlag, Berlin
- Yokoyama H., Freeman M.A., Yoshinaga T. & Ogawa K. (2004) *Myxobolus buri*, the myxosporean parasite causing scoliosis of yellowtail, is synonymous with *Myxobolus acanthogobii* infecting the brain of the yellowfin goby. *Fisheries Science*, 70, 1036-1042.
- Zelditch M.A. (2012) *Geometric morphometrics for biologists : a primer*, Second edition. Amsterdam ; Boston : Elsevier Academic Press, 2012.
- Zohar Y., Billard R. & Weil C. (1984) La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*) : connaissance du cycle sexuel et contrôle de la gamétogenèse et de la ponte. In: G. Barnabé, R. Billard (eds). *L'aquaculture du bar et des sparidés*, pp. 3-24, Paris.

Παράρτημα

SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

Recovery of haemal lordosis in Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)

Stefanos Fragkoulis¹, Alice Printzi¹, George Geladakis¹, Nikos Katribouzas² & George Koumoundouros¹

Received: 19 October 2018
Accepted: 7 June 2019
Published online: 08 July 2019

Haemal lordosis is a frequent abnormality of the vertebral column. It has been recorded to develop in different finfish species, during the hatchery rearing phase. Under certain conditions, this abnormality reaches a high prevalence and severity degree, with significant effects on the external morphology of the fish. We show that haemal lordosis recovers during the on-growing of Gilthead seabream in sea cages. At the end of the hatchery phase, 1700 seabream juveniles were tagged electronically and examined for the presence of haemal lordosis. Subsequently, their morphology was examined periodically up to the end of the on-growing period. We found that the prevalence of fish with a lordotic external morphology decreased during the studied period by approximately 50%. Interestingly, 27% of the recovered fish presented a completely normal vertebral column. Geometric morphometric analysis showed no significant differences in the body shape between the fish with a recovered normal phenotype and the fish that were normal since the beginning of the on-growing period. Our results provide the first evidence for the recovery of lordosis during the growth of fish. A mechanism with multiple levels of remodeling of abnormal bones is suggested.

The presence of skeletal abnormalities in reared fish is a major problem of product quality, with significant effects on fish morphology and biological performance¹. Although early sort-out of the abnormal juveniles minimizes the negative effects of abnormalities on the quality of the final product, this leads to a significant financial loss for hatcheries (e.g. over 50 million € per year for the Mediterranean aquaculture¹). In most of the species, skeletal abnormalities develop during the embryonic, larval and early juvenile stages^{2–6}, due to unfavorable rearing conditions^{7–11}, genetic factors^{12–14} and/or due to occasional accidental deviations from the standard operating procedures. Existing literature suggests that prevalence of skeletal abnormalities might be decreased with the growth of the fish, as a result of the high lethality of some deformity types (e.g. prehaemal kyphosis¹⁵; haemal vertebral compression and fusion³). Recovery of skeletal abnormalities has only been recorded for the case of gill-cover abnormalities of light severity in Gilthead seabream¹⁶ and Atlantic salmon¹⁷. To our knowledge, there is no evidence on the recovery of vertebral abnormalities in finfish.

Vertebral lordosis (V-shape curvature) is a frequent abnormality of the reared finfish. Depending on the abnormality severity, the effects of lordosis on the external morphology display a continuous distribution, ranging from insignificant to severe body-shape alterations¹⁸. In physoclistous fish, lordosis was initially shown to affect the prehaemal vertebrae and arise from the failure of swimbladder inflation^{19,20}. As it was later reported in *Dicentrarchus labrax*²¹ and *Pagrus major*²², lordosis may also develop in fish with a normally inflated swimbladder, on the haemal part of the vertebral column, as a result of high swimming activity. Nowadays, prehaemal lordosis is considered as a solved problem for finfish hatcheries, through mainly the application of appropriate methodology for the successful inflation of the swimbladder¹. Concerning haemal lordosis, existing literature suggests that controlling the swimming intensity of the early juveniles might not completely solve the problem, since more factors have been shown to be significantly involved in its development (e.g. developmental temperature^{10,23}; retinol levels in the larval diet²⁴; genetic background¹²).

We examined whether haemal lordosis is further evolving during the growth of fish, in terms of its prevalence and effects on body shape. To reach this goal, we electronically tagged a juvenile population of Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) at the end of the hatchery phase and we followed fish morphology up to the end of the on-growing period. Selected fish is a major species of the European aquaculture, with a production of 161 thousand tons and 700 million juveniles in 2016 (source: FEAP).

¹Biology Department, University of Crete, Herakleion, Crete, Greece. ²Andromeda S.A., PEO Patron-Athinon 55, Agios Vasiliou, 26500, Rion, Greece. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.K. (email: gkoumound@uoc.gr)

Age (days post tag)	SL (mm)	°C days	n	Method of examination
1	86 ± 7	24	1700	Ext
77	142 ± 8	1934	1605	Ext
282	201 ± 13	5572	1507	Ext
371	240 ± 17	7209	1438	Ext
434	262 ± 14	8816	1376	Ext/x-rays

Table 1. Age, Standard Length (SL, mean ± SD) and number of fish which were photographed in each sampling period. Of the initially 1700 tagged fish, 1376 survived up to the end of the examined period. Ext, external morphology. °C days, the product of age with water temperature.

Materials and Methods

Experimental design and fish origin. One thousand seven hundred seabream juveniles (86 ± 7 mm standard length, SL) were tagged electronically (FDX-B, Trovan Ltd, USA). Fish morphology was examined periodically until the end of the on-growing period (commercial size, 262 ± 14 mm SL) (Table 1). During each sampling, all specimens were anaesthetized by bath immersion (ethyleneglycol-monophenylether, Merck, 0.2–0.5 mL L⁻¹), photographed on the left side and scanned for ID recognition before returning to the sea cage. All photographs were taken by means of a Canon PowerShot G9 camera, mounted on a tripod and positioned perpendicularly to the specimens. In each sampling period, missing fish were recorded. The significance of the differences in mortality rate between the two groups of fish (i.e. lordotic and normal) at each sampling age was tested by G-test²⁵.

The examined group of fish originated from a common larval population and egg batch. Fish were reared according to the standard methodology followed by commercial hatcheries and cage farms for juvenile production and on-growing respectively²⁶. At the end of the hatchery phase, 2000 juveniles (6.1 ± 1.9 g mean weight, 137 days post-hatching, dph) were transported to a commercial sea cage (6 m length, 6 m width, 8 m depth) for on-growing. Larvae were reared at an initial stocking density of 100 individuals per litre, in the presence of background phytoplankton (*Chlorella* sp.), with feeding on rotifers *Brachionus plicatilis* (5–27 dph), *Artemia* sp. nauplii (17–40 dph), and finally on inert commercial diets (>27 dph). Water temperature was maintained between 19–21 °C during the hatchery period, whereas during on-growing period it followed the natural seasonal fluctuations (Fig. S1). Rearing of Gilthead seabream embryos, larvae and juveniles was performed under routine production conditions at Andromeda S.A. This company is registered (registration number GGN 5200700699992) for aquaculture production in Greece and has secured a GLOBALG.A.P quality certification, which requires a certified Veterinary Doctor to periodically verify fish health and welfare. Animal sampling followed routine procedures and samples were collected by a qualified member of staff from a standard production cycle. The legislation and measures implemented by the commercial producer complied with existing Greek (PD 56/2013) and EU (Directive 63/2010) legislation (protection of animals kept for farming). Production and sampling, by an experienced worker, were optimised to avoid unnecessary pain, suffering or injury and to maximise larval survival.

Categorization of the external morphology. Morphological examination of lordosis was carried out by three independent observers and it was blind in respect to fish pit-tag number. Discrimination of the fish with lordotic external morphology from those with a normal one was based on the dorsal shift of the caudal peduncle in the abnormal fish²³ (Fig. 1A,B). Fish without a typical normal or lordotic external morphology were categorized as of uncertain phenotype (Fig. 1C).

To validate the methodology followed for the examination of external morphology, a random sample of 100 juveniles was taken from the source population, simultaneously to the tagging of experimental fish. Sampled juveniles were anaesthetized, photographed and stored at –20 °C. Based on their external morphology, juveniles were scored as normal, lordotic or of uncertain phenotype (Fig. 1). Subsequently, the results of phenotypic scoring were radiographically validated.

Based on the evolution of external morphology during the studied period, 146 adults were taken at 434 days post-tagging (dpt) and radiographically examined to further analyze and verify the observed external morphology. Radiographed adults were representative samples of fish with different external phenotypes (Table 2). All samples collected for x-raying, were euthanatized with an overdose of anesthetic. Radiography was performed with 50 KV voltage, 400 mA intensity and 0.002 s exposure time (Econet medical PpP-60HF, AGFA CR10).

Morphometric analyses. Differences in body shape between juveniles (1 day post-tagging, dpt) with a normal, lordotic or uncertain external morphology were examined by geometric morphometry. Analysis included all the 174 juveniles of lordotic and uncertain external morphology (Table 2), together with a random sample of 150 juveniles with normal morphology. A similar analysis was performed on the 71 lordotic fish and the 17 fish of uncertain morphology at the final sampling (434 days post-tagging, Table 2), together with a random sample of 50 fish with normal morphology.

Differences in body shape between adults that recovered from lordosis and those with a normal external morphology since the beginning of the trial were examined by geometric morphometry. Analysis included all the x-rayed adults with recovered phenotype and 25 randomly selected and x-rayed normal adults (Table 2). All the x-rayed adults with a severe lordosis were also included in the study. Finally, an additional morphometric analysis was performed on the lordotic juveniles (1 day post-tagging), which were classified on those maintaining their

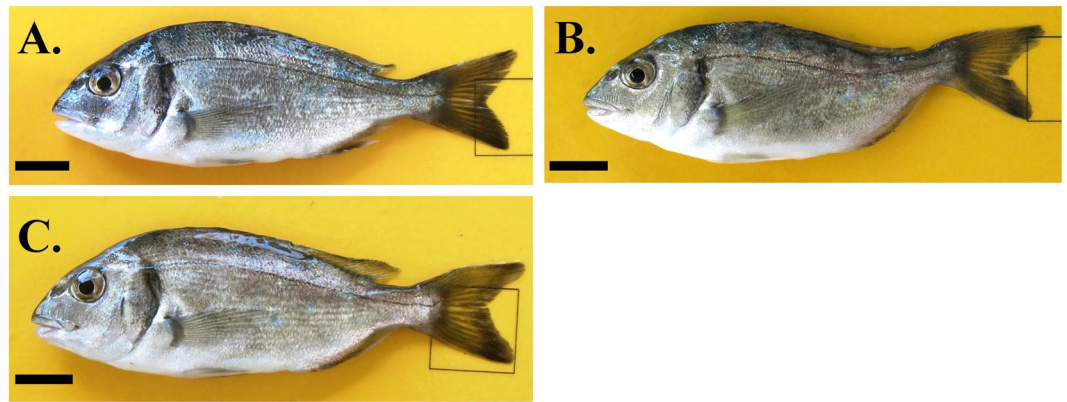


Figure 1. Representative cases of seabream juveniles, at 1 day post-tagging, with normal (A), lordotic (B) and uncertain (C) external morphology. Categorization was primarily based on the dorsal shift of the caudal peduncle in the abnormal fish (B). Scale bars equal to 1 cm.

Final external phenotype (434 dpt)	Initial external phenotype (1 dpt)	Total	Number of radiographed fish	% of fish radiographed
N	N	1199	25	2
	Un	25	13	52
	L	61	41	67
Un	N	3	—	—
	Un	4	2	50
	L	13	11	85
L	N	0	—	—
	Un	5	5	100
	L	66	49	74

Table 2. Number of adult fish which were radiographed at 434 days post-tagging. A representative number of fish was randomly taken by each group, on the basis of the evolution of external morphology from tagging (1 day post-tagging) to the end of the trial (434 days post-tagging). N, fish with a normal external morphology. Un, fish with uncertain external morphology. L, fish with lordotic external morphology. dpt, days post-tagging.

external lordotic phenotype (sevL, severely lordotic) up to the end of the on-growing period, and juveniles that presented a recovered normal phenotype at 434 days post-tagging. The study also included 33 randomly selected normal juveniles.

In all analyses, fourteen landmark measurements were taken on the digital photographs of the examined fish using tpsDig2 software²⁷ (Fig. 2). In order to adjust the individuals for centroid size and remove from the landmark configurations any effect irrelevant to shape, a generalized least square method was applied (coordGen6H software package²⁸). TpsRelw software²⁹ was used to calculate the weight matrix (partial warps, with uniform and non-uniform components of shape variation). Canonical variate analysis on the weight matrix was applied to test the effect of lordosis on body shape. Finally, to visualize the variation between the groups, spline diagrams were obtained after the regression of shape components on the canonical scores (tpsRegr software³⁰).

Results

Validation of the phenotypic categorization by means of external morphology. Examination of the external morphology of the 100 juveniles sampled at 1 day post-tagging, revealed that 78 fish were normal (N) and 17 lordotic (L), whereas 5 fish presented an uncertain phenotype (Un) (Fig. 3). The following radiographic examination of the specimens showed that of the 78 N fish, the 74 had a completely normal vertebral column (N/n, Fig. 3), whereas the remaining 4 fish had a lordosis of light severity (N/l-L) (Fig. 3). All fish with lordotic external morphology (L group) presented a severely lordotic vertebral column (L/s-L, Fig. 3). Finally, the five specimens with uncertain external morphology, presented lordosis of light severity (Un/l-L, Fig. 3). In overall, external phenotypic scoring was verified by the radiographic examination in the 95% of normal and 100% of lordotic fish. The applied method of external phenotypic scoring failed to detect the four fish with light internal lordosis, which were categorized as of normal external phenotype (N/l-L).

Evolution of haemal lordosis frequency during the on-growing period. At tagging, phenotypic categorization of the 1700 fish by means of external morphology, showed that the 10.5% of them were lordotic and the 87.0% normal, whereas the 2.5% of the fish were categorized as of uncertain morphology. During the

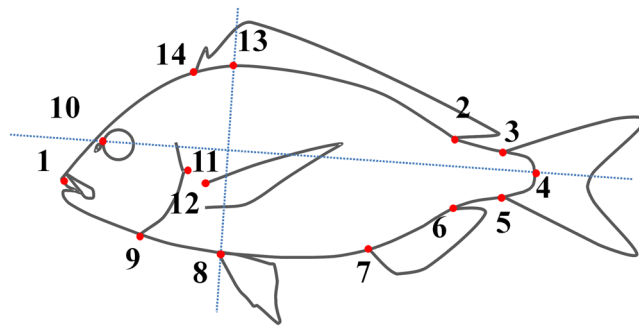


Figure 2. Landmarks collected in the present study. 1, Anterior tip of upper jaw; 2, posterior base of the dorsal fin; 3, dorsal tip of the base of caudal fin; 4, base of the central caudal lepidotrichium; 5, ventral tip of the base of caudal fin; 6, 7, posterior and anterior base of the anal fin, respectively; 8, base of the pelvic fins; 9, ventral tip of the gill cover; 10, anterior margin of the eye, dorsally to the nostril; 11, posterior tip of the gill cover; 12, dorsal base of the left pectoral fin; 13, projection of the landmark 8 on the dorsal profile of fish, perpendicularly to the axis which is defined by landmarks 4 and 10. 14, anterior base of the dorsal fin. (modified from Fragkoulis *et al.* 2017).

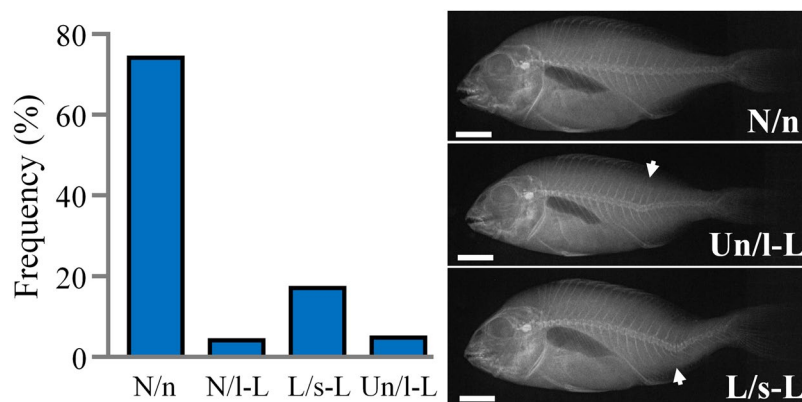


Figure 3. Frequency of the fish with normal (N), lordotic (L) and uncertain (Un) external morphology in the validation sample. Following the phenotypic categorization by means of external morphology, all individuals were examined in association with the radiographic appearance of the vertebral column (n, normal; l-L, lordosis of light severity; s-L, severe lordosis). Arrows indicated the lordosis center. Scale bars are equal to 1 cm.

examined on-growing period, the frequency of lordotic fish substantially decreased to 5.8% at 77 dpt (days post-tagging) and 5.2% at 434 dpt (Fig. 4A). The frequency of normal fish increased to 90.2% at 77 dpt and 93.4% at 434 dpt (Fig. 4B).

Changes in the prevalence of normal and deformed fish could not be attributed to a comparatively higher mortality rate of the latter. Results demonstrated that no significant differences existed in the mortality rate between normal and lordotic fish ($p > 0.05$, G-test). Cumulative mortality rate was 18.7% for normal and 21.8% for lordotic fish (as they were phenotypically scored at tagging) (Fig. 5).

Recovery of haemal lordosis during the on-growing period (1–434 dpt, days-post-tagging).

Monitoring of the external morphology of each abnormal specimen during fish growth, revealed that 20.7% of the fish with lordotic morphology turned into normal phenotype at 77 days post-tagging (dpt). By the end of the on-growing period (434 dpt), 43.6% of the initially lordotic fish presented a completely normal external phenotype (Fig. 6A). At the same time, in 9.3% of the cases, the initially abnormal morphology was turned to uncertain (Fig. 6A). A similar recovery trend was observed in the case of fish with an uncertain external phenotype at 1 dpt, where a substantially higher recovery rate was detected (67.6% at 77dpt, 73.5% at 434 dpt, Fig. 6B).

Recovery of haemal lordosis was verified by the following radiographic examination of the fish at the end of the experiment (434 days post-tagging, dpt). Among fish with recovered external morphology, 26.8% presented a complete recovery of the vertebral column, without any abnormality of individual vertebrae (14.6%, Figs 7A and 8A) or with minor abnormalities of individual centra (12.2%, Figs 7A and 8B). The 48.8% of the fish with recovered external morphology presented a light lordosis (Figs 7A and 8C), whereas 24.4% of them showed a counterbalancing kyphosis anteriorly to lordosis (Figs 7A and 8D). The majority (72.7%) of lordotic specimens which turned to uncertain external appearance at 434 dpt, presented a severe lordosis (Figs 7A and 8E). The partial recovery of haemal lordosis, was also radiographically verified in the case of fish with initially uncertain phenotype (Fig. 7B). Finally, severe vertebral lordosis was present on the radiographies of all the specimens with lordotic external morphology at 434 dpt (Figs 7A and 8F).

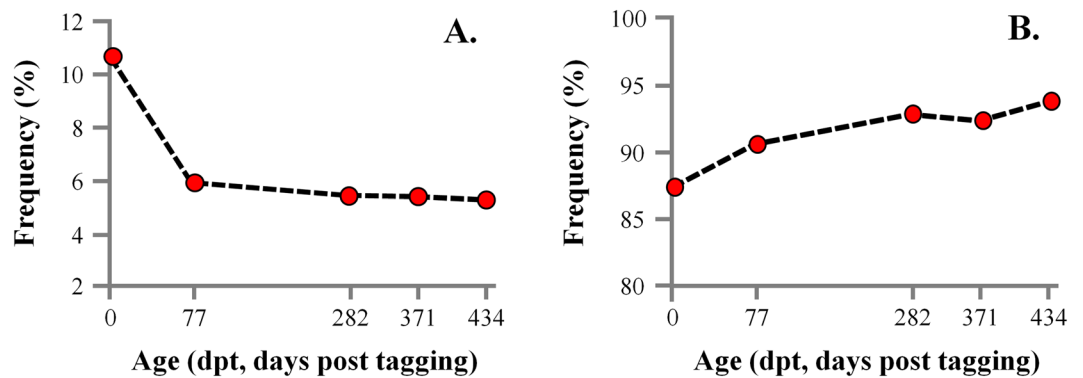


Figure 4. Frequency of the lordotic (A) and normal (B) fish in the different sampling periods. Categorization was performed on the basis of fish external morphology.

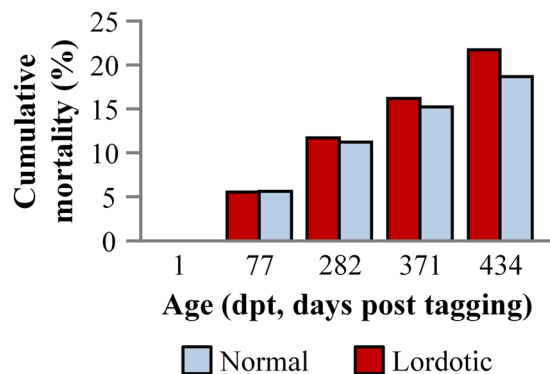


Figure 5. Cumulative mortality of normal and lordotic fish, as they were scored at tagging. No significant differences were observed in the mortality rate between the two groups of fish ($p > 0.05$, G-test).

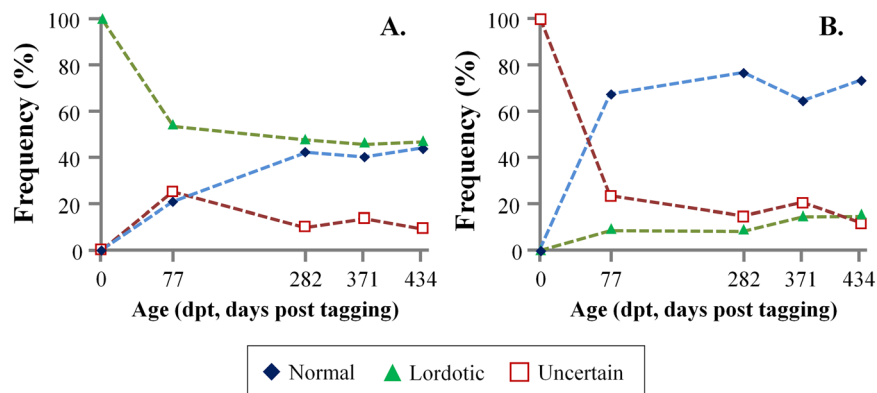


Figure 6. Evolution of the external phenotype of the initially abnormal juveniles (at tagging) throughout the on-growing period. (A) Fish with lordotic external morphology at 1 day post-tagging. (B) Fish with uncertain external morphology at 1 dpt. During the growth of the fish, the frequency of the lordotic and unclear fish was decreased in favor of the normal fish.

Effect of lordosis on the body shape of seabream at the beginning and the end of on-growing period. Canonical variate analysis revealed that lordosis significantly affected the body shape of seabream at both 1 and 434 days post-tagging (Wilks $\lambda = 0.262$ and 0.261 respectively, $p < 0.001$, Fig. 9). In both analyses, the first canonical axis (CV1) explained the majority of phenotypic variance (90.0–93.0%), discriminating normal from lordotic fish. Fish of uncertain phenotype were distributed between normal and lordotic groups (Fig. 9). In the first sampling period, squared Mahalanobis distances were significantly different between all the examined groups (Fig. 9A), whereas in the final sampling only normal fish were significantly different from the lordotic and uncertain groups (Fig. 9B). Spline diagrams demonstrated that abnormal fish were characterized by a ventral

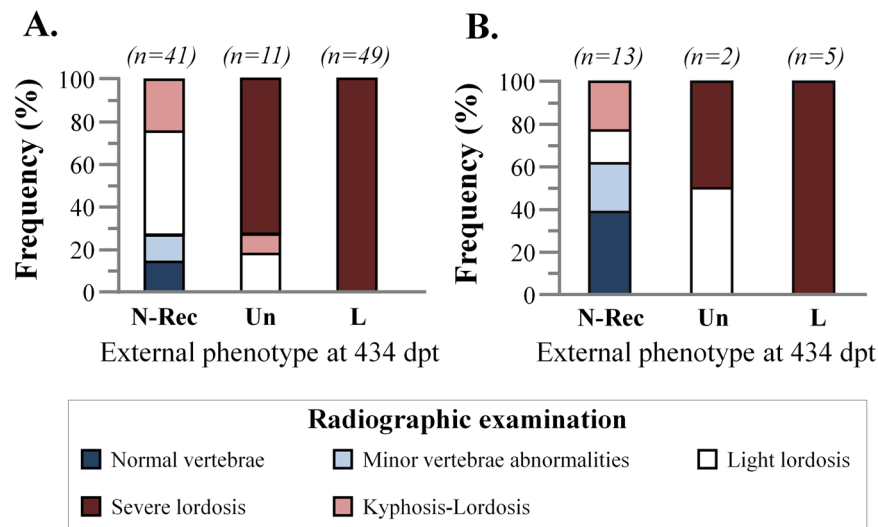


Figure 7. Radiographic categorization of the fish at the end of the on-growing period (434 days post-tagging). **(A)** Fish with lordotic external morphology at 1 dpt. **(B)** Fish with uncertain external morphology at 1 dpt. N-Rec, fish with a normal external morphology. Un, fish with uncertain external morphology. L, fish with lordotic external morphology. Representative images of the different radiographic phenotypes are given in Fig. 8.

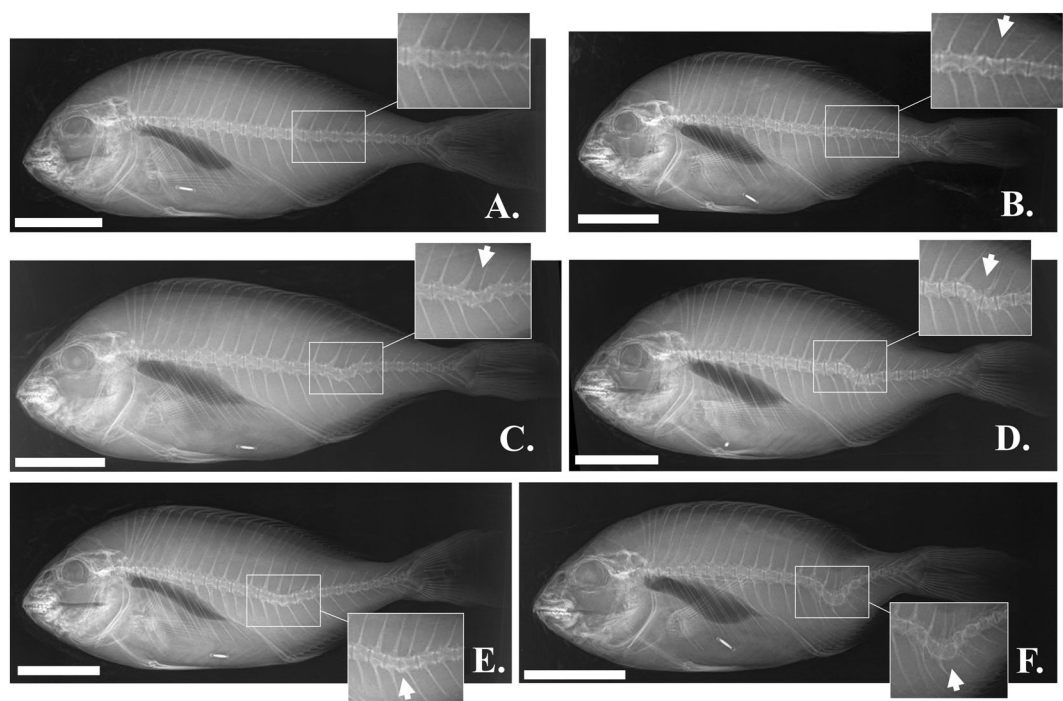


Figure 8. Haemal lordosis (C–F) of variant severity in seabream at the end of the on-growing period (434 days post-tagging). **(A)** Normal fish. **(B)** Normal fish with minor abnormalities of individual centra (arrow). **(C)** Fish with light internal lordosis and a normal external phenotype. **(D)** Fish with a kyphosis anterior to lordosis. **(E)** Fish with an uncertain external morphology and a severe internal lordosis. **(F)** Fish with an abnormal external morphology and a severe internal lordosis. Scale bars are equal to 5 cm.

transposition of the anterior base of the anal fin (landmark 7) and by a dorsal-anterior shift of the caudal peduncle (landmarks 2–6, Fig. 9).

Morphometric analysis of the recovery of haemal lordosis. Following radiographic examination of fish at the end of the on-growing period (Fig. 7A), we examined whether fish with a recovered normal

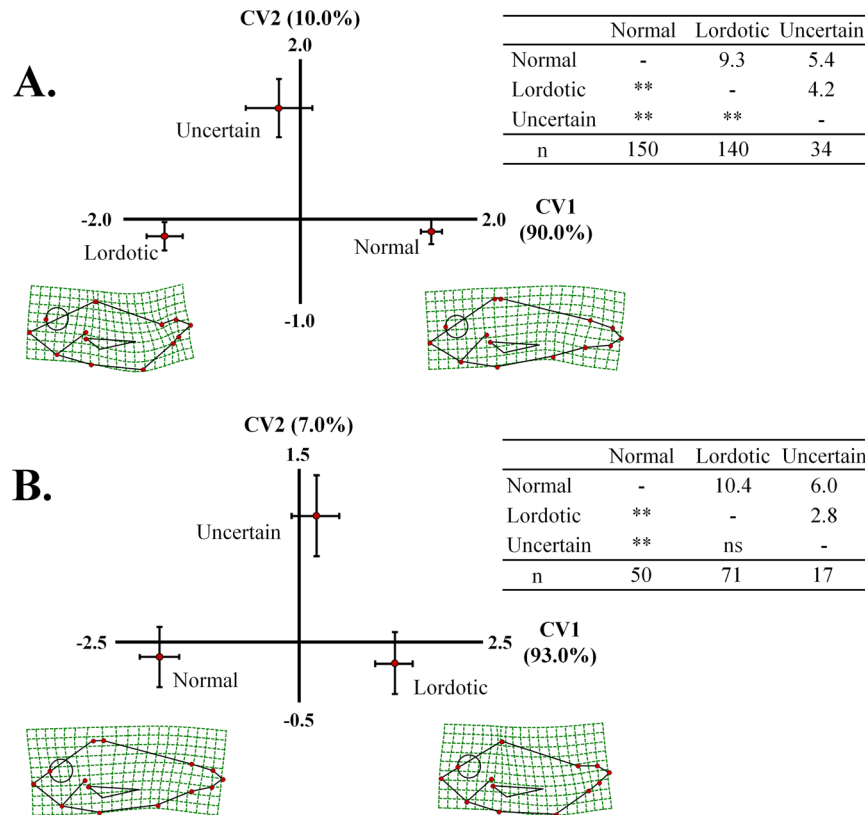


Figure 9. Distribution of the fish with normal, lordotic or uncertain external morphology along the two axes of canonical variate analyses (CV1, CV2). **(A)** Beginning of the on-growing period (1 day post-tagging). **(B)** End of the on-growing period (434 days post-tagging). Means ($\pm 2SE$) of the canonical scores are given. Numbers in brackets are equal to the percentage of shape variance explained by each canonical axis. Spline diagrams demonstrate the components of shape change relative to the extreme values (X1) of CV1. Squared Mahalanobis distances between the different groups and the respective significance levels are given in the tables next to each analysis. ns, $p > 0.05$. ** $p < 0.01$. n, number of specimens in each group.

phenotype differ in body shape from those that were normal since the beginning of the on-growing period (1 day post-tagging, dpt). First axis (CV1) of the canonical variate analysis explained 85.8% of the total variance and discriminated fish with a normal phenotype from those with a lordotic phenotype (Wilks $\lambda = 0.155$, $p < 0.001$, Fig. 10). Squared Mahalanobis distances were significant only between lordotic and normal fish (Fig. 10). Distance between fish with a recovered normal phenotype and fish that were normal since the beginning of the on-growing period (1 dpt), was not significant (Fig. 10).

Lordotic juveniles (1 day post-tagging, dpt) were classified according to their morphological evolution into juveniles that maintained the external lordotic phenotype (sevL) up to the end of the on-growing period (434 dpt), and juveniles that presented a recovered normal phenotype at 434 dpt (N-Rec#, Fig. 11). First axis (CV1) of the canonical variate analysis explained 76.3% of the total variance and discriminated fish with a normal phenotype from lordotic sevL and N-Rec# groups (Wilks $\lambda = 0.420$, $p < 0.001$, Fig. 11). Squared Mahalanobis distances were significant between normal and lordotic fish, independently of the morphological evolution of the latter (Fig. 11). Interestingly, significant body shape differences were detected between lordotic sevL and N-Rec# juveniles (squared Mahalanobis distances, Fig. 11). Spline diagrams demonstrated that shape differences between sevL and N-Rec# lordotic juveniles mainly concerned the severity of the deviation from normal fish (Fig. 11). Use of functions from the canonical variate analysis for the classification of individuals resulted to a successful reclassification of the 94%, 89% and 73% of normal, sevL and N-Rec# fish respectively (Table 3).

Discussion

This study shows that external morphology of lordotic seabream recovers during the on-growing period. The observed recovery rate depended on the initial abnormality severity and ranged from 43.6% in case of fish with severe lordosis, to 73.5% in case of fish with light severity of lordosis. Interestingly, radiographic examination of fish showed that the recovery of lordotic external morphology was accompanied by a partial to complete recovery of the vertebral column. To our knowledge this is the first study documenting the recovery of severe axis abnormalities in fish. In a similar study, Witten *et al.*³¹ demonstrated a remodeling of fused vertebral centra into one non-deformed centrum, which however continued presenting multiple haemal and neural processes.

Decrease of abnormalities prevalence during fish growth is not rare. It is attributed to an increased mortality rate of the abnormal individuals^{3,10,15,32}, or in case of gill-cover abnormalities of light intensity, to the recovery of

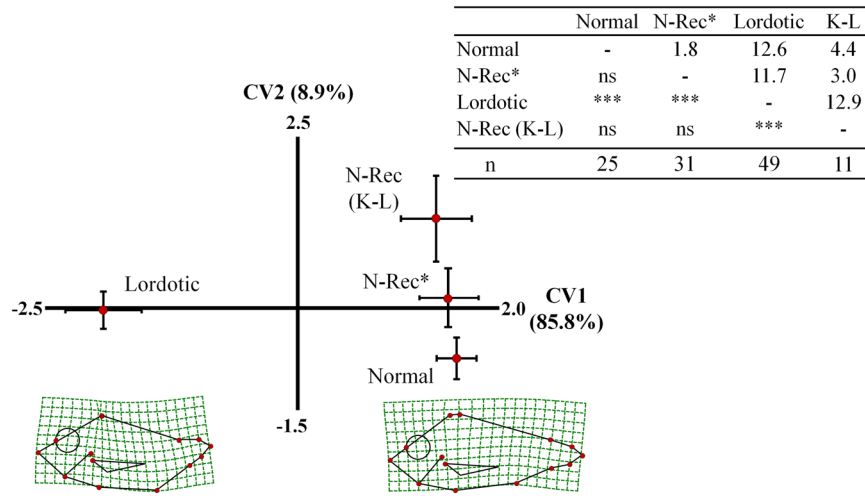


Figure 10. Distribution of the fish of the fifth sample (434 days post-tagging) with a recovered normal (N-Rec*, N-Rec K-L), normal since the 1 dpt (Normal), or a lordotic (Lordotic) phenotype along the two axes of canonical variate analysis (CV1, CV2). Means ($\pm 2SE$) of the canonical scores are given. Numbers in brackets are equal to the percentage of shape variance explained by each canonical axis. Spline diagrams demonstrate the components of shape change relative to the extreme values (X1) of CV1. Squared Mahalanobis distances between the different groups and the respective significance levels are given in the table next to the graph. ns, $p > 0.05$. *** $p < 0.001$. N-Rec*, N-Rec fish of Fig. 6A, excluding the K-L. N-Rec (K,L), K,L fish of Fig. 7A. Lordotic group consisted of the fish of Fig. 6A with severe lordosis. n, number of specimens in each group.

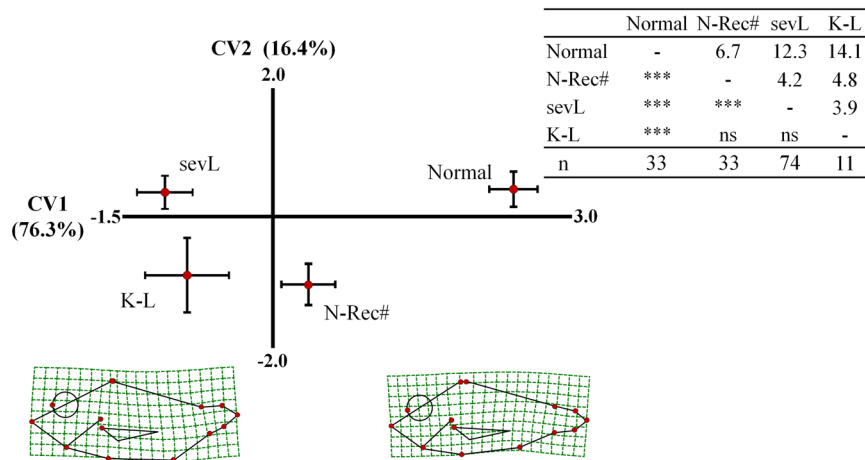


Figure 11. Distribution of lordotic juveniles at the beginning of on-growing (1 day post-tagging) along the first two axes of canonical variate analysis (CV1, CV2). According to their external morphology and radiographic appearance at the end of on-growing period (434 days post-tagging, Fig. 6A), juveniles were categorized into fish with severe lordosis (sevL, Fig. 7A), fish with a recovered normal external phenotype and an internal kyphosis-lordosis (K,L, Fig. 6A), fish with a recovered normal external morphology (N-Rec#, N-Rec and Un fish of Fig. 6A, excluding the K,L and “severe lordosis”), and normal fish since the beginning of the on-growing period (Normal). Means ($\pm 2SE$) of the canonical scores are given. Numbers in brackets are equal to the percentage of shape variance explained by each canonical axis. Spline diagrams demonstrate the components of shape change relative to the extreme values (X1) of CV1. Squared Mahalanobis distances between the different groups and the respective significance levels are given in the table next to the graph. ns, $p > 0.05$. *** $p < 0.001$. The sevL group consisted of the 57 fish of Fig. 6A (“Severe Lordosis”) and another 17 fish with lordotic external morphology, which were not x-rayed. n, number of specimens in each group.

abnormal phenotype^{16,17}. In the present study, the decreased incidence of lordosis during the growth of Gilthead seabream can not be attributed to a lethal effect of the deformity, since differences in the mortality rate between normal and lordotic fish were not significant. Moreover, the morphological monitoring of pit-tagged individuals during on-growing period revealed that the decrease in the incidence of abnormality was a result of recovery of the lordotic phenotype. In support of this conclusion, at the end of the on-growing period, geometric morphometric analysis showed that there were no significant differences in body shape between fish with a recovered

	sevL	N-Rec#	Normal	K-L	Total
sevL	89	7	3	1	100
N-Rec#	21	73	6	0	100
Normal	0	6	94	0	100
K-L	45	9	0	46	100

Table 3. Classification of the juveniles of Fig. 11 to the different phenotypic categories, based on their morphometry and the classification functions of the canonical variate analysis. A priori classification probabilities were proportional to the initial group sizes. Numbers indicate percentages of correct reclassification (bold) or mis-reclassification of the specimens.

phenotype and those with a normal phenotype since the beginning of the study (Fig. 10). Finally, the recovery of lordosis was also supported by the radiographic examination of fish at the end of the on-growing period (Fig. 7).

In species which are marketed as a whole, establishment of a link between external phenotype and skeleton is a significant goal for the quality assessment of reared fish, since consumers decisions are made on the external morphology^{26,33}. Alterations of body-shape by the presence of haemal lordosis have a continuous range, depending on the angle of the vertebral column at the affected area, and by the number of abnormal vertebrae^{18,23}. With respect to the external morphology, haemal lordosis presents a clear phenotype with a shorter and dorsally shifted caudal peduncle, as well as a ventral shift of the posterior abdominal area^{18,34}. In the present study, dorsal shift of the caudal peduncle was used to discriminate lordotic from normal individuals. This method of morphological categorization was successfully validated by radiographic analysis of the juvenile sample taken at the beginning of the study, with 100% of the fish with a lordotic external morphology presenting lordosis of the vertebral column. Applied methodology only failed to correctly categorize 5% (4 out of 78) of the fish with a normal external morphology and a lordotic vertebral column of very light severity (Fig. 3). Significant differences in body shape between juveniles with a normal, lordotic or uncertain external phenotype furthermore supported the initial categorization of the fish (Fig. 9).

Finfish skeleton is subject to continuous resorption, remodeling and reshaping. These processes are essential for development, growth, repair and adaptation of skeleton to mechanical loads³⁵. Haemal lordosis is known to result from the excess mechanical loads of muscles on the vertebral column, during the swimming of the juveniles in hatchery tanks with relatively high water-current speed^{21–23}. Since lordotic vertebrae are characterized by increased bone volume, flattened dorsal zygapophyses and extra lateral ridges, lordosis has been suggested as an adaptive response of the vertebral column to the new regime of increased loads³⁶. In the present study, lordosis recovery is shown to be the consequence of two different processes; partial to complete repair of the vertebral column (in 75.6% of the fish with a recovered external morphology), and development of counteracting kyphosis-like bending of the vertebral column (Fig. 8D, in the 24.4% of the fish with a recovered external morphology). Both processes might be triggered by fish transfer to sea cages, an environment of -comparatively to the tanks- less intense water current velocities. Under this hypothesis, observed lordosis-recovery could be a result of the adaptation of growing vertebrae to the new swimming environment.

Despite shape alterations of the deformed vertebrae, histopathological organization of lordotic vertebral centra involves the presence of a fibrous cartilage replacing cancellous and compact bone, enlargement of trabecular spaces and a reduction of the notochordal lumen³⁷. Histological processes that took place during the recovery of lordotic vertebrae in the present paper remain unknown. In the only known similar study on the recovery of vertebral fusion in Atlantic salmon, recovered vertebral bodies acquired the typical normal radiographic appearance, following an histological process involving remodeling of notochordal and cartilage tissues and reshaping of the fused vertebral centra³¹.

In marine finfish aquaculture, phenotypic quality of the juveniles at the end of the hatchery phase (1–10 g mean weight) has been widely suggested and used as a precise predictor of the phenotypic quality at the end of the on-growing period (>300 g mean weight)^{1,34,38}. Our results clearly suggest that quality control at the end of the hatchery phase has to take into account the recovery potential of haemal lordosis. Interestingly, as it was shown by body shape analysis (Fig. 11), identification of lordotic juveniles which are expected to recover during on-growing is possible through geometric morphometrics. In future, the automatic sort-out of lordotic juveniles with low recovery potential could be possible through the incorporation of computer-assisted systems in the quality control of reared fish.

Data Availability

All data generated and analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

References

- Boglione, C. *et al.* Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. *Rev Aquacult* **5**, S121–S167 (2013).
- Boglione, C. *et al.* Skeletal anomalies in dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe 1834) juveniles reared with different methodologies and larval densities. *Aquaculture* **291**, 48–60 (2009).
- Loizides, M., Georgiou, A. N., Somarakis, S., Witten, P. E. & Koumoundouros, G. A new type of lordosis and vertebral body compression in Gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.: aetiology, anatomy and consequences for survival. *J Fish Dis* **37**, 949–957 (2014).
- de Azevedo, A. M. *et al.* New insight on vertebral anomalies in cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) at early stages of development. *J Fish Dis* **40**, 987–1000 (2017).

5. Fragkoulis, S. *et al.* Saddleback syndrome in European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758): anatomy, ontogeny and correlation with lateral-line, anal and pelvic fin abnormalities. *J Fish Dis* **40**, 83–95 (2017).
6. Thuong, N. P. *et al.* Ontogenesis of opercular deformities in gilthead sea bream *Sparus aurata*: a histological description. *J Fish Biol* **91**, 1419–1434 (2017).
7. Fernández, I. *et al.* Larval performance and skeletal deformities in farmed gilthead sea bream (*Sparus aurata*) fed with graded levels of Vitamin A enriched rotifers (*Brachionus plicatilis*). *Aquaculture* **283**, 102–115 (2008).
8. Geoga, I. *et al.* Effect of vitamin A on the skeletal morphogenesis of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquac Res* **42**, 684–692 (2011).
9. Cobcroft, J. M., Shu-Chien, A. C., Kuah, M. K., Jaya-Ram, A. & Battaglene, S. C. The effects of tank colour, live food enrichment and greenwater on the early onset of jaw malformation in striped trumpeter larvae. *Aquaculture* **356–357**, 61–72 (2012).
10. Georgakopoulou, E., Katharios, P., Divanach, P. & Koumoundouros, G. Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Aquaculture* **308**, 13–19 (2010).
11. Izquierdo, M. S., Socorro, J. & Roo, J. Studies on the appearance of skeletal anomalies in red porgy: effect of culture intensiveness, feeding habits and nutritional quality of live preys. *J Appl Ichthyol* **26**, 320–326 (2010).
12. Bardon, A. *et al.* What is the heritable component of spinal deformities in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*)? *Aquaculture* **294**, 194–201 (2009).
13. Negrín-Báez, D., Navarro, A., Afonso, J. M., Ginés, R. & Zamorano, M. J. Detection of QTL associated with three skeletal deformities in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): Lordosis, vertebral fusion and jaw abnormality. *Aquaculture* **448**, 123–127 (2015).
14. Fragkoulis, S., Batargias, C., Kolios, P. & Koumoundouros, G. Genetic parameters of the upper-jaw abnormalities in Gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquaculture* **497**, 226–233 (2018).
15. Koumoundouros, G., Maingot, E., Divanach, P. & Kentouri, M. Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. *Aquaculture* **209**, 49–58 (2002).
16. Beraldo, P. & Canavese, B. Recovery of opercular anomalies in gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.: morphological and morphometric analysis. *J Fish Dis* **34**, 21–30 (2011).
17. Amoroso, G., Cobcroft, J. M., Adams, M. B., Ventura, T. & Carter, C. G. Concurrence of lower jaw skeletal anomalies in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and the effect on growth in freshwater. *J Fish Dis* **39**, 1509–1521 (2016).
18. Sfakianakis, D. G., Georgakopoulou, E., Kentouri, M. & Koumoundouros, G. Geometric quantification of lordosis effects on body shape in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* **256**, 27–33 (2006).
19. Kitajima, C., Tsukashima, Y., Fujita, S., Watanabe, T. & Yone, Y. Relationship between uninflated swim bladders and lordotic deformity in hatchery-reared red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakk* **47**, 1289–1294 (1981).
20. Chatain, B. Abnormal swimbladder development and lordosis in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus auratus*). *Aquaculture* **119**, 371–379 (1994).
21. Divanach, P., Papandroulakis, N., Anastasiadis, P., Koumoundouros, G. & Kentouri, M. Effect of water currents on the development of skeletal deformities in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) with functional swimbladder during postlarval and nursery phase. *Aquaculture* **156**, 145–155 (1997).
22. Kihara, M., Ogata, S., Kawano, N., Kubota, I. & Yamaguchi, R. Lordosis induction in juvenile red sea bream, *Pagrus major*, by high swimming activity. *Aquaculture* **212**, 149–158 (2002).
23. Sfakianakis, D. G. *et al.* Environmental determinants of haemal lordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Aquaculture* **254**, 54–64 (2006).
24. Mazurais, D. *et al.* Optimal levels of dietary vitamin A for reduced deformity incidence during development of European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*) depend on malformation type. *Aquaculture* **294**, 262–270 (2009).
25. Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. 2nd edn, (W.H. Freeman and Company, 1981).
26. Fragkoulis, S. *et al.* Scaling of body-shape quality in reared gilthead seabream *Sparus aurata* L. Consumer preference assessment, wild standard and variability in reared phenotype. *Aquac Res* **48**, 2402–2410 (2017).
27. tpsDig2, Digitize Landmarks and Outlines v. 2.12 (Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY, USA 2010).
28. IMP, Coordinate Generating Utility, CoordGen6h (2001).
29. TpsRelw, Relative Warps Analysis v. 1.49 (Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY, USA, 2010).
30. TpsRegr, Shape Regression v. 1.38 (Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY, USA, 2011).
31. Witten, P. E., Obach, A., Huisseune, A. & Baevefjord, G. Vertebrae fusion in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Development, aggravation and pathways of containment. *Aquaculture* **258**, 164–172 (2006).
32. Koumoundouros, G., Oran, G., Divanach, P., Stefanakis, S. & Kentouri, M. The opercular complex deformity in intensive gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) larviculture. Moment of apparition and description. *Aquaculture* **156**, 165–177 (1997).
33. Losada, A. P. *et al.* Skeletal malformations in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858): Gross morphology and radiographic correlation. *J Appl Ichthyol* **30**, (804–808 (2014)).
34. Koumoundouros, G. *Morpho-anatomical abnormalities in Mediterranean marine aquaculture*. 125–148 (Transworld Research Network, 2010).
35. Witten, P. E. & Huisseune, A. A comparative view on mechanisms and functions of skeletal remodelling in teleost fish, with special emphasis on osteoclasts and their function. *Biol Rev Camb Philos* **84**, 315–346 (2009).
36. Kranenbarg, S., Waarsing, J. H., Muller, M., Weinans, H. & van Leeuwen, J. L. Lordotic vertebrae in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) are adapted to increased loads. *J Biomech* **38**, 1239–1246 (2005).
37. Ortiz-Delgado, J. B., Fernández, I., Sarasquete, C. & Gisbert, E. Normal and histopathological organization of the opercular bone and vertebrae in gilthead sea bream *Sparus aurata*. *Aquat Biol* **21**, 67–84 (2014).
38. Koumoundouros, G. *et al.* In *Success Factors for Fish Larval Production* (eds Luís Conceição & Amos Tandler) 435–465 (Wiley Blackwell, 2018).

Acknowledgements

This study has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 727610 (PerformFISH). This output reflects only the author's view and the European Union cannot be held responsible for any use that may be made of the information contained therein. We would like to thank E. Karagiannakidis (MD radiologist) and M. Bastouna for their contribution in fish radiography, as well as K. Tzokas, A. Glaropoulos, P. Koutsopodiotis and G. Moukas for their contribution in fish husbandry and sampling.

Author Contributions

G.K. conceived the study; G.K. and N.K. designed research; S.F., A.P. and G.G. took the fish photographs; S.F., A.P. and G.K. carried out the morphological categorisation of the fish. S.F. carried out the morphometric analyses. S.F. and G.K. analyzed the data; N.K. supervised the husbandry of the fish. S.F. and G.K. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46334-1>.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019