ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Ταυτοποίηση αποθεμάτων τσιπούρας (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) στον Ελλαδικό χώρο. Μορφολογική και Γενετική ποικιλομορφία.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΓΕΛΑΔΑΚΗΣ

Ηράκλειο 2021

Επιβλέπων Καθηγητής
Κουμουνδούρος Γεώργιος (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή
Κουμουνδούρος Γεώργιος (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
Σωμαράκης Στυλιανός (Διευθυντής Ερευνών, ΕΛΚΕΘΕ)
Μπαταργιάς Κωνσταντίνος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών)

Επταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή
Κουμουνδούρος Γεώργιος (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
Σωμαράκης Στυλιανός (Διευθυντής Ερευνών, ΕΛΚΕΘΕ)
Μπαταργιάς Κωνσταντίνος (Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών)
Καρακάσης Ιωάννης (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
Λαδουκάκης Εμμανουήλ (Αναπληρωτής Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Κρήτης)
Λεονάρδος Ιωάννης (Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων)
Στεργίου Κωνσταντίνος (Καθηγητής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης)

Στους γονείς μου

και στην Ειρήνη

"*Ο άνθρωπος είναι η απάντηση, όποια κι αν είναι η ερώτηση*"

André Breton

Πρόλογος

Η παρούσα Διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Θαλάσσιας Βιολογίας-Βιολογίας Ιχθύων, του τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης σε συνεργασία με το εργαστήριο Αλιευτικής Βιολογίας, του Ινστιτούτου Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων και Εσωτερικών Υδάτων (ΙΘΑΒΙΠΕΥ) του Ελληνικού Κέντρου Θαλασσίων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) και το εργαστήριο Εφαρμοσμένης Γενετικής & Γενετικής Βελτίωσης του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής, Αλιείας και Υδατοκαλλιεργειών του Πανεπιστημίου Πατρών.

Το μεγαλύτερο ευχαριστώ θα ήθελα να το αποδώσω στον υπεύθυνο Καθηγητή μου Γεώργιο Κουμουνδούρο για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου ως προς την διεκπεραίωση της παρούσας διατριβής. Από το προπτυχιακό μου, ξεκίνησα την ερευνητική μου πορεία στο εργαστήριο του, όπου με δίδαξε τον επιστημονικό τρόπο σκέψης και κριτικής, την εμβάθυνση σε διαφορετικά επιστημονικά πεδία καθώς και το να μαθαίνω από τα λάθη μου ώστε να βελτιώνομαι. κ. Κουμουνδούρο σας ευχαριστώ πραγματικά για την υπομονή, την στήριξη και την άμεση ανταπόκριση που μου έχετε δείξει όλα αυτά τα χρόνια.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Στέλιο Σωμαράκη για την συνεχή παροχή γνώσεων στη διάρκεια της διατριβής μου όσον αφορά θέματα αλιευτικής επιστήμης, βιολογίας και στατιστικής καθώς και τη βοήθεια του στην ανάλυση και την στατιστική επεξεργασία των δεδομένων. Ένα ακόμα μεγάλο ευχαριστώ στον Καθηγητή Κώστα Μπαταργιά, ο οποίος με δέχθηκε θερμά στο εργαστήριο του στο Μεσολόγγι, με εκπαίδευσε ως προς την γενετική επεξεργασία και ανάλυση των δειγμάτων μου και με δίδαξε πάνω σε θέματα που αφορούν την γενετική ποικιλότητα των πληθυσμών.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που μεσολάβησαν για τη λήψη των δειγμάτων: την κ. Νότα Περιστεράκη, ερευνήτρια του ΕΛΚΕΘΕ, τον Δρ. Σωτήρη Κυπαρίσση, ερευνητή του Ινστιτούτου Αλιευτικής Έρευνας (ΙΝΑΛΕ) στη Καβάλα, τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Θανάση Τσίκληρα από το Πανεπιστήμιο της Θεσσαλονίκης, καθώς και το προσωπικό της εταιρίας ιχθυοκαλλιεργειών AVRAMAR.

Ένα θερμό ευχαριστώ, σε όλους τους αγαπημένους συνεργάτες από το Εργαστήριο Βιολογίας Ιχθύων του Πανεπιστημίου Κρήτης. Συγκεκριμένα τη Νατάσσα, το Στέφανο, τη Χαρά και την Αλίκη και για την στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια καθώς και την προσφορά άμεσης βοήθειας όποτε την χρειαζόμουν.

Τελειώνοντας, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους φίλους και τους δικούς μου ανθρώπους για τη συνεχή στήριξη και την εμψύχωση που μου πρόσφεραν όλο αυτό το χρονικό διάστημα. Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στον φίλο μου Ιάσωνα, που παρόλο που οι δρόμοι μας χώρισαν, με στήριξε όσο κανένας άλλος στο Ηράκλειο και με ενέπνευσε με τον αναλυτικό και επιστημονικό τρόπο σκέψης του.

Κλείνοντας, χρωστάω το πιο θερμό και μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και ιδιαίτερα στην μητέρα μου και τον πατέρα μου, που πιστεύουν σε εμένα, με στηρίζουν με κάθε τρόπο και μου προσφέρουν συνεχώς την αγάπη τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ 1
ABSTRACT 4
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ 7
1.1 Αλιευτικά αποθέματα 7
1.2 Σημασία προσδιορισμού των αποθεμάτων 7
1.3 Χαρακτηριστικά διαφοροποίησης μεταξύ αποθεμάτων 8
1.4 Φαινοτυπική πλαστικότητα 9
1.5 Εργαλεία διάκρισης αποθεμάτων 10
1.5.1 Γενετικοί και μοριακοί δείκτες 10
1.5.2 Φαινοτυπικοί χαρακτήρες 11
1.5.2.1 Σχήμα σώματος 12
1.5.2.2 Μορφολογία ωτολίθων (σχήμα και ασυμμετρία) 13
1.5.2.3 Μορφολογία λεπιών 15
1.5.3 Δεδομένα κατανομής, σύνθεσης και ιστορίας ζωής των αποθεμάτων 17
1.6 Βιολογικά χαρακτηριστικά της τσιπούρας 17
1.7 Στοιχεία καλλιέργειας της τσιπούρας 18
1.8 Γενετική και φαινοτυπική ποικιλομορφία της τσιπούρας στις διαφορετικές περιοχές κατανομής της 20
1.9 Επιπτώσεις της καλλιέργειας της τσιπούρας στους φυσικούς πληθυσμούς 21
1.10 Μέθοδοι διάκρισης εκτρεφόμενης και άγριας τσιπούρας 23
1.11 Στόχοι της παρούσας διατριβής 24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ 26
2.1 Ταυτοποίηση φυσικών αποθεμάτων τσιπούρας 26
2.1.1 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων φυσικής προέλευσης 26
2.1.2 Μορφομετρική ανάλυση σχήματος του σώματος 28
2.1.3 Συντελεστής ευρωστίας (condition factor) 30
2.1.4 Γοναδοσωματικός (G. I.) και Καρδιοσωματικός (H. I.) δείκτης 30
2.1.5 Ανάλυση σχήματος ωτολίθων 31
2.1.6 Ανάλυση μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους ωτολίθων 33
2.1.7 Ανάλυση ασυμμετρίας ωτολίθων 33
2.1.8 Ανάλυση μικροδορυφορικού DNA (microsatellite DNA) 34
2.2 Όρια φαινοτυπικής διακύμανσης των ωτολίθων και των λεπιών ως απόκριση στο περιβάλλον ανάπτυξης 36
2.2.1 Πείραμα επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη μορφολογία των ωτολίθων ... 36

2.2.1.1 Πειραματικός σχεδιασμός και εκτροφή 36

2.2.1.2 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων 37

2.2.1.3 Ανάλυση ωτολίθων 37

2.2.2 Πειράματα επίδρασης του περιβάλλοντος ανάπτυξης στην εξέλιξη της μορφολογίας των ωτολίθων και του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) 38

2.2.2.1 Εκτροφή πληθυσμών ιχθύων στον ιχθυογεννητικό σταθμό και στα κλουβιά πάχυνσης 38

2.2.2.2 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων 39

2.2.2.3 Ανάλυση ωτολίθων 40

2.2.2.4 Εξέταση του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) κατά την ανάπτυξη της τσιπούρας σε διαφορετικά περιβάλλοντα εκτροφής 41

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ 43

3.1 Ταυτοποίηση φυσικών πληθυσμών τσιπούρας μέσω μορφολογικών χαρακτήρων 43

3.1.1 Κύρια βιολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων 43

3.1.2 Ανάλυση του βαθμού αναγέννησης λεπιών (SRD) 44

3.1.3 Σχέση της περιοχής και του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) με το σχήμα των ωτολίθων των ατόμων φυσικής προέλευσης 45

3.1.4 Σχέση της περιοχής και του βαθμού αναγέννησης λεπιών (SRD) με την ασυμμετρία και το μέγεθος των ωτολίθων των ατόμων φυσικής προέλευσης 51

3.1.5 Σχέση της περιοχής και του βαθμού αναγέννησης λεπιών (SRD) με το σχήμα του σώματος των ατόμων φυσικής προέλευσης 53

3.1.6 Σχέση της περιοχής προέλευσης και του βαθμού αναγέννησης λεπιών (SRD) με τον συντελεστή ευρωστίας (condition factor) των ατόμων φυσικής προέλευσης 60

3.1.7 Σχέση μεταξύ του σχήματος του σώματος και του συντελεστή ευρωστίας στα δείγματα φυσικής προέλευσης 61

3.1.8 Σχέση της περιοχής και του βαθμού αναγέννησης λεπιών με τον γοναδοσωματικό (G.I.) και καρδιοσωματικό (H.I.) δείκτη των δειγμάτων φυσικής προέλευσης 62

3.1.9 Σύγκριση της μορφολογίας των ωτολίθων μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων 63

3.1.10 Σύγκριση του σχήματος του σώματος και του συντελεστή ευρωστίας μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων 68

3.2 Ταυτοποίηση της γενετικής δομής φυσικών πληθυσμών τσιπούρας μέσω της χρήσης τόπων μικροδορυφορικού DNA 70

3.2.1 Σχέση της περιοχής και του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) με τη γενετική ποικιλομορφία των ατόμων φυσικής προέλευσης 71

3.2.2 Σύγκριση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων 74

3.3 Όρια μορφολογικής διακύμανσης των ωτολίθων και των λεπιών τσιπούρας 76
3.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας πρώιμης ανάπτυξης στη μορφολογία των ωτολίθων πειραματικών πληθυσμών τσιπούρας 76
3.3.1.1 Τέλος σταδίου μεταμόρφωσης (56-58 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph) 76
3.3.1.2 Στάδιο ιχθυδίου (93-95 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph) 81
3.3.1.3 Εξέλιξη της ασυμμετρίας των ωτολίθων από το τέλος του σταδίου της μεταμόρφωσης έως το στάδιο του ιχθυδίου 84
3.3.2 Επίδραση του περιβάλλοντος εκτροφής στη μορφολογία των ωτολίθων πληθυσμών τσιπούρας κατά την περίοδο της σωματικής τους αύξησης 86
3.3.2.1 Μέσο της περιόδου πάχυνσης (136-165 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph) 86
3.3.2.2 Τέλος της παραγωγής (314-393 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph) 89
3.3.2.3 Εξέλιξη του σχήματος των ωτολίθων από το στάδιο του ιχθυδίου μέχρι το ενήλικο 91
3.3.2.4 Εξέλιξη της ασυμμετρίας των ωτολίθων από το στάδιο του ιχθυδίου μέχρι το ενήλικο 93
3.3.3 Σχέση του βαθμού αναγέννησης των λεπιών με την ηλικία και το περιβάλλον ανάπτυξης της εκτρεφόμενης τσιπούρας 95
4. Συζήτηση 98
4.1 Σύνοψη κύριων αποτελεσμάτων 98
4.2 Διάκριση γεωγραφικών ομάδων τσιπούρας 99
4.2.1 Φαινοτυπική διάκριση 99
4.2.2 Γενετική διάκριση 101
4.3 Διάκριση δραπετών ψαριών εντός των φυσικών πληθυσμών 102
4.3.1 Χρήση του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) 102
4.3.2 Χρήση μορφολογικών χαρακτήρων (μορφολογία ωτολίθων, σχήμα σώματος) .. 104
4.3.3 Χρήση μικροδορυφορικού DNA 105
4.4 Όρια φαινοτυπικής πλαστικότητας των ωτολίθων στη τσιπούρα 107
4.4.1 Σχήμα ωτολίθων 107
4.4.2 Ασυμμετρία ωτολίθων 108
4.5 Διαφορές μεταξύ άγριας και εκτρεφόμενης τσιπούρας 110
4.5.1 Μορφολογικές διαφορές 110
4.5.2 Γενετικές διαφορές 112
4.6 Γενική συζήτηση - Συμπεράσματα 113
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ 115
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ 128

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ταυτοποίηση των ιχθυοαποθεμάτων είναι μείζονος σημασίας για τη σύγχρονη αλιευτική επιστήμη καθώς αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της αλιευτικής διαχείρισης και στόχο έχει την αειφόρο παραγωγή. Στη διάκριση των αποθεμάτων ψαριών έχει χρησιμοποιηθεί πλήθος μεθόδων, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χρήση μορφολογικών και γενετικών δεικτών καθώς και χαρακτηριστικών της ιστορίας ζωής των ψαριών. Στόχος της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής, ήταν η ταυτοποίηση φυσικών αποθεμάτων τσιπούρας στον Ελλαδικό χώρο μέσω της χρήσης μορφολογικών και γενετικών χαρακτήρων, καθώς και η μελέτη των ορίων φαινοτυπικής διακύμανσης των ωτολίθων και των λεπιών του είδους, ως απόκριση στο περιβάλλον ανάπτυξης. Για την ταυτοποίηση των αποθεμάτων, πραγματοποιήθηκε συγκριτική μελέτη γεωγραφικά διακριτών δειγμάτων τσιπούρας (*Sparus aurata*), ως προς τη φαινοτυπική διακύμανση των ωτολίθων (σχήμα, μέγεθος και ασυμμετρία) και του σώματος (σχήμα) των ψαριών, καθώς και ως προς την ποικιλομορφία γενετικών τόπων μικροδορυφορικού DNA. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από το Βόρειο, το Κεντρικό-Δυτικό (Μαλιακός Κόλπος) και το Κεντρικό-Ανατολικό (Κάλυμνος) Αιγαίο, από διαφορετικές περιοχές του Ιονίου πελάγους (Κεντρικό Ιόνιο, Κέρκυρα, Πατραϊκός) καθώς και από τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου τα έτη 2014-2018. Δείγματα από δύο διαφορετικές μονάδες εκτροφής, μια από το Ιόνιο και μια από το Αιγαίο, χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα ελέγχου. Τα ψάρια εκτροφής παρουσιάζουν υψηλότερο ποσοστό αναγεννημένων λεπιών σε σχέση με τα άγρια, λόγω των μηχανικών καταπονήσεων που υφίστανται από τους ανθρώπινους χειρισμούς στις μονάδες καλλιέργειας. Ο βαθμός αναγέννησης των λεπιών (SRD) χρησιμοποιήθηκε ως κριτήριο διάκρισης των εν δυνάμει δραπετών από ιχθυοκαλλιέργειες ατόμων, με σκοπό τη διερεύνηση της πραγματικής μορφολογικής και γενετικής ποικιλομορφίας των άγριων πληθυσμών του είδους. Τα άτομα φυσικής προέλευσης διαχωρίστηκαν σε 3 ομάδες με βάση τα επίπεδα του SRD, η αύξηση των οποίων αυξάνει την πιθανότητα παρουσίας δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας: στην ομάδα των άγριων ατόμων με μικρή πιθανότητα παρουσίας δραπετών (L30: ≤30% SRD), στην ομάδα με πιθανότητα παρουσίας δραπετών (M30-60: 31-60% SRD) και στην ομάδα με υψηλή πιθανότητα παρουσίας δραπετών (M60: >60% SRD). Οι διαφορετικοί μορφολογικοί και γενετικοί δείκτες εξετάστηκαν ως προς τη διακύμανση του φυσικού φαινοτύπου από την πιθανή συμβολή των δραπετών ψαριών εντός των γεωγραφικά διακριτών δειγμάτων. Επιπλέον, διερευνήθηκαν οι διαφορές μεταξύ των εκτρεφόμενων (δείγματα ελέγχου) και των ατόμων φυσικής προέλευσης.

Στη μελέτη των ορίων της φαινοτυπικής διακύμανσης, εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας (17, 20 και 23°C) κατά το εμβρυικό και λεκιθοφόρο στάδιο στην πλαστικότητα των ωτολίθων πειραματικών πληθυσμών τσιπούρας, από το τέλος του σταδίου της μεταμόρφωσης (56-

58 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph) έως το στάδιο του ιχθυδίου (93-95 dph). Επιπλέον, ελέγχθηκε η επίδραση του διαφορετικού περιβάλλοντος ανάπτυξης στη μορφολογία των ωτολίθων εκτρεφόμενων πληθυσμών τσιπούρας, από το στάδιο του ιχθυδίου (122 dph) έως το ενήλικο στάδιο (314-393 dph). Για την αξιολόγηση του SRD ως αξιόπιστο δείκτη στη διάκριση δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας, ελέγχθηκε η εξέλιξη των επιπέδων SRD στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς, από το στάδιο της μεταμόρφωσης έως το τέλος της σωματικής τους αύξησης.

Η μελέτη της ποικιλομορφίας του σχήματος των ωτολίθων πραγματοποιήθηκε μέσω της ελλειπτικής Fourier ανάλυσης, ενώ η ανάλυση του σχήματος του σώματος έγινε με τη μέθοδο της γεωμετρικής μορφομετρίας. Για την εξέταση της ασυμμετρίας σε χαρακτήρες μεγέθους και σχήματος των ωτολίθων, χρησιμοποιήθηκε η διακύμανση της διαφοράς των δύο πλευρών του σώματος και η μέση απόλυτη τιμή της διαφοράς των δύο πλευρών. Για τις διαφορές μεγέθους των ωτολίθων, υπολογίστηκαν οι κανονικοποιημένες τιμές του μέγιστου μήκους, μέγιστου πλάτους, της επιφάνειας και της περιμέτρου. Οι διαφορές σχήματος μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών ομάδων εξετάστηκαν μέσω της ανάλυσης διαχωρισμού CAP (Canonical Analysis of Principal Coordinates). Στην εξέταση των διαφορών του σχήματος (ωτολίθων και σώματος) μεταξύ των εκτρεφόμενων (δείγματα ελέγχου) και ατόμων που συλλέχθηκαν στο πεδίο, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κανονικών μεταβλητών (Canonical variate analysis, CVA). Για το σύνολο των υπόλοιπων αναλύσεων, η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων εξετάστηκε μέσω της χρήσης παραμετρικών και μη παραμετρικών tests. Οι διαφορές ως προς τη γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των ομάδων εξετάστηκαν μέσω του δείκτη γενετικής διαφοροποίησης (F_{ST}).

Σύμφωνα με τα κύρια αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, ο έλεγχος της διακύμανσης του σχήματος των ωτολίθων και του σώματος στα άγρια άτομα (L30), αποκάλυψε 3 "φαινοτυπικά" αποθέματα, του Αιγαίου, του Ιονίου και της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου. Εντούτοις, από τον έλεγχο της γενετικής ποικιλομορφίας, για τους συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες, προέκυψε ένα γενετικά ενιαίο απόθεμα στον Ελλαδικό χώρο. Με την αύξηση της πιθανής συμμετοχής δραπετών ψαριών στα άτομα φυσικής προέλευσης (M30-60, M60), η μελέτη της διακύμανσης του σχήματος (σχήμα σώματος και ωτολίθων) δεν έδειξε ξεκάθαρη γεωγραφική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων. Στις γεωγραφικές περιοχές όπου η συμμετοχή ψαριών με υψηλά επίπεδα SRD είναι μεγάλη, τα άτομα με υψηλή πιθανότητα να περιέχουν δραπέτες ιχθυοκαλλιέργειας (M60), εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη ασυμμετρία και μέγεθος ωτολίθων σε σχέση με τα άγρια (L30). Παρόλα αυτά, δεν υπήρξε σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων με διαφορετικά επίπεδα SRD εντός των διαφορετικών γεωγραφικών ομάδων. Τέλος, υπήρξε σημαντική

διαφοροποίηση μεταξύ των εκτρεφόμενων και των ατόμων φυσικής προέλευσης ως προς τα μορφολογικά και τα γενετικά τους χαρακτηριστικά.

Ο έλεγχος των ορίων φαινοτυπικής διακύμανσης στη τσιπούρα, έδειξε ότι το σχήμα και η ασυμμετρία των ωτολίθων από το στάδιο της μεταμόρφωσης έως το ιχθύδιο, άλλαξε σημαντικά ανάλογα με την θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης των ατόμων. Επιπλέον, το σχήμα το μέγεθος και η ασυμμετρία των ωτολίθων διαφοροποιήθηκε σημαντικά ανάλογα με το περιβάλλον ανάπτυξης των ιχθυδίων και των ενήλικων ψαριών. Σύμφωνα με την εξέλιξη του SRD κατά την ανάπτυξη της τσιπούρας στις μονάδες καλλιέργειας, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το SRD αυξάνεται συνεχώς, από το στάδιο έναρξης της δημιουργίας των λεπιών (11,2 ± 5,7% μέσο SRD, 58 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph, 2,0 cm τυπικό μήκος, SL) έως το τέλος της περιόδου σωματικής αύξησης των ατόμων (98,7 ± 3% έως 99,8 ± 0,9% μέσο SRD, 314-393 dph, 21,7-21,9 cm SL). Κατά την περίοδο μετάβασης από το εκκολαπτήριο στα κλουβιά πάχυνσης τα ψάρια παρουσιάζουν ένα μεγάλο εύρος SRD που κυμαίνεται από 40 έως 92% (122 dph, 5,1 cm SL).

Η σημασία των αποτελεσμάτων σχολιάζεται ως προς την ταυτοποίηση των αποθεμάτων τσιπούρας, τη συσχέτιση του SRD με την ηλικία δραπέτευσης των ψαριών, τη διάκριση των εν δυνάμει δραπετών στα φυσικά αποθέματα, τις διαφορές μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων ατόμων και την πλαστικότητα των ωτολίθων κατά την διάρκεια της ανάπτυξης των ψαριών ως απόκριση στους διαφορετικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες. Τα κύρια αποτελέσματα δείχνουν την ύπαρξη τριών "φαινοτυπικών" αποθεμάτων με όμοια γενετικά χαρακτηριστικά. Η μορφολογία των ωτολίθων είναι ένας έντονα πλαστικός χαρακτήρας και αποτελεί αξιόπιστο εργαλείο στη μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος στη φυσιολογία των ψαριών. Τα ψάρια εκτροφής διαφέρουν από τα ψάρια φυσικής προέλευσης τόσο φαινοτυπικά όσο και μορφολογικά. Ο SRD αυξήθηκε συνεχώς με την ηλικία και ήταν ικανός δείκτης στη διάκριση δραπετών ψαριών με βάση τη μορφολογία. Ωστόσο, δεν ανέδειξε διαφορές στη γενετική σύσταση μεταξύ άγριων και πιθανώς διαφυγόντων ατόμων.

ABSTRACT

The identification of fish stock composition is important in fisheries science, as it is an integral part of fisheries management and aims at sustainable production. Many methods have been used in fish stock discrimination, including morphological and genetic indices and life history traits. The aim of the present PhD thesis was the identification of natural stocks of Gilthead sea bream in Greece through the use of morphological and genetic characters, as well as the study of the phenotypic variability limits of otoliths and scales of the species, in response to the fish growing environment. Specifically, a comparative study was performed on the otolith morphology (shape, size and asymmetry), body shape and genetic diversity (microsatellite DNA) of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) of different geographical origins. Samples were collected from the North, West-central (Maliakos) and East-central (Kalymnos) Aegean, from different regions of the Ionian Sea (Central Ionian, Corfu, Patraikos), as well as from the Missolonghi lagoon during 2014-2018. Fish from two different aquaculture farms, one from the Ionian and one from the Aegean Sea, were used (control samples). The rate of regenerated scales is greater in reared compared to wild fish, as the former are succumbed into mechanical stress, which is provoked by aquaculture manipulations. The degree of scale regeneration (SRD) was used to assign wild-caught fish as actually wild or, potentially, aquaculture escapees, in order to estimate the actual morphological and genetic diversity of the species natural populations. The wild-caught specimens were discriminated into three categories based on their SRD levels, the increase of which increases the likelihood of the presence of aquaculture escapees: in the group of wild fish with low probability to include escapees (L30: ≤30% SRD), in the group of fish with probability to include escapees (M30-60: 31-60% SRD) and in the group of fish with high probability to include escapees (M60: >60% SRD). The different morphological and genetic characters were examined in accordance to the natural phenotypic variation in relation to the contribution of possible escapees in each geographically distinct sample. Furthermore, the differences between wild-caught and reared fish were explored.

In the study of the phenotypic variability limits, the effect of temperature (17, 20 or 23°C) during the short embryonic and yolk-sac larval period was tested on the otolith plasticity of Gilthead sea bream experimental populations, during the period between the stage of metamorphosis (56-58 days' post hatching, dph) and the juvenile stage (93-95 dph). Also, the effect of different growth environment was examined, on the otolith morphology of reared sea bream populations, in the period between the juvenile stage (122 dph) and adult stage (314-393 dph). To evaluate the SRD as a reliable index for distinguishing aquaculture escapees, the evolution of SRD

levels in the reared populations was monitored, from the stage of metamorphosis to the end of the rearing process.

An elliptic Fourier analysis and a geometric morphometric technique were used for the study of otolith shape and body shape variation, respectively. For the examination of the asymmetry on otolith shape and size characteristics, the variance of difference between the two sides of the body and the mean absolute difference between the body sides were used. For the otolith size differences, the standardized values of maximum length, maximum weight, surface and perimeter were calculated. The shape differences between the different geographical groups were examined using CAP (Canonical Analysis of Principal Coordinates). A Canonical Variate Analysis (CVA) was performed to check the shape differences (otolith and body shape) between reared (control) and wild-caught fish. In the remainder comparisons, the statistical significance of the differences between groups were tested using parametric and non-parametric tests. The differences in genetic diversity between groups, were examined by the indices of genetic (F_{ST}) differentiation.

The results of the present study, demonstrated three phenotypically sea bream stocks: the Aegean, Ionian and Missolonghi lagoon stocks. However, the examination of genetic diversity showed a genetically uniform stock in the area of Greece. In the categories of wild-caught fish, with increasing possibility to include aquaculture escapees, the examination of shape (otolith and body) variation did not show clear geographical differentiation between groups. In the geographical areas where the presence of fish with high levels of SRD was increased, the fish with high possibility to include escapees (M60) presented significant higher levels of otolith size and asymmetry compare to their wild counterparts (L30). However, within the different geographical regions there was no significant genetic differentiation between individuals with different SRD levels. Wild-caught and reared fish differed significantly in their morphological and genetic characteristics.

The examination of the phenotypic variability limits on Gilthead sea bream showed that the otolith shape and otolith asymmetry from the stage of metamorphosis to juvenile stage, changed significantly depending on the early developmental temperature of the fish. Furthermore, the shape, size and asymmetry of the otoliths differed significantly depending on the growth environment of juvenile and adult fish. The evolution of the SRD levels demonstrated that scales are being lost continuously, from the onset of squamation (11.2 ± 5.7% mean SRD, 58 days' post hatching, dph, 2.0 cm standard length, SL) until the end of the on-growing period (98.7 ± 3% to 99.8 ± 0.9% mean SRD, 314-393 dph, 21.7-21.9 cm SL). At the transition between the hatchery period and the on-growing in sea cages, fish presented a wide distribution of SRD, ranging from 40 to 92% (122 dph, 5.1 cm SL).

The importance of the results was discussed regarding the sea bream stock discrimination, the correlation of SRD with the age of escaping reared fish, the distinction of potential aquaculture escapees from wild fish, as well as the wild and reared differences. Additionally, was discussed the otolith plasticity in response to different environmental factors during fish development. The main results revealed the existence of three "phenotypic" stocks with similar genetic characteristics. Otolith morphology is a highly plastic character and is a reliable tool in the study of the environmental effects on fish physiology. Reared fish differ from wild-caught fish, both phenotypically and morphologically. The SRD increased continuously with fish age and is a useful index of distinguishing escapees based on morphology. However, it was not related to any difference in the genetic composition between wild and possible escapees.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Αλιευτικά αποθέματα

Το "αλιευτικό απόθεμα" ορίζεται ως μια ομάδα ψαριών του ίδιου είδους, με συγκεκριμένη κατανομή στο χώρο και το χρόνο, ικανό πληθυσμιακό μέγεθος αναπαραγωγής και με μερική ή ολική αναπαραγωγική απομόνωση (Begg and Waldman 1999). Τα μέλη του παρουσιάζουν παρόμοια χαρακτηριστικά ιστορίας ζωής, τα οποία ελέγχονται από το κοινό περιβάλλον διαβίωσης (Marr 1957). Σε αυτά τα χαρακτηριστικά περιλαμβάνονται ο ρυθμός αύξησης, ο ρυθμός θνησιμότητας και ο ρυθμός στρατολόγησης (Pawson and Jennings 1996, Begg and Waldman 1999). Το βασικότερο χαρακτηριστικό των αποθεμάτων, που τα διαχωρίζει από τις έννοιες του πληθυσμού και του υποπληθυσμού είναι ότι τα αποθέματα υπόκεινται σε αλιευτική εκμετάλλευση. Για το λόγο αυτό, στην αλιευτική επιστήμη το απόθεμα αρχικά αναφέρθηκε ως μια οποιαδήποτε ομάδα ενός είδους ψαριού, η οποία είναι διαθέσιμη για εκμετάλλευση σε μια συγκεκριμένη περιοχή (Milton and Shaklee 1987). Σύμφωνα με τον Marr (1957), ο όρος του υποπληθυσμού αναφέρεται σε μια γενετικά αυτοτελή μονάδα, με το μικρότερο ικανό μέγεθος αναπαραγωγής. Ένα αλιευτικό απόθεμα μπορεί να αποτελεί είτε έναν πληθυσμό, είτε τμήμα ενός πληθυσμού, είτε να περιλαμβάνει μέλη από διαφορετικούς υποπληθυσμούς. Για το λόγο αυτό η ταξινομική θέση των αποθεμάτων μπορεί να ποικίλει και να παραμένει ασαφής, ενώ στις περισσότερες των περιπτώσεων θεωρείται ως κατώτερη βαθμίδα από αυτή του πληθυσμού (Cushing 1968).

1.2 Σημασία προσδιορισμού των αποθεμάτων

Η ταυτοποίηση των ιχθυοαποθεμάτων είναι μείζονος σημασίας για τη σύγχρονη αλιευτική επιστήμη, καθώς αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της αλιευτικής διαχείρισης και της προστασίας των απειλούμενων ειδών. Ο προσδιορισμός της κατανομής των αποθεμάτων στοχεύει στη διατήρηση της ποικιλομορφίας των πληθυσμών και είναι απαραίτητος για την αναγνώριση και προστασία των περιοχών ωοτοκίας και ανάπτυξης των ιχθυονυμφών (Begg *et al.* 1999a). Δεδομένα κατανομής και αφθονίας των αποθεμάτων συνδράμουν στην ταυτοποίηση των αναπαραγωγικών περιόδων, στην κατανόηση της διασποράς των αναπτυσσόμενων ιχθυονυμφών, καθώς και στον καθορισμό των ευαίσθητων ενδιαιτημάτων του κύκλου ζωής των ψαριών (πεδία αναπαραγωγής, στρατολόγησης και αύξησης) (Pawson and Jennings 1996). Για την αλιευτική επιστήμη, κύριος σκοπός της ταυτοποίησης των ιχθυοαποθεμάτων αποτελεί η επίτευξη της αειφόρου παραγωγής και η εφαρμογή κατάλληλων στρατηγικών για τη διαχείρισή τους (Begg *et al.* 1999b). Παρόλα αυτά, η δυσκολία στην οριοθέτηση της κατανομής των αποθεμάτων δημιουργεί αβεβαιότητα σχετικά με τον προσδιορισμό της δομής και της σύστασής τους (Stephenson 1999). Επομένως, είναι αναγκαία

η εφαρμογή ολιστικών προσεγγίσεων, χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα μεθόδων και τεχνικών αναγνώρισης των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του κάθε ιχθυοαποθέματος (Begg and Waldman 1999).

1.3 Χαρακτηριστικά διαφοροποίησης μεταξύ αποθεμάτων

Πλήθος ερευνών έχει ασχοληθεί με τον προσδιορισμό και τη διάκριση αποθεμάτων ψαριών, οι οποίες περιλαμβάνουν ελέγχους της ποικιλομορφίας γενετικών, φυσιολογικών και μορφολογικών χαρακτήρων των μελών τους, καθώς και τη συσχέτιση αυτών με τις περιβαλλοντικές παραμέτρους και τα ενδογενή χαρακτηριστικά τους (Begg and Waldman 1999). Αυτή η ποικιλομορφία μπορεί να επηρεάσει και να διαφοροποιήσει διαφορετικά χαρακτηριστικά της ιστορίας ζωής των ψαριών, όπως είναι ο ρυθμός αύξησης, ο ρυθμός στρατολόγησης, η γονιμότητα, η ηλικία πρώτης αναπαραγωγής, η γεωγραφική κατανομή, η αφθονία και ο ρυθμός θνησιμότητας (Begg 2005). Η ύπαρξη γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ αποθεμάτων του ίδιου είδους ("γενετικά" αποθέματα) προϋποθέτει χρόνια γεωγραφική και αναπαραγωγική απομόνωση και εντείνεται με τη δράση διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων (Swain *et al.* 2005). Εξελικτικές δυνάμεις, όπως είναι οι μεταλλάξεις, η φυσική επιλογή και η τυχαία γενετική παρέκκλιση, δρουν σε συνάρτηση με το χρόνο καθορίζοντας την ένταση αυτής της διαφοροποίησης. Για το σκοπό αυτό, οι τοπικές υδρολογικές συνθήκες θα πρέπει να είναι τέτοιες ώστε να ελαχιστοποιούν την ανάμιξη των αυγών και των ιχθυονυμφών μεταξύ γειτονικών αποθεμάτων, διατηρώντας τη γενετική απομόνωση (Allendorf and Luikart 2007). Με βάση τα παραπάνω, είναι απαραίτητος ο έλεγχος της σταθερότητας και απομόνωσης των πληθυσμών σε βάθος χρόνου, τόσο μέσω γενετικών μελετών όσο και περιβαλλοντικών δεδομένων (Begg *et al.* 1999a).

Οι διαφορές στις παραμέτρους της ιστορίας ζωής των ψαριών μεταξύ αποθεμάτων του ίδιου είδους δεν οφείλονται κατ’ ανάγκη σε αντίστοιχες διαφορές στο γονότυπο. Συγκεκριμένα, γειτονικά αποθέματα μπορούν να παρουσιάζουν φαινοτυπική ποικιλομορφία εξαιτίας των διαφορετικών περιβαλλοντικών και οικολογικών συνθηκών. Οι φαινοτυπικές αυτές διαφορές δεν υπαγορεύουν αναγκαστικά αντίστοιχες διαφορές στο γονότυπο, ούτε υποδεικνύουν απαραίτητα γενετική και αναπαραγωγική απομόνωση (Begg and Waldman 1999). Εντούτοις, μπορεί να μαρτυρούν τον παρατεταμένο διαχωρισμό μεταξύ αποθεμάτων, τα οποία ζουν ολόκληρο ή το μεγαλύτερο μέρος της ζωής τους σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (Campana *et al.* 1995). Ο όρος "φαινοτυπικά" αποθέματα (Booke 1981) έχει χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει ομάδες ψαριών του ίδιου είδους, οι οποίες χαρακτηρίζονται από φαινοτυπικές διαφορές που μπορεί να προκληθούν εξολοκλήρου από το περιβάλλον (π. χ. Swain *et al.* 2005).

1.4 Φαινοτυπική πλαστικότητα

Οι περιβαλλοντικά επαγόμενες διαφοροποιήσεις μεταξύ των αποθεμάτων μπορεί να προκληθούν ως αποτέλεσμα της φαινοτυπικής πλαστικότητας των ψαριών (Fuiman *et al.* 1998, Begg and Waldman 1999). Η φαινοτυπική πλαστικότητα ορίζεται ως η διαφορική έκφραση του ίδιου γονότυπου σε διαφορετικούς φαινότυπους ως απόκριση στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες διαβίωσης (Roff 1999). Η πλαστικότητα μπορεί να εκφράζεται τόσο σε επίπεδο μορφολογίας, βιοχημικό, αναπτυξιακό και φυσιολογικό καθώς και στα πρότυπα συμπεριφοράς των ψαριών. Σε αναπτυξιακό επίπεδο, η πλαστικότητα μπορεί να τροποποιήσει το οντογενετικό πρότυπο των οργανισμών, προκαλώντας μόνιμες, μη αναστρέψιμες αποκρίσεις στο φαινότυπο (Pigliucci *et al.* 2006). Σύμφωνα με τον Burggren (2020), διαφορετικοί παράγοντες, όπως είναι τα γονίδια, το περιβάλλον, τα επιγενετικά χαρακτηριστικά, καθώς και τυχαίες αλλαγές στο αναπτυξιακό σχέδιο δρουν συνδυαστικά, κατά τη διάρκεια κρίσιμων οντογενετικών περιόδων, προκαλώντας φαινοτυπικές τροποποιήσεις ως αποτέλεσμα της αναπτυξιακής πλαστικότητας. Ιδιαίτερα, τα είδη που στον κύκλο ζωής τους περιέχουν το στάδιο της μεταμόρφωσης (π.χ. ψάρια, αμφίβια), διανύουν μια κρίσιμη οντογενετική περίοδο που συνεπάγεται γρήγορες αλλαγές στα φυσιολογικά χαρακτηριστικά των ατόμων, καθιστώντας τους οργανισμούς ευάλωτους στις περιβαλλοντικές επιδράσεις (Lowe *et al.* 2021).

Κύριοι παράγοντες που συντελούν στη διαφορική απόκριση των φαινοτύπων των ψαριών στα διαφορετικά περιβάλλοντα διαβίωσης είναι η θερμοκρασία, η αλατότητα, η φωτοπερίοδος, το είδος και η διαθεσιμότητα της τροφής, η πληθυσμιακή πυκνότητα και η θήρευση (π.χ. Meyer 1987, Lindsey et al 1988, Gilbert 2001, Loizides *et al.* 2014). Συγκεκριμένα, η επίδραση της θερμοκρασίας, κυρίως κατά τα πρώτα αναπτυξιακά στάδια, αποτελεί βασικό παράγοντα πρόκλησης φαινοτυπικής πλαστικότητας στα ψάρια, με επιπτώσεις σε χαρακτηριστικά, όπως είναι η επιβίωση, η ανάπτυξη, η δομή και η συμπεριφορά (Jonsson and Jonsson 2014, Vagner *et al.* 2019). Πολλές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε διαφορετικά είδη ψαριών σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας σε πλαστικούς χαρακτήρες, όπως ο ρυθμός ανάπτυξης (Koumoundouros *et al.* 2001), το σχήμα του σώματος (π.χ. Georga and Koumoundouros 2010, Loizides *et al.* 2014) και των ωτολίθων (Vignon 2018, Mahe *et al.* 2019a), η αναλογία του φύλου (Koumoundouros *et al.* 2002), η μορφολογία της καρδιάς (Dimitriadi *et al.* 2021), η κολυμβητική ικανότητα (Koumoundouros *et al.* 2009, Dimitriadi *et al.* 2018) καθώς και η δημιουργία μορφο-ανατομικών ανωμαλιών κατά την ανάπτυξη (Georgakopoulou *et al.* 2007, Georgakopoulou *et al.* 2010). Τέλος, η άσκηση διαφορετικής αλιευτικής πίεσης σε αποθέματα γειτονικών περιοχών μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα

σημαντικές επιπτώσεις στην αύξηση, την επιβίωση και την αναπαραγωγική ικανότητα των μελών τους (Pawson and Jennings 1996).

1.5 Εργαλεία διάκρισης αποθεμάτων

1.5.1 Γενετικοί και μοριακοί δείκτες

Η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας των ιχθυοαποθεμάτων στοχεύει στην κατανόηση της δομής και της σύστασής τους καθώς και στον εντοπισμό της γενετικής και αναπαραγωγικής τους απομόνωσης. Στην αλιευτική επιστήμη έχει χρησιμοποιηθεί πλήθος γενετικών και μοριακών δεικτών, κυρίως όσον αφορά είδη με μεγάλη εμπορική αξία (Begg and Waldman 1999). Οι δείκτες αυτοί, είναι θετικά σχετιζόμενοι με το χρόνο γενετικής απόκλισης των αποθεμάτων και η επιλογή για τη χρήση του κάθε δείκτη εξαρτάται από τον ρυθμό της εξελικτικής του διαφοροποίησης. Στους μοριακούς δείκτες περιλαμβάνονται τα αλλοένζυμα, η διαφοροποίηση των οποίων εκφράζει αντίστοιχες διαφορές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία των γονιδίων του DNA. Για τη διάκριση των πρωτεϊνών χρησιμοποιούνται απλές μέθοδοι, όπως η ηλεκτροφόρηση, με τις πρωτεΐνες να διαχωρίζονται βάσει του μεγέθους ή του φορτίου τους αντικατοπτρίζοντας αντίστοιχες διαφορές στο γονότυπο. Στους γενετικούς δείκτες ανήκουν οι έλεγχοι της ποικιλομορφίας των αλληλουχιών του πυρηνικού (nDNA) και του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA). Το μιτοχρονδριακό DNA αποτελεί ένα μικρό, απλοειδές, κυκλικό μόριο μητρικής προέλευσης. Η ύπαρξη διαφορών στο μιτοχονδριακό DNA, συχνά υποδηλώνει μακρά γενετική και εξελικτική απομόνωση μεταξύ των πληθυσμών. Από την άλλη το πυρηνικό DNA περιλαμβάνει μεγάλα γραμμικά μόρια κατανεμημένα σε χρωμοσώματα και είναι διπλοειδές. Σε αυτό ανήκει ένα ευρύ φάσμα δεικτών, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων (βραδύς ρυθμός εξέλιξης) και των μη κωδικών περιοχών (ταχύς ρυθμός εξέλιξης). Ο έλεγχος της διαφοροποίησης του μιτοχονδριακού ή του πυρηνικού DNA περιλαμβάνει πλήθος τεχνικών και μεθόδων, όπως είναι η αλληλούχιση του DNA, η ενίσχυση πολυμορφικών θραυσμάτων μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και η ηλεκτροφόρηση (Beaumont *et al.* 2010).

Στο γονιδίωμα των ευκαρυωτικών και προκαρυωτικών οργανισμών κατανέμονται διάσπαρτα επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες μη κωδικού DNA, ως αποτέλεσμα των γεγονότων ανασυνδυασμού (recombination events) ή ολίσθησης της DNA πολυμεράσης κατά την αντιγραφή του DNA (replication splippage). Το μέγεθος των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών ποικίλει από 2-4 (μικροδορυφορικό DNA) έως 100-5000 (δορυφορικό DNA) ζεύγη βάσεων, ενώ ο αριθμός των επαναλήψεων κυμαίνεται μεταξύ 5-100 (Allendorf and Luikart 2007). Συγκριτικά με το μιτοχονδριακό DNA και τα γονίδια του πυρήνα, ο ρυθμός διαφοροποίησης του μικροδορυφορικού

DNA είναι πολύ μεγαλύτερος, καθιστώντας το ευαίσθητο δείκτη της ομοζυγωτίας (προϊόν συγγενών διασταυρώσεων), και ως εκ τούτου κατάλληλο στη διάκριση ελαφρώς διαφοροποιημένων πληθυσμών (Beaumont *et al.* 2010, Ozturk and Altinok 2017). Για τον λόγο αυτό αρκετοί μικροδορυφορικοί τόποι έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό άγριων και εκτρεφόμενων πληθυσμών ψαριών, συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας (π.χ. Karaiskou *et al.* 2009, Polovina *et al.* 2020).

Τα τελευταία χρόνια, χρησιμοποιείται ευρέως ο έλεγχος διαφοροποιήσεων που αφορούν σημειακές μεταλλάξεις κατά μήκος του DNA των ατόμων, γνωστές ως μονό-νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (SNPs). Συγκεκριμένα, τα SNPs είναι αποτέλεσμα σημειακής μετάλλαξης, αντικατάστασης προσθήκης ή έλλειψης σε μια συγκεκριμένη θέση ενός νουκλεοτιδίου (Beaumont *et al.* 2010). Εμφανίζονται διάσπαρτα στο γονιδίωμα κυρίως σε μη κωδικές περιοχές του DNA και συνήθως αποτελούν ουδέτερες μεταλλάξεις (δεν έχουν θετική ή αρνητική επίδραση στα άτομα που τις φέρουν). Τα SNPs, εξαιτίας του μεγάλου αριθμού τους, εμφανίζουν τεράστια ποικιλομορφία και είναι ικανά στη διάκριση από πληθυσμιακό έως και ατομικό επίπεδο. Ως εκ τούτου, αποτελούν ευαίσθητους γενετικούς δείκτες με αυξανόμενη εφαρμογή στις μελέτες πληθυσμιακής γενετικής καθώς και στην κατασκευή γονιδιακών χαρτών σε είδη με μεγάλη εμπορική αξία (Beaumont *et al.* 2010).

1.5.2 Φαινοτυπικοί χαρακτήρες

Οι φαινοτυπικοί χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται στην ταυτοποίηση των ιχθυοαποθεμάτων μπορεί να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες: σε αυτούς που ελέγχονται καθαρά από το γονότυπο, σε αυτούς που ελέγχονται καθαρά από το περιβάλλον και σε αυτούς που υπόκεινται σε ταυτόχρονο έλεγχο τόσο της γενετικής σύστασης όσο και του περιβάλλοντος, στο οποίο αναπτύσσονται και διαβιούν τα ψάρια (Allendorf and Luikart 2007). Η μελέτη της φαινοτυπικής ποικιλότητας στα ψάρια αφορά στον έλεγχο μορφολογικών και μεριστικών χαρακτήρων καθώς και χαρακτηριστικών της ιστορίας ζωής τους. Οι μεριστικοί χαρακτήρες είναι από τις παλαιότερα μετρήσιμες μορφολογικές παραμέτρους και παρέχουν διακριτά και εύκολα στην ανάλυση δεδομένα. Σε αυτούς περιλαμβάνονται ο αριθμός των ακτίνων των διαφορετικών πτερυγίων, ο αριθμός των βραγχιακών ακανθών και ο αριθμός των λεπιών της πλευρικής γραμμής (Pawson and Jennings 1996). Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά είναι οι κυριότεροι φαινοτυπικοί χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται στον έλεγχο διαφοροποίησης των αποθεμάτων. Σε αυτά περιλαμβάνονται ο έλεγχος της διαφοροποίησης του σχήματος του σώματος των ψαριών (π.χ. Arechavala-Lopez *et al.* 2012b, Geladakis *et al.* 2017), καθώς και εσωτερικών (ωτόλιθοι) και εξωτερικών (λέπια) σωματικών

δομών τους (π.χ. Arechavala-Lopez *et al.* 2012a, Brager and Moritz 2016, Hussy *et al.* 2016). Άλλοι χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της διάκρισης των αποθεμάτων αποτελούν: η μικροχημεία των ωτολίθων (Warner *et al.* 2005, Vrdoljak *et al.* 2020), η ασυμμετρία των ωτολίθων (Vignon and Morat 2010) καθώς και, οι αποστάσεις μεταξύ των *circuli* στα λέπια και των *annuli* στους ωτόλιθους (Campana and Thorrold 2001, Heidarsson *et al.* 2006). Συγκεκριμένα, ο τρόπος εναπόθεσης των δακτυλίων αύξησης τόσο στα λέπια (Heidarsson *et al.* 2006) όσο και στους ωτόλιθους (Campana and Neilson 1985, Campana and Thorrold 2001) είναι ενδεικτικός των περιβαλλοντικών συνθηκών στις οποίες αναπτύσσονται και διαβιούν τα ψάρια και σχετίζεται με τον ρυθμό αύξησης των ατόμων.

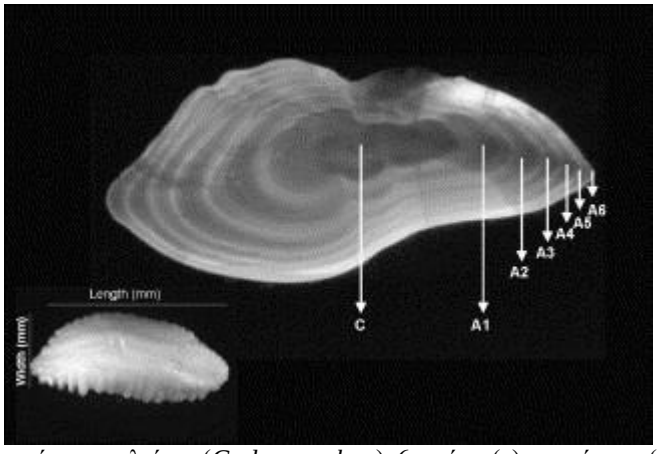
1.5.2.1 Σχήμα σώματος

Ο έλεγχος της ποικιλότητας του σχήματος του σώματος των ψαριών είναι ευρέως διαδεδομένος στην ταυτοποίηση των ιχθυοαποθεμάτων και στη διάκριση των πληθυσμών. Τα πρότυπα οντογένεσης είναι καθοριστικής σημασίας στη διακύμανση του σχήματος των ψαριών αντικατοπτρίζοντας διαφορές κατά την ανάπτυξη. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες επιδρούν σημαντικά στη διαμόρφωση της εξωτερικής μορφολογίας των ιχθύων, κυρίως κατά τα πρώτα οντογενετικά στάδια (Vagner *et al.* 2019). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης, που έχει δειχθεί ότι επηρεάζει τη διαμόρφωση του σχήματος τόσο των ιχθυδίων όσο και των ενήλικων ατόμων (Georga and Koumoundouros 2010, Sfakianakis *et al.* 2011, Loizides *et al.* 2014). Άλλοι παράγοντες που επιδρούν στο σχήμα του σώματος των ψαριών είναι η αλατότητα, η φωτοπερίοδος, το είδος και η διαθεσιμότητα της τροφής καθώς και η εμφάνιση μορφο-ανατομικών ανωμαλιών (π.χ. Lindsey *et al.* 1988, Russo *et al.* 2007, Fragkoulis *et al.* 2019). Διαφορετικοί χαρακτήρες της εξωτερικής μορφολογίας, έχει δειχθεί ότι ελέγχονται από γενετικά χαρακτηριστικά των ψαριών και είναι κληρονομήσιμοι (Loukovitis *et al.* 2013). Πλήθος μελετών έχουν ασχοληθεί με τη διάκριση φυσικών πληθυσμών ιχθύων μέσω της χρήσης του σχήματος του σώματος, ιδιαίτερα όσον αφορά είδη με μεγάλη εμπορική και οικονομική αξία (π.χ. Arechavala-Lopez *et al.* 2012b, Segvic-Bubic *et al.* 2014, Geladakis *et al.* 2017). Διαφορές στο σχήμα του σώματος, έχουν επίσης εντοπιστεί μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων ατόμων, κυρίως ως απόκριση του διαφορετικού περιβάλλοντος διαβίωσης (π.χ. Arechavala-Lopez *et al.* 2012b, Segvic-Bubic *et al.* 2014, Fragkoulis *et al.* 2017). Για τη μελέτη της ποικιλομορφίας του σχήματος του σώματος, συνήθως, χρησιμοποιούνται μέθοδοι κλασικής μορφομετρίας, όπως είναι η αναλογία αποστάσεων, καθώς και μέθοδοι γεωμετρικής μορφομετρίας, όπως η ανάλυση "thin-plate spline" (Cardin 2005).

1.5.2.2 Μορφολογία ωτολίθων (σχήμα και ασυμμετρία)

Οι ωτόλιθοι είναι σκληρές κρυσταλλικές δομές στο έσω αυτί των τελεόστεων ιχθύων και δημιουργούνται από την εναπόθεση ανθρακικού ασβεστίου σε οργανική μήτρα (καλούπι). Είναι σταθερές δομές με σημαντικό ρόλο σε λειτουργίες, όπως η ακοή και η ισορροπία των ψαριών (Campana 1983, Campana and Neilson 1985, Popper and Lu 2000). Η ανάπτυξη των ωτολίθων ακολουθεί ένα σταθερό πρότυπο εναπόθεσης ασβεστίου, με τη δημιουργία εναλλασσόμενων αδιαφανών και ημιδιαφανών δακτυλίων αύξησης (*annuli*) γύρω από έναν αδιαφανή πυρήνα (Williams and Bedford 1974) (Εικόνα 1.1). Η περιοδική δημιουργία των δακτυλίων καθιστά τους ωτόλιθους δομές καταγραφής δεδομένων της ηλικίας, της ανάπτυξης και του περιβάλλοντος όπου έχουν ζήσει τα ψάρια καθ' όλη τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους (Campana and Neilson 1985, Campana and Thorrold 2001). Ο σχηματισμός των ωτολίθων ξεκινά από τα πρώτα στάδια της οντογένεσης και ο ρυθμός αύξησής τους επηρεάζεται από τις αλλαγές στο μεταβολισμό και τις διακυμάνσεις στο ρυθμό αύξησης των ψαριών (Pawson 1990, Campana and Casselman 1993).

Το σχήμα των ωτολίθων είναι το αποτέλεσμα της συνδυαστικής έκφρασης του γενετικού υποβάθρου και των περιβαλλοντικών συνθηκών ανάπτυξης και διαβίωσης του κάθε ψαριού (Cardinale *et al.* 2004, Vignon and Morat 2010). Έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην αλιευτική επιστήμη ως εργαλείο διάκρισης τόσο σε επίπεδο πληθυσμιακό όσο και μεταξύ συγγενικών (ή μη) ειδών ψαριών (π.χ. Campana and Casselman 1993, Bolles and Begg 2000, Cardinale *et al.* 2004, Hussy *et al.* 2016, Souza *et al.* 2020, Tuset *et al.* 2020). Επιπρόσθετα, το σχήμα των ωτολίθων αποτελεί χρήσιμο εργαλείο στη διάκριση μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων πληθυσμών καθώς και στη μελέτη της διακύμανσης του φυσικού φαινοτύπου ως απόρροια της ύπαρξης ψαριών εντός των φυσικών αποθεμάτων, που έχουν απελευθερωθεί ή δραπετεύσει από μονάδες καλλιέργειας (π.χ. Bowen *et al.* 1999, Barnett-Johnson *et al.* 2007, Katayama and Isshiki 2007, Geladakis *et al.* 2021). Στις κυριότερες τεχνικές ανάλυσης του σχήματος των ωτολίθων περιλαμβάνονται μέθοδοι ανάλυσης του περιγράμματος (π.χ. ανάλυση ελλειπτικών Fourier, Wavelet ανάλυση) και η μέθοδος της γεωμετρικής μορφομετρίας (π.χ. Libungan and Palsson 2015, Vignon 2015). Ωστόσο, η ανάλυση ελλειπτικών Fourier (EFA) παραμένει η πιο διαδεδομένη μέθοδος περιγραφής του σχήματος των ωτολίθων για τα περισσότερα είδη ψαριών (Mahe *et al.* 2019b).

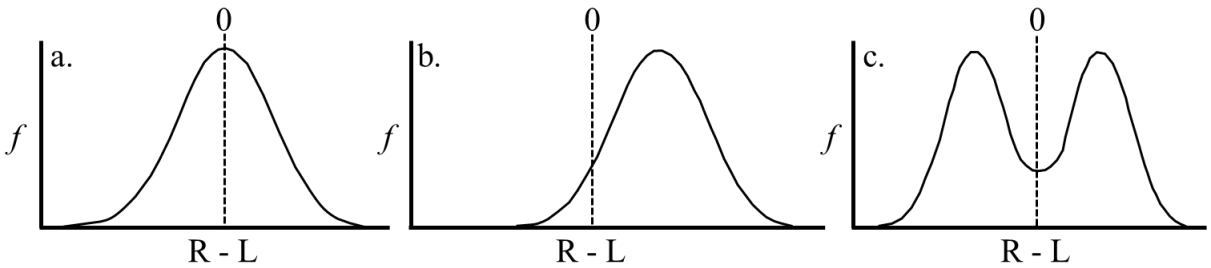


Εικόνα 1.1. Τμήμα ωτολίθου από μπακαλιάρο (*Gadus morhua*) 6 ετών. (c), πυρήνας, (A1-A6), ετήσιοι δακτύλιοι αύξησης (από Petursdottir *et al.* 2006)

Σύμφωνα με τους Palmer και Strobeck (1986) η αμφίπλευρη ασυμμετρία διακρίνεται σε τρεις διαφορετικούς τύπους: την κυμαινόμενη ασυμμετρία, την κατευθυνόμενη ασυμμετρία και την αντισυμμετρία. Σε επίπεδο πληθυσμού, κάθε ένας τύπος αποτελεί διαφορετικό συνδυασμό του μέσου όρου και του είδους της κατανομής της διαφοράς μεταξύ αριστερής και δεξιάς πλευράς αμφίπλευρων δομών. Η κατευθυνόμενη ασυμμετρία (DA) αντικατοπτρίζει την επαναλαμβανόμενη μεγαλύτερη ανάπτυξη της μιας από τις δύο πλευρές (L>R ή L<R) (Εικόνα 1.2b.), ενώ η αντισυμμετρία (Ant) την υπερίσχυση στην ανάπτυξη της κάθε πλευράς σε ίσες αναλογίες εντός του πληθυσμού (bimodal distribution) (L>R = L<R) (Εικόνα 1.2c.). Η εμφάνιση της κατευθυνόμενης ασυμμετρίας ή της αντισυμμετρίας συχνά έχει λειτουργικό ρόλο και καθορίζεται γενετικά (Palmer and Strobeck 1986). Για παράδειγμα, τα ραχιοκοιλιακά πεπλατυσμένα είδη ψαριών (Flatfish), κατά τη διάρκεια του σταδίου της μεταμόρφωσης, υφίστανται μεγάλες ασύμμετρες μορφολογικές μεταβολές στις κρανιακές τους πλευρές, με αποτέλεσμα την πρόκληση προσαρμοστικών αλλαγών στο οπτικό και ακουστικό τους σύστημα. Οι μορφολογικές και λειτουργικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο σωματικών πλευρών, αλλάζουν τον ρυθμό ασβεστοποίησης των ωτολίθων του κάθε ζεύγους, με συνέπεια την εμφάνιση κατευθυνόμενης ασυμμετρίας (Mille *et al.* 2015). Αντίστοιχα, κλασικό παράδειγμα αντισυμμετρίας αποτελεί η μη συμμετρική ανάπτυξη των πρόσθιων άκρων (δαγκάνες) σε είδη όπως ο κάβουρας (Palmer and Strobeck 1986) και ο αστακός (Govind and Pearce 1986).

Η εμφάνιση αμφίπλευρης ασυμμετρίας με τυχαίο τρόπο εντός του πληθυσμού (δηλαδή την υπερίσχυση στην ανάπτυξη είτε της αριστερής είτε της δεξιάς πλευράς με τυχαίο τρόπο εντός του πληθυσμού) ονομάζεται κυμαινόμενη ασυμμετρία (FA) (Εικόνα 1.2a.). Η FA ορίζεται ως οι μη κατευθυνόμενες αποκλίσεις από την τέλεια συμμετρία αμφίπλευρών δομών, αποτελώντας μέτρο της αναπτυξιακής αστάθειας των οργανισμών (Palmer and Strobeck 1986). Συνήθως προκύπτει από την αδυναμία του γονότυπου να διατηρήσει την ομοιόσταση του οργανισμού έναντι των

περιβαλλοντικών διαταραχών κατά την ανάπτυξη και έχει χρησιμοποιηθεί ως δείκτης περιβαλλοντικού στρες. Η ένταση στην εμφάνιση της FA, σε ατομικό και πληθυσμιακό επίπεδο, εξαρτάται από τον περιβαλλοντικό παράγοντα που την προκαλεί καθώς και τον υπό εξέταση μορφολογικό χαρακτήρα (Lens and Dongen 2001). Οι ωτόλιθοι είναι δομές με μεγάλη λειτουργική σημασία που τείνουν να διατηρούν την αμφίπλευρη συμμετρία τους. Ο έλεγχος της επίδρασης διαφορετικών περιβαλλοντικών διαταραχών, έχει δείξει χαμηλά επίπεδα κυμαινόμενης ασυμμετρίας στους ωτόλιθους (Fey and Hare 2008, Palmer *et al.* 2010, Allenbach 2011). Παρόλα αυτά αποτελούν χρήσιμοι δείκτες της αναπτυξιακής αστάθειας των οργανισμών, καθότι η μορφολογία τους είναι ευαίσθητη στις περιβαλλοντικές διακυμάνσεις (Cardinale *et al.* 2004, Gagliano and McCormick 2004, Vignon and Morat 2010).



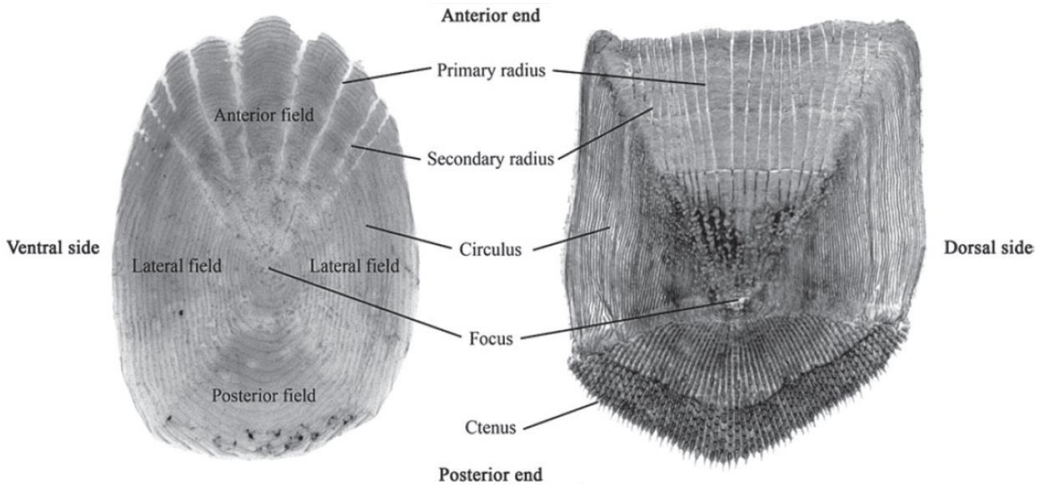
Εικόνα 1.2. Οι τρεις κυριότεροι τύποι κατανομών της διαφοράς R - L σε αμφίπλευρούς οργανισμούς: α) κυμαινόμενη ασυμμετρία (FA), β) κατευθυνόμενη ασυμμετρία (DA), γ) αντισυμμετρία (Ant). R, L: δεξιά και αριστερή πλευρά του σώματος (τροποποίηση από Palmer *et al.* 1994).

1.5.2.3 Μορφολογία λεπιών

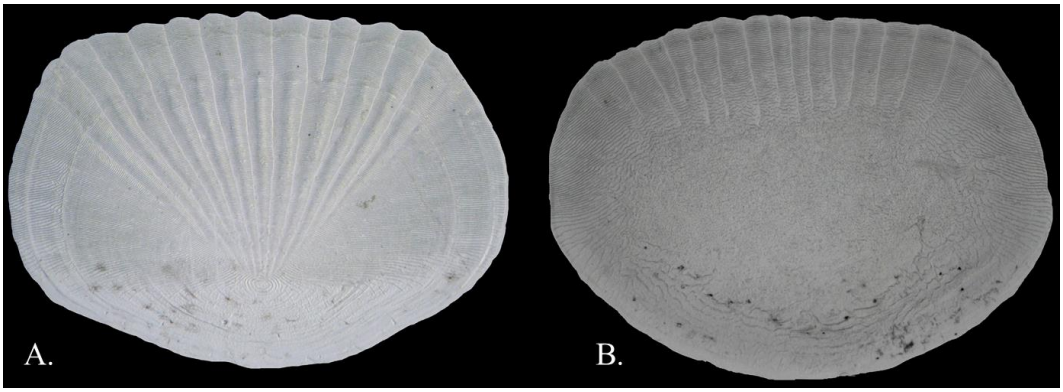
Τα λέπια είναι σκληρές, πλακοειδείς δομές που καλύπτουν το σώμα των ψαριών και παρέχουν μηχανική προστασία έναντι των θηρευτών και των παρασίτων, ελευθερία κινήσεων και αποτελεσματικότητα στη κολύμβηση. Επίσης, συμβάλουν στη διατήρηση της εσωτερικής ομοιόστασης των ψαριών και εξυπηρετούν στο καμουφλάζ (π.χ. Denton, 1970, Berntssen *et al.* 2003, Esteban 2012, Browning *et al.* 2013, Yang *et al.* 2013, Zhu *et al.*, 2013, Vernerey and Barthelat 2014). Τα λέπια αναπτύσσονται στα τελευταία στάδια της μεταμόρφωσης, μέσα σε θήκες που βρίσκονται στη δερμίδα των ψαριών. Αυξάνονται συνεχώς προς τα έξω, με την απόθεση νέου υλικού γύρω από ένα αρχικά διαμορφωμένο πυρήνα (focus) (Bereiterhahn and Zylberberg 1993). Ο πυρήνας των λεπιών περιβάλλεται από συνεχείς ομόκεντρες γραμμές (*circuli*) (Εικόνα 1.3). Πρόκειται για περιοδικές αποθέσεις που σχηματίζονται καθώς το λέπι μεγαλώνει, ακολουθώντας λίγο πολύ το εσωτερικό περίγραμμα της δομής. Οι ακτίνες (*radii*) είναι κάθετες αυλακώσεις μειωμένης οστεοποίησης, που εξαπλώνονται από τον πυρήνα προς την εσωτερική περιφέρεια (Bereiterhahn and Zylberberg 1993, Brager and Moritz 2016). Τα ελασμοειδή λέπια είναι ο πιο κοινός τύπος λεπιών στους τελεόστεους ιχθύες και έχουν δύο κατηγορίες, τα κυκλοειδή και τα

κτενοειδή λέπια. Η διάκριση μεταξύ αυτών των δύο τύπων βασίζεται στην παρουσία πρόσθετων χωριστών οστεοποιήσεων, που ονομάζονται κτένια (*ctenii*), στην εξωτερική περιφέρεια των κτενοειδών λεπιών (Brager and Moritz 2016).

Η δομή των λεπιών αντικατοπτρίζει το ιστορικό ανάπτυξης των ψαριών και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στον προσδιορισμό της ηλικίας τους καθώς και στον ανάδρομο υπολογισμό του μεγέθους του σώματος σε νεότερα στάδια (π.χ. Pierce *et al.* 1996, Heidarsson *et al.* 2006, Pollock 2015). Επιπλέον, η μορφολογία των λεπιών έχει χρησιμοποιηθεί στην εκτίμηση των διαφορετικών προτύπων ανάπτυξης μεταξύ άγριων ή μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων πληθυσμών ψαριών (π.χ. Lund and Hansel 1991, Poulet *et al.* 2005, Arechavala-Lopez *et al.* 2012, Ibanez *et al.* 2017, Segvic-Bubic *et al.* 2020). Σε συνθήκες καλλιέργειας, είτε εξαιτίας των ανθρώπινων χειρισμών (π.χ. καταμέτρηση, ταξινόμηση μεγέθους, εμβολιασμός), είτε λόγω της υψηλής πληθυσμιακής πυκνότητας στις εγκαταστάσεις παραγωγής, αυξάνεται η τριβή και οι φυσικές συγκρούσεις μεταξύ των ψαριών, οδηγώντας σε σημαντικά υψηλά ποσοστά απώλειας λεπιών (Fiske *et al.* 2005, Izquierdo-Gomez *et al.* 2017). Τα χαμένα λέπια αντικαθίστανται γρήγορα από νέα, αναγεννημένα λέπια (Vieira *et al.* 2011, Costa and Power 2018), τα οποία χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός μεγάλου πυρήνα (πυρήνας αναγέννησης) που στερείται δακτυλίων αύξησης (Blair 1942, Bereiterhahn and Zylberberg 1993) (Εικόνα 1.4). Κατά συνέπεια, το ποσοστό των αναγεννημένων λεπιών έχει προταθεί ως χρήσιμος μορφολογικός χαρακτήρας, για τον εντοπισμό διαφυγόντων ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας, στο φυσικό περιβάλλον (Lund and Halsen 1991).



Εικόνα 1.3. Χαρακτηριστικά της μορφολογίας ενός κυκλοειδούς λεπιού μαγιάτικου (*Seriola dumerili*) (αριστερά) και ενός κτενοειδούς λεπιού λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) (δεξιά) (από Brager and Moritz 2016).



Εικόνα 1.4. Α, φυσιολογικό και Β, αναγεννημένο λέπι τσιπούρας.

1.5.3 Δεδομένα κατανομής, σύνθεσης και ιστορίας ζωής των αποθεμάτων

Δεδομένα, όπως είναι η κατά μέγεθος σύνθεση των δειγμάτων από γεωγραφικά διαχωρισμένες ομάδες ή χαρακτηριστικά, όπως ο ρυθμός αύξησης, η γονιμότητα, η εποχή και η διάρκεια της περιόδου αναπαραγωγής, μπορούν να προσφέρουν σπουδαίες πληροφορίες σχετικά με την κατανομή και τη δομή των αποθεμάτων (Begg and Waldman 1999). Επιπρόσθετα, η αναγνώριση και η μελέτη των περιοχών ωοτοκίας καθώς και ο έλεγχος της ικανότητας διασποράς των ιχθυονυμφών σε συνδυασμό με τα υδρολογικά δεδομένα της κάθε περιοχής, συμβάλουν στην κατανόηση του ρυθμού στρατολόγησης των ιχθυδίων στις αναπαραγωγικά ώριμες μονάδες των αποθεμάτων. Παρόμοια δεδομένα περιγράφουν την κατανομή και την αφθονία των ψαριών σε διάφορα στάδια της ιστορίας ζωής τους και συλλέγονται τακτικά για την αξιολόγησή της κατάστασης των αποθεμάτων καθώς και για την αναγνώριση και οριοθέτηση της κατανομής τους. Ο συνδυασμός τέτοιων δεδομένων με τους διαφορετικούς γενετικούς και μορφολογικούς χαρακτήρες που χρησιμοποιούνται στη διάκριση των αποθεμάτων, είναι ζωτικής σημασίας για τη διαχείριση ειδών με μεγάλη εμπορική και οικονομική αξία, αποτελώντας αναπόσπαστο κομμάτι της αλιευτικής επιστήμης (Pawson and Jennings 1996).

1.6 Βιολογικά χαρακτηριστικά της τσιπούρας

Η κοινή τσιπούρα (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) ανήκει στο γένος *Sparus* της οικογένειας Sparidae. Η κατανομή της εκτείνεται κατά μήκος των Ανατολικών ακτών του Ατλαντικού, από τις Βρετανικές νήσους (Βόρεια) έως το Πράσινο Ακρωτήρι και τα Κανάρια νησιά (Νότια), καθώς και σε ολόκληρη τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα (Εικόνα 1.5). Είναι ευρύαλο και ευρύθερμο είδος που συναντάται τόσο σε θαλάσσια όσο και σε υφάλμυρα νερά, όπως είναι οι παράκτιες λιμνοθάλασσες και οι εκβολές ποταμών. Κατοικεί σε θαλάσσια λιβάδια ποσειδωνίας, βραχώδεις και αμμώδεις πυθμένες, συνήθως γύρω στα 30 m βάθος, ενώ ενήλικα έχουν εντοπιστεί και στα 150 m βάθος. Γεννιέται στη θάλασσα κατά τη διάρκεια του χειμώνα ενώ στις αρχές της άνοιξης

μεταναστεύει σε προστατευμένες παράκτιες περιοχές για αναζήτηση τροφής και ηπιότερων θερμοκρασιών. Στα τέλη του φθινοπώρου επιστρέφει στην ανοιχτή θάλασσα για λόγους αναπαραγωγής. Είναι κυρίως σαρκοφάγο (οστρακοειδή, καρκινοειδή, γαστερόποδα) και δευτερευόντως φυτοφάγο. Αναπαραγωγικά είναι ερμαφρόδιτο είδος, λειτουργώντας ως αρσενικό (πρώτανδρο) στα δύο πρώτα χρόνια της ζωής του. Κατά την αναπαραγωγική περίοδο (Οκτώβριο έως Δεκέμβριο στη Μεσόγειο), τα θηλυκά άτομα μπορούν να εναποθέσουν από 20,000 μέχρι 80,000 αυγά ημερησίως. Τα αυγά είναι τελολεκιθικά, σφαιρικά και πελαγικά, με διάμετρο ελαφρώς μικρότερη από 1 mm. Το νυμφικό στάδιο διαρκεί έως 50 περίπου μέρες σε θερμοκρασία 17-18°C (FAO 1999, Sola *et al.* 2006).

Εικόνα 1.5. Περιοχή εξάπλωσης της τσιπούρας (*Sparus aurata*) (από Sola *et al.* 2006).

1.7 Στοιχεία καλλιέργειας της τσιπούρας

Η τσιπούρα είναι ένα από τα πιο σημαντικά εμπορικά θαλάσσια είδη στη Μεσόγειο, τόσο για την υδατοκαλλιέργεια όσο και για τον κλάδο της Αλιείας. Μαζί με το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus 1758) αποτελούν τα κύρια εκτρεφόμενα είδη ψαριών στην ελληνική ιχθυοκαλλιέργεια. Το 2016, η παγκόσμια παραγωγή τσιπούρας άγγιξε τους $189 \cdot 10^3$ t από συνολικό αριθμό ιχθυδίων τα $539 \cdot 10^6$ άτομα (γόνος). Αντίστοιχα για τον κλάδο της αλιείας, οι παγκόσμιες εκφορτώσεις τσιπούρας στο ίδιο έτος άγγιξαν τους $9 \cdot 10^3$ t. Η Ελλάδα είναι η δεύτερη μεγαλύτερη χώρα σε παραγωγή εκτρεφόμενης τσιπούρας στη Μεσόγειο (49,265 τόνους το 2016) (FAO 2016, FEAP 2017). Οι όλο και αυξανόμενες απαιτήσεις για παραγωγή ειδών με μεγάλη εμπορική αξία (όπως η τσιπούρα και το λαβράκι), οδήγησαν στη μετάβαση από την παραδοσιακή εκτατική εκτροφή (εκμετάλλευση λιμνοθαλασσών) στην εντατική εκτροφή και στη διαρκή βελτίωση των τεχνικών παραγωγής (Sola *et al.* 2006). Η εκτρεφόμενη τσιπούρα μέχρι το στάδιο του γόνου (1-

10g) αναπτύσσεται σε κλειστά χερσαία συστήματα παραγωγής ελεγχόμενων συνθηκών (ιχθυογεννητικοί σταθμοί) και στη συνέχεια μεταφέρεται σε κλωβούς ανοιχτής θαλάσσης για τη φάση της πάχυνσης (Κουμουνδούρος, προσωπική επικοινωνία).

1.8 Γενετική και φαινοτυπική ποικιλομορφία της τσιπούρας στις διαφορετικές περιοχές κατανομής της

Πολλές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την ταυτοποίηση της γενετικής δομής των φυσικών πληθυσμών τσιπούρας κατά μήκος των διαφορετικών περιοχών κατανομής της. Τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών διαφοροποιήθηκαν ανάλογα με το είδος του γενετικού δείκτη που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά. Οι πρώτες εργασίες αφορούσαν τη χρήση αλλοενζύμων και μιτοχονδριακού DNA παρουσιάζοντας αντικρουόμενα αποτελέσματα ως προς την ύπαρξη ενός ενιαίου ή περισσότερων απομονωμένων πληθυσμών (Cervelli *et al.* 1985, Funkenstein *et al.* 1990). Με την αύξηση της χρήσης διαφορετικών γενετικών δεικτών (αλλοένζυμα, μιτοχονδριακό και μικροδορυφορικό DNA), οι επακόλουθες μελέτες ανίχνευσαν κυρίως ασθενείς διαφοροποιήσεις. Συγκεκριμένα, διαφορετικές έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σε μικρή γεωγραφική κλίμακα όπως σε περιοχές της Ισπανίας, της Τυνησίας, της Αδριατικής και γύρω από την Ιταλική Χερσόνησο, ανίχνευσαν από ανύπαρκτες έως μέτριες διαφοροποιήσεις μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών ομάδων τσιπούρας (Ben Slimen *et al.* 2004, Rossi *et al.* 2006, Segvic-Bubic *et al.* 2011, Loukovitis *et al.* 2011a, Garcia-Celdran *et al.* 2016, Zuzul *et al.* 2019). Στις περισσότερες των περιπτώσεων, παρά τη στατιστική σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ ορισμένων γεωγραφικών ομάδων, η τιμή του δείκτη γενετικής διαφοροποίησης (F_{ST}) ήταν μικρότερη του 0,05 (λιγότερο από το 5% της συνολικής διακύμανσης στις αλληλικές συχνότητες παρουσιάζεται μεταξύ των γεωγραφικών ομάδων), υποδεικνύοντας είτε αμελητέες είτε μικρές γενετικές διαφοροποιήσεις (Balloux and Lugon-Moulin 2002).

Γενετικές μελέτες που αφορούσαν στη δομή των πληθυσμών της τσιπούρας σε μεγάλη γεωγραφική κλίμακα, ελέγχοντας δείγματα που προέρχονταν από απομακρυσμένες μεταξύ τους περιοχές, έδειξαν ασθενείς διαφοροποιήσεις, οι οποίες όμως δεν ήταν συνυφασμένες με τη γεωγραφική απόσταση ή/και τους γνωστούς ωκεανογραφικούς παράγοντες. Παρόλα αυτά, πολλές διαφοροποιήσεις ήταν σημαντικές, δείχνοντας μια συγκεχυμένη γενετική δομή μεταξύ πληθυσμών του Ατλαντικού, της Δυτικής και της Ανατολικής Μεσογείου (Palma *et al.* 2001, Alarcon *et al.* 2004, De Innocentiis *et al.* 2004). Οι Gkagkavouzis *et al.* (2019) ελέγχοντας διαφορετικούς τόπους μικροδορυφορικού DNA σε δείγματα τσιπούρας από διαφορετικές περιοχές της Ελληνικής επικράτειας, ανίχνευσαν ασθενείς διαφοροποιήσεις (F_{ST}: 0,0007-0,0056) μεταξύ γεωγραφικών ομάδων του Αιγαίου και του Ιονίου πελάγους, οι οποίες όμως δεν ήταν ανάλογες με τις μεταξύ τους γεωγραφικές αποστάσεις. Πρόσφατες εργασίες, χρησιμοποιώντας δείκτες μικροδορυφορικού DNA και πολυμορφισμούς σημειακών μεταλλάξεων του DNA (SNiPs), εντόπισαν διαφοροποιήσεις σε

πληθυσμούς μεταξύ Δυτικής και Ανατολικής Μεσογείου (Polovina *et al.* 2020, Maroso *et al.* 2021). Συγκεκριμένα οι Maroso *et al.* (2021), παίρνοντας δείγματα που κάλυπταν το μεγαλύτερο εύρος κατανομής της άγριας τσιπούρας εντόπισαν ασθενείς γενετικές διαφορές (μέσο $F_{ST=}$ 0,0031), κατηγοριοποιώντας τους διαφορετικούς πληθυσμούς σε τρεις κύριες γεωγραφικές ομάδες, του Ατλαντικού, της Δυτικής και της Ανατολικής Μεσογείου.

Ισχυρές γενετικές διαφοροποιήσεις έχουν εντοπιστεί μεταξύ εκτρεφόμενων και λιγότερο ισχυρές μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων πληθυσμών τσιπούρας. Στο σύνολο των μελετών, οι διαφοροποιήσεις αυτές ήταν ανάλογες της γεωγραφικής κατανομής των δειγμάτων και αφορούσαν τη σύγκριση μεταξύ εκτρεφόμενων ή/και άγριων-εκτρεφόμενων πληθυσμών του Ελλαδικού χώρου (Karaiskou *et al.* 2009, Loukovitis *et al.* 2011a, Polovina *et al.* 2020), της Αδριατικής (Segvic-Bubic *et al.* 2011, Segvic-Bubic *et al.* 2014, Zuzul *et al.* 2019) και των Ισπανικών υδάτων (Alarcon *et al.* 2004, Castro *et al.* 2007). Επιπλέον, σημαντικές διαφορές έχουν εντοπιστεί μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων πληθυσμών προερχόμενων από απομακρυσμένες, μεταξύ τους, περιοχές της Μεσογείου (Alarcon *et al.* 2004, Polovina *et al.* 2020) ή της Μεσογείου και του Ατλαντικού (Miggiano *et al.* 2005).

Ο εντοπισμός διαφοροποιήσεων με βάση φαινοτυπικά χαρακτηριστικά έχει εντοπιστεί μεταξύ άγριων πληθυσμών τσιπούρας με διαφορετική γεωγραφική προέλευση καθώς και μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων ατόμων. Οι Arechavala-Lopez *et al.* (2012a, 2012b) συγκρίναν ως προς τα μορφομετρικά χαρακτηριστικά του σχήματος του σώματος, των ωτολίθων και των λεπιών, άγρια και εκτρεφόμενα άτομα τσιπούρας από τα Ισπανικά και τα Ελληνικά ύδατα, βρίσκοντας σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Σημαντικές διαφορές ως προς το σχήμα του σώματος έχουν επίσης εντοπιστεί μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων πληθυσμών στην Αδριατική θάλασσα και τα Ελληνικά ύδατα (Segvic-Bubic *et al.* 2014, Fragkoulis *et al.* 2017). Τέλος, σημαντικές διαφοροποιήσεις εντοπίστηκαν μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων ατόμων τσιπούρας του Ιονίου Πελάγους με βάση το σχήμα, το μέγεθος και την κυμαινόμενη ασυμμετρία των ωτολίθων τους (Geladakis *et al.* 2021).

1.9 Επιπτώσεις της καλλιέργειας της τσιπούρας στους φυσικούς πληθυσμούς

Τα τελευταία χρόνια, η όλο και αυξανόμενη καλλιέργεια τσιπούρας στη Μεσόγειο Θάλασσα, έχει αποτελέσει αντικείμενο ερευνάς όσον αφορά τις επιπτώσεις των δραπετεύσεων ψαριών από μονάδες παραγωγής και την εισχώρηση τους στους φυσικούς πληθυσμούς. Οι δραπετεύσεις αυτές μπορούν να συμβούν είτε ως αυγά μετά από αυθόρμητη ωοτοκία στους κλωβούς (Somarakis *et al.* 2013), είτε ως ιχθύδια και ενήλικα άτομα καθ’ όλη τη διάρκεια παραμονής τους στους κλωβούς

(Dempster *et al.* 2007). Στη δεύτερη περίπτωση, οι δραπετεύσεις μπορεί να οφείλονται σε λανθασμένους χειρισμούς του ανθρώπου, σε φυσικές καταστροφές (π.χ. λόγω ακραίων καιρικών φαινομένων), να οφείλονται στην ίδια τη συμπεριφορά των εκτρεφόμενων ατόμων τσιπούρας, τα οποία μπορούν να δαγκώσουν και να τρυπήσουν το δίχτυ των κλωβών ή να προκαλούνται από την δράση φυσικών θηρευτών, οι οποίοι προσπαθούν να εισέλθουν στους κλωβούς για να τραφούν (Dempster *et al.* 2007, Glaropoulos *et al.* 2012). Τα γεγονότα των δραπετεύσεων έχουν δυνητικά αρνητικές επιπτώσεις τόσο για την ίδια την ιχθυοκαλλιέργεια (Jackson *et al.* 2015), όσο και για τη δομή και σύσταση των φυσικών πληθυσμών (Arechavala-Lopez *et al.* 2018). Η εισροή των εκτρεφόμενων ατόμων στα φυσικά αποθέματα μπορεί να αυξάνει τον κίνδυνο μετάδοσης ασθενειών καθώς και τον ανταγωνισμό για τους φυσικούς πόρους, την εύρεση τροφής και την αναπαραγωγική επιτυχία (Thorstad *et al.* 2008, Arechavala-Lopez *et al.* 2012c, Arechavala-Lopez *et al.* 2018). Η γενετική ανάμιξη μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων ψαριών ενδέχεται να οδηγεί σε διαταραχή ή/και μείωση της γενετικής ποικιλότητας των φυσικών πληθυσμών. Έρευνες στη τσιπούρα, έχουν δείξει μειωμένη γενετική ποικιλομορφία σε εκτρεφόμενους σε σχέση με άγριους παρακείμενους πληθυσμούς (π.χ. Alarcon *et al.* 2004, Karaiskou *et al.* 2009, Segvic-Bubic *et al.* 2014, Zuzul *et al.* 2019).

Η γενετική ποικιλότητα των εκτρεφόμενων πληθυσμών μπορεί να διαφέρει από αυτή των γειτονικών φυσικών πληθυσμών για διαφορετικούς λόγους. Αρχικά, τα εκτρεφόμενα άτομα διαθέτουν ένα μικρό μόνο ποσοστό της γενετικής ποικιλομορφίας του αρχικού τους φυσικού πληθυσμού (Polovina *et al.* 2020). Η απελευθέρωση τους στο φυσικό περιβάλλον και η μετέπειτα διασταύρωση τους με τα άγρια άτομα, μπορεί να προκαλέσει μείωση της γενετικής ποικιλότητας των φυσικών αποθεμάτων και εξάλειψη σπάνιων αλληλομόρφων (Arechavala-Lopez *et al.* 2013). Στην περίπτωση που τα εκτρεφόμενα άτομα προέρχονται από γόνο, ο οποίος έχει παρθεί από γεωγραφικά μακρινές περιοχές, έχοντας διαφορετική γενετική σύσταση, η ανάμειξη τους με τα άγρια άτομα μπορεί να προκαλέσει μεγαλύτερη αλλοίωση της φυσικής γενετικής ποικιλομορφίας (Polovina *et al.* 2020). Τέλος, η εφαρμογή προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης των εκτρεφόμενων ψαριών στις μονάδες καλλιέργειας, έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία στελεχών με μεγάλους ρυθμούς αύξησης, μειωμένα ποσοστά σκελετικών δυσπλασιών, προσαρμογή σε αυξημένες πληθυσμιακές πυκνότητες και ανθεκτικότητα στην προσβολή ασθενειών. Τα άτομα αυτά, με την απελευθέρωση τους στο φυσικό περιβάλλον, ανταγωνίζονται και εκτοπίζουν τα άγρια, αλλάζοντας τη γενετική σύσταση των άγριων πληθυσμών (Arechavala-Lopez *et al.* 2013, 2018).

1.10 Μέθοδοι διάκρισης εκτρεφόμενης και άγριας τσιπούρας

Αρκετές μελέτες έχουν ασχοληθεί με την επίδραση των ιχθυοκαλλιεργειών στους φυσικούς πληθυσμούς τσιπούρας και τη διάκριση δραπετών ψαριών βάσει των γενετικών και φαινοτυπικών τους χαρακτηριστικών. Η χρόνια γενετική απομόνωση, το διαφορετικό περιβάλλον ανάπτυξης και διαβίωσης (βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες), καθώς και ο ποιοτικός έλεγχος διαφορετικών φυσιολογικών χαρακτηριστικών (ρυθμός αύξησης, φαινότυπος) των εκτρεφόμενων πληθυσμών, έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφορετικών μεθόδων ταυτοποίησης των διαφορών μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων ατόμων (Arechavala-Lopez *et al.* 2013). Στις μεθόδους αυτές εντάσσονται γενετικοί και μοριακοί δείκτες, χημικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά (ισότοπα, σύνθεση πρωτεϊνών, λιπιδίων, λιπαρών οξέων και ιχνοστοιχείων), ποιοτικά στοιχεία (χρώμα, γεύση, οσμή), μορφολογικοί χαρακτήρες (σχήμα του σώματος, μορφολογία λεπιών και ωτολίθων), μεριστικοί χαρακτήρες (όπως ο αριθμός ακτίνων των πτερυγίων) καθώς και έλεγχοι της ανάπτυξης μορφο-ανατομικών δυσπλασιών (εντονότερη εμφάνιση στους εκτρεφόμενους πληθυσμούς) (π.χ. Grigorakis *et al.* 2002, Karaiskou *et al.* 2009, Arechavala-Lopez *et al.* 2013, Arechavala-Lopez *et al.* 2016, Fragkoulis *et al.* 2017, Fragkoulis *et al.* 2019, Geladakis *et al.* 2021).

Η επιλογή της μεθόδου διάκρισης των δραπετών εντός των φυσικών πληθυσμών εξαρτάται από τον χρόνο διαφυγής των ατόμων από τις μονάδες και την εγκατάσταση τους στο φυσικό περιβάλλον (Arechavala-Lopez *et al.* 2013). Ψάρια που έχουν διαφύγει εντός σχετικά μικρού χρονικού διαστήματος μπορούν να ταυτοποιηθούν με απλές μορφολογικές μεθόδους, καθώς ο φαινότυπος τους δεν έχει προλάβει να αποκτήσει χαρακτηριστικά όμοια με εκείνα των άγριων ατόμων (Rogdakis *et al.* 2011). Αντιθέτως, ψάρια που έχουν διαφύγει είτε ως αυγά είτε ως νεαρά άτομα, έχοντας περάσει μεγάλο μέρος της ζωής τους στο φυσικό περιβάλλον, μπορούν να ταυτοποιηθούν μόνο με χημικές, γενετικές και μοριακές μεθόδους (Arechavala-Lopez *et al.* 2018).

Η μορφολογία των λεπιών έχει προταθεί και χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν ως μια φτηνή και απλή μέθοδος ταυτοποίησης δραπετών ψαριών στα φυσικά αποθέματα (Lund and Hansel 1991, Fiske, Lund *et al.* 2005). Η ήδη υπάρχουσα βιβλιογραφία στην τσιπούρα, υποστηρίζει ότι τα εκτρεφόμενα άτομα παρουσιάζουν υψηλά επίπεδα αναγεννημένων λεπιών εξαιτίας της διαβίωσης τους στις μονάδες παραγωγής (Arechavala-Lopez *et al.* 2012a, Izquierdo-Gomez *et al.* 2017). Παρόλα αυτά, δεν υπάρχει εργασία που να μελετά την εξέλιξη του ποσοστού των αναγεννημένων λεπιών στη τσιπούρα, κατά τα διαφορετικά στάδια ανάπτυξης της εντός των μονάδων παραγωγής.

1.11 Στόχοι της παρούσας διατριβής

Οι Geladakis *et al.* (2021), ελέγχοντας άτομα τσιπούρας από την ίδια γεωγραφική περιοχή (Ιόνιο πέλαγος), αποκάλυψαν ισχυρή διαφοροποίηση μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων ατόμων τσιπούρας ως προς το σχήμα, το μέγεθος και την ασυμμετρία των ωτολίθων τους. Χρησιμοποιώντας το κατώφλι του 30% βαθμό αναγέννησης λεπιών (32,5% μέσο SRD) ως κριτήριο διάκρισης των πιθανών δραπετών ψαριών από μονάδες καλλιέργειας, αποκάλυψαν ότι τα άγρια άτομα με ποσοστό υψηλότερο από αυτό το κατώφλι, παρουσίασαν ενδιάμεσους φαινότυπους μεταξύ των άγριων ατόμων με χαμηλό βαθμό αναγέννησης (≤30% SRD) και των εκτρεφόμενων ψαριών (≥95% SRD). Με βάση τα αποτελέσματα τους, υπέθεσαν την ύπαρξη μιας ενδιάμεσης ζώνης, όπου τα ψάρια άγριας προέλευσης με ποσοστά αναγέννησης από 31% έως 90% έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να περιέχουν δραπέτες καλλιέργειας, που πιθανώς να δραπέτευσαν σε μικρότερη ηλικία κατά την ανάπτυξη τους στα κλουβιά.

Στην παρούσα Διδακτορική Διατριβή έγινε μια προσπάθεια προσδιορισμού της μορφολογικής και γενετικής ποικιλομορφίας της τσιπούρας στον Ελλαδικό χώρο. Σκοπός ήταν η ταυτοποίηση αποθεμάτων τσιπούρας στον Ελλαδικό χώρο εφαρμόζοντας μια ολιστική προσέγγιση, καθώς και η διερεύνηση της φαινοτυπικής διακύμανσης του είδους, ως απόκριση στο περιβάλλον ανάπτυξης.

Με βάση την υπόθεση των Geladakis *et al.* (2021), όπου τα ψάρια με υψηλότερα επίπεδα SRD έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να περιέχουν δραπέτες καλλιέργειας, χρησιμοποιήθηκε ο βαθμός αναγέννησης των λεπιών ως χαρακτήρας διάκρισης των πιθανών δραπετών με σκοπό: α) τον προσδιορισμό της πραγματικής φαινοτυπικής και γενετικής ποικιλομορφίας των άγριων αποθεμάτων τσιπούρας και β) τη διερεύνηση της φαινοτυπικής και γενετικής διακύμανσης με την πιθανή αύξηση στη συμμετοχή δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας στα άγρια αποθέματα. Για τον λόγο αυτό τα άτομα φυσικής προέλευσης διαχωρίστηκαν σε τρεις ομάδες: στην ομάδα των άγριων ατόμων (άτομα τα οποία έχουν ζήσει από την αρχή της ζωής τους στο φυσικό περιβάλλον) με μικρή πιθανότητα να περιέχει δραπέτες καλλιέργειας και επίπεδα αναγέννησης έως και 30% (L30), στην ομάδα με πιθανότητα να περιέχει δραπέτες καλλιέργειας και επίπεδα αναγέννησης από 31% έως 60% (M30-60), και στην ομάδα με υψηλή πιθανότητα να περιέχει δραπέτες καλλιέργειας και επίπεδα αναγέννησης μεγαλύτερα από 60% (M60).

Η φαινοτυπική ποικιλομορφία εξετάστηκε μεταξύ δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές του Αιγαίου και του Ιονίου Πελάγους, ελέγχοντας μορφολογικούς χαρακτήρες του σχήματος του σώματος και των ωτολίθων, καθώς και του μεγέθους και της ασυμμετρίας των ωτολίθων. Η γενετική ποικιλομορφία εξετάστηκε πραγματοποιώντας ανάλυση μικροδορυφορικού DNA, με

σκοπό τον έλεγχο της ύπαρξης γενετικής διαφοροποίησης, λαμβάνοντας υπόψιν τα αποτελέσματα περί διάκρισης των άγριων ατόμων σε μορφολογικό επίπεδο και τη συσχέτιση τους με βάση τη γεωγραφική κατανομή. Διερευνώντας τη γενετική σύσταση και έχοντας διαθέσιμα τα φαινοτυπικά εργαλεία διάκρισης των πιθανώς δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας από τα πραγματικά "άγρια" άτομα, στόχος ήταν η διερεύνηση της πραγματικής γενετικής ποικιλομορφίας των φυσικών πληθυσμών και ο έλεγχος της ύπαρξης διαφορετικών περιοχών ωοτοκίας.

Για την αξιολόγηση του SRD ως ικανού χαρακτήρα διάκρισης των δραπετών ψαριών μέσα στα φυσικά αποθέματα, διερευνήθηκε η υπόθεση των Geladakis *et al.* (2021) σύμφωνα με την οποία οι δραπέτες που διαφεύγουν στη φύση σε νεαρότερα στάδια ανάπτυξης μπορούν να έχουν χαμηλότερα ποσοστά αναγεννημένων λεπιών. Για τον σκοπό αυτό, εξετάστηκε ο ρυθμός με τον οποίο οι εν δυνάμει δραπέτες (εκτρεφόμενοι πληθυσμοί) χάνουν λέπια κατά τη διάρκεια παραμονής τους στις μονάδες παραγωγής. Συγκεκριμένα ελέγχθηκε η εξέλιξη του βαθμού αναγέννησης των λεπιών σε δείγματα τσιπούρας από το στάδιο της μεταμόρφωσης (στάδιο δημιουργίας των λεπιών) έως το τέλος της παραγωγικής διαδικασίας. Για το λόγο αυτό, τα επίπεδα SRD μελετήθηκαν σε δύο διακριτές φάσης παραγωγής: α) κατά τη διάρκεια παραγωγής γόνου στον ιχθυογεννητικό σταθμό, και β) κατά τη περίοδο πάχυνσης στα κλουβιά. Για την καλύτερη κατανόηση της διακύμανσης των επιπέδων SRD στα διαφορετικά περιβάλλοντα ανάπτυξης, πάρθηκαν δείγματα από δύο ιχθυογεννητικούς σταθμούς, έναν ιδιωτικό και έναν ερευνητικό. Παρόμοια, για τον συγκριτικό έλεγχο της εξέλιξης των επιπέδων SRD, ο πληθυσμός του ιδιωτικού εκκολαπτηρίου διαχωρίστηκε σε δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής κατά την περίοδο της σωματικής αύξησης των ψαριών.

Η μορφολογία των ωτολίθων αποτελεί αξιόπιστο δείκτη στον εντοπισμό διαφορών που οφείλονται στο περιβάλλον ή/και στα γενετικά χαρακτηριστικά των πληθυσμών (Cardinale *et al.* 2004). Για την εξέταση των ορίων φαινοτυπικής πλαστικότητας του είδους, ως απόκριση στο περιβάλλον ανάπτυξης των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων ή/και των ιχθυδίων και ενηλίκων ατόμων, ελέγχθηκε η μορφολογική διακύμανση του σχήματος, του μεγέθους και της ασυμμετρίας των ωτολίθων σε διακριτούς εκτρεφόμενους πληθυσμούς. Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας κατά το εμβρυϊκό και λεκιθοφόρο στάδιο ανάπτυξης των ψαριών σε δείγματα ερευνητικού σταθμού, από το στάδιο της μεταμόρφωσης έως το στάδιο του ιχθυδίου. Ακολούθως, ελέγχθηκε η επίδραση του διαφορετικού περιβάλλοντος ανάπτυξης των ψαριών κατά τη περίοδο της σωματικής αύξησης των ατόμων (από το στάδιο του ιχθυδίου έως το ενήλικο), στα δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Στο παρόν Κεφάλαιο περιγράφεται η προέλευση των δειγμάτων καθώς και οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν. Για τη διερεύνηση της ποικιλομορφίας (μορφολογικής και γενετικής) των "άγριων" πληθυσμών τσιπούρας, περιγράφεται η προέλευση και επεξεργασία των δειγμάτων φυσικής προέλευσης και δύο δειγμάτων εκτροφής, ως δείγματα ελέγχου. Για τη μελέτη διαφορετικών παραγόντων που επιδρούν στη φαινοτυπική διακύμανση των ωτολίθων και των λεπιών κατά την ανάπτυξη των ψαριών, περιγράφεται η προέλευση, ο πειραματικός σχεδιασμός και η διαδικασία εκτροφής των πληθυσμών. Τέλος, παρουσιάζονται αναλυτικά όλες οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για την ανάλυση των μορφολογικών και γενετικών χαρακτήρων.

2.1 Ταυτοποίηση φυσικών αποθεμάτων τσιπούρας

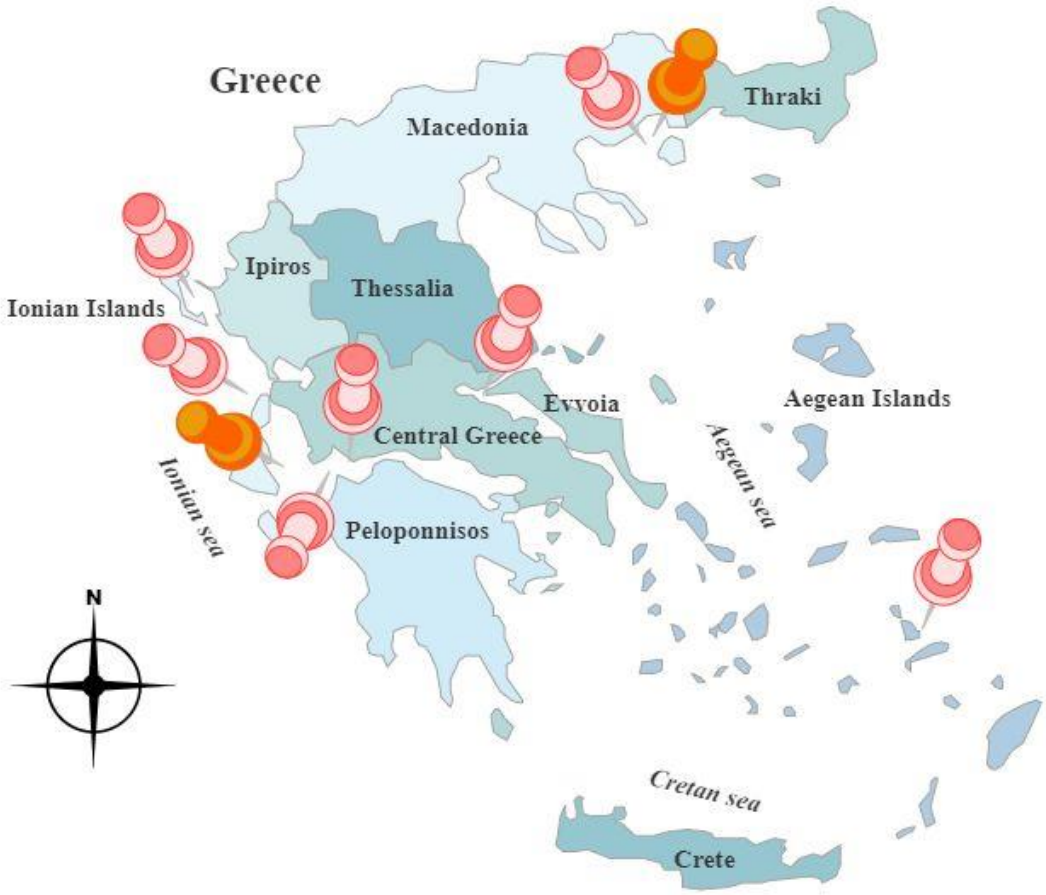
2.1.1 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων φυσικής προέλευσης

Για τον προσδιορισμό της δομής των φυσικών πληθυσμών τσιπούρας μέσω της χρήσης μορφολογικών και γενετικών χαρακτήρων συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν 454 άτομα τσιπούρας από 9 συνολικά περιοχές του Ελλαδικού χώρου (Εικόνα 2.1). Τα 396 άτομα συλλέχθηκαν από το φυσικό περιβάλλον («άγριες συλλήψεις») από 7 γεωγραφικά διακριτές περιοχές του Αιγαίου και του Ιονίου πελάγους. Τα υπόλοιπα 58 άτομα συλλέχθηκαν από δύο μονάδες εντατικής ιχθυοκαλλιέργειας ως δείγματα ελέγχου (Πίνακας 2.1). Η αλίευση των ψαριών από τις διαφορετικές περιοχές του Ιονίου Πελάγους πραγματοποιήθηκε με τράτα από το Ερευνητικό σκάφος ‘ΦΙΛΙΑ’, ενώ της Καλύμνου, του Β. Αιγαίου, του Μαλιακού και του Μεσολογγίου με δίχτυα (απλάδια) από τον εμπορικό στόλο. Όλες οι δειγματοληψίες έλαβαν χώρα μεταξύ των ετών 2015 έως 2018 εκτός από το πρώτο δείγμα του Ιονίου, όπου συλλέχθηκε τον Οκτώβριο του 2014 (Πίνακας 2.1). Έπειτα από τη συλλογή κάθε δείγματος, τα ψάρια καταψύχονταν άμεσα. Μέρος των παραπάνω δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε αρχικά στη μεταπτυχιακή εργασία με τίτλο "Συγκριτική μελέτη της διακύμανσης του σχήματος σώματος και ωτολίθων σε τσιπούρες (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) από διαφορετικές περιοχές του Ελλαδικού χώρου" (Γελαδάκης 2016).

Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων στο εργαστήριο έπειτα από την απόψυξη των ατόμων, κάθε ψάρι φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή και από τις δύο πλευρές του και μετρήθηκε το ολικό του βάρος. Δείγμα λεπιών απομονώθηκε και αποθηκεύτηκε από κάθε ψάρι για τον υπολογισμό του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD, όπως περιγράφεται στο §2.2.2.4). Για τη γενετική ανάλυση των δειγμάτων, κομμάτι ιστού από τον κάτω λοβό της ουράς κάθε ψαριού αφαιρέθηκε και συντηρήθηκε σε 99% αιθανόλη. Τέλος, πραγματοποιήθηκε κάθετη τομή στο πίσω μέρος της κεφαλής του κάθε ψαριού και εξαγωγή του ζεύγους των ωτολίθων του (sagittae).

Πίνακας 2.1. Εποχή σύλληψης και μέγεθος δείγματος ανά περιοχή δειγματοληψίας. *: Δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μεταπτυχιακή εργασία του Γελαδάκη (2016).

Περιοχή	Εποχή Σύλληψης	Αριθμός ατόμων	Συντομογραφία
Κεντρικό Ιόνιο	10/2017	64	CI
Κέρκυρα	10/2014*, 05/2015*, 10/2017	95	Cor
Πατραϊκός	10/2017, 02/2018	46	Ptr
Μεσολόγγι	09-10/2017	50	Mes
Κάλυμνος	10/2015*, 09/2017	65	Klm
Μαλιακός	09/2015*	18	Mal
Βόρειο Αιγαίο	11/2015*, 08-10/2017	58	NA
Ιόνιο (Εκτροφής)	11/2015*	30	IR
Βόρειο Αιγαίο (εκτροφής)	04/2015*	28	NAR
Σύνολο		**454**	



Εικόνα 2.1. Χάρτης δειγματοληψίας. Οι πινέζες προσδιορίζουν τις τοποθεσίες συλλογής των δειγμάτων. Ροζ πινέζες: δείγματα άγριων συλλήψεων. Πορτοκαλί πινέζες: δείγματα εκτροφής.

2.1.2 Μορφομετρική ανάλυση σχήματος του σώματος

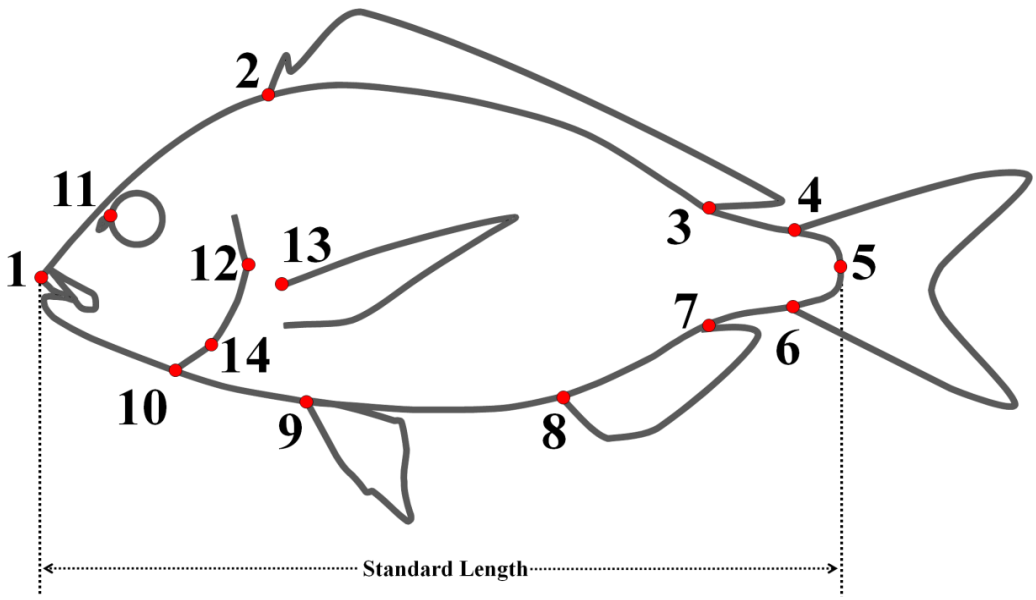
Η μελέτη της φυσικής ποικιλομορφίας του σχήματος του σώματος των ψαριών πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου της γεωμετρικής μορφομετρίας. Με τη χρήση του λογισμικού tpsDig2 (Version 2.12, Rohlf [2010]), αναλύθηκε η φωτογραφία της αριστερής όψης κάθε ψαριού. Συγκεκριμένα, 14 ομόλογα μορφομετρικά ορόσημα (landmarks) τοποθετήθηκαν σε κάθε φωτογραφία, σε αντίστοιχες διακριτές ανατομικά περιοχές (Εικόνα 2.2). Για την εξάλειψη των επιπτώσεων του μεγέθους, της θέσης, και του προσανατολισμού του κάθε ατόμου, εφαρμόστηκε η μέθοδος του Προκρούστη (Procrustes superimposition), με τη χρήση του λογισμικού MoprhoJ (Version 1.06a, Klingenberg 2011). Με τον τρόπο αυτό, τα μορφομετρικά ορόσημα μετασχηματίζονται και συντάσσουν τις λεγόμενες Προκρούστειες συντεταγμένες (Procrustes coordinates). Για την εξάλειψη των αλλομετρικών διαφορών μεταξύ των δειγμάτων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση παλινδρόμησης (multivariate regression) μεταξύ των μετασχηματισμένων μεταβλητών του σχήματος (εξαρτημένες μεταβλητές) και του κεντροειδούς μεγέθους των ατόμων (centroid size ως ανεξάρτητος παράγοντας, Klingenberg 2016). Αυτό ορίζεται ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των ελάχιστων αποστάσεων όλων των μορφομετρικών οροσήμων από ένα σημείο που ονομάζεται κεντροειδές. Έτσι, διαχωρίζονται τα στοιχεία της διακύμανσης του σχήματος που είναι ανεξάρτητα του μεγέθους των ψαριών (residuals), από τα εξαρτημένα (predicted). Ως αποτέλεσμα της ανάλυσης παλινδρόμησης παράγεται ένα νέο σετ δεδομένων, το οποίο περιέχει μόνο τα ανεξάρτητα από το μέγεθος στοιχεία διακύμανσης του σχήματος (residuals), στα οποία εφαρμόζονται οι στατιστικές αναλύσεις.

Τα τελικά δεδομένα από την ανάλυση της γεωμετρικής μορφομετρίας των ατόμων φυσικής προέλευσης χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της διακύμανσης του σχήματος του σώματος με βάση την περιοχή προέλευσης και το βαθμό αναγέννησης των λεπιών. Μέσω της χρήσης του λογισμικού Primer PRIMER-E v.6 (Clarke & Gorley 2006), τα ανεξάρτητα από το μέγεθος δεδομένα του σχήματος μετασχηματίστηκαν σε πίνακα ευκλείδειων αποστάσεων (Euclidean distance matrix). Μη παραμετρική ανάλυση διασποράς (PERMANOVA) εφαρμόστηκε επί των αθροισμάτων των τετραγώνων των ευκλείδειων αποστάσεων για τη δημιουργία μιας pseudo-F κατανομής, χρησιμοποιώντας απεριόριστες επαναλήψεις των πρωτογενών δεδομένων (αριθμός επαναλήψεων 9,999, Anderson & Braak 2003). Οι βαθμοί σημαντικότητας (p-values) υπολογίστηκαν για τον έλεγχο της επίδρασης του κάθε παράγοντα (περιοχή προέλευσης, βαθμός αναγέννησης). Για τον έλεγχο των διαφορών μεταξύ των ομάδων υπολογίστηκαν οι μέσες αποστάσεις (average distances between groups) και οι αντίστοιχοι βαθμοί σημαντικότητας. Για τη διάκριση των ομάδων, καθώς και για την εκτίμηση της κατανομής τους στον πολυπαραγοντικό

χώρο, εφαρμόστηκε κανονική ανάλυση κύριων συντεταγμένων (Canonical analysis of Principal coordinates: CAP, Anderson & Willis 2003). Η ανάλυση CAP περιλαμβάνει δύο βήματα: Πρώτα, πραγματοποιείται μια ανάλυση κύριων συντεταγμένων (Principal coordinates analysis, PCO) επί του πίνακα των ευκλείδειων αποστάσεων. Στη συνέχεια, εκτελείται μια κανονική ανάλυση διαχωρισμού (Canonical Discriminant analysis) σε ένα υποσύνολο δεδομένων (PC axes) των αποτελεσμάτων της PCO. Ο αριθμός των αξόνων της PCO (m) επιλέχθηκε σύμφωνα με το κριτήριο της μικρότερης εσφαλμένης επανατοποθέτησης των ατόμων στις αρχικές τους ομάδες (‘leave-one-out’ misclassification error). Για κάθε ανάλυση CAP, ελέγχθηκαν οι διαφορές μεταξύ των ομάδων και υπολογίστηκε ο βαθμός σημαντικότητας εφαρμόζοντας 9,999 επαναλήψεις (Clarke & Gorley 2006).

Στις αναλύσεις των μεταβλητών του σχήματος του σώματος, στις οποίες ελέγχθηκαν οι διαφορές μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων, εφαρμόστηκε Procrustes ANOVA (Klingenberg and McIntyre 1998). Για τον έλεγχο των διαφοροποιήσεων του σχήματος μεταξύ των ομάδων στον πολυπαραγοντικό χώρο, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κανονικών μεταβλητών (Canonical variate analysis, CVA). Για το κάθε τεστ υπολογίστηκε ο βαθμός σημαντικότητας της επίδρασης του κάθε παράγοντα και η τιμή του Wilks' Lambda (λ). Οι βαθμοί σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ των ομάδων υπολογίστηκαν με βάση τις αποστάσεις Mahalanobis, εφαρμόζοντας 10,000 επαναλήψεις (Rohlf *et al.* 1996, Klingenberg and Monteiro 2005).

Για τη σχηματική απεικόνιση της διακύμανσης του σχήματος του σώματος των ψαριών, πραγματοποιήθηκε ανάλυση παλινδρόμησης μεταξύ των μεταβλητών του σχήματος και των τιμών του κάθε άξονα διακύμανσης της αντίστοιχης πολυπαραγοντικής ανάλυσης (Klingenberg 2013). Τέλος, πραγματοποιήθηκε ανάλυση παλινδρόμησης στις μεταβλητές σχήματος των δειγμάτων φυσικής προέλευσης σε σχέση με τον συντελεστή ευρωστίας (§2.1.3).



Εικόνα 2.2. Τοποθέτηση των 14 ομόλογων μορφομετρικών οροσήμων. (1) πρόσθιο σημείο της άνω γνάθου. (2, 3) πρόσθια και οπίσθια βάση του ραχιαίου πτερυγίου. (4, 6) άνω και κάτω βάση του ουραίου πτερυγίου. (5) μέσο της βάσης του ουραίου πτερυγίου. (7, 8) οπίσθια και πρόσθια βάση του εδρικού πτερυγίου. (9) πρόσθια βάση του κοιλιακού πτερυγίου. (10) οπίσθιο κατώτερο όριο του βραγχιακού επικαλύμματος. (11) πρόσθιο όριο του ματιού. (12) οπίσθιο όριο του βραγχιακού επικαλύμματος. (13) οπίσθια βάση του αριστερού θωρακικού πτερυγίου. (14) κατώτερο όριο του υπο-επικαλυμματικού οστού.

2.1.3 Συντελεστής ευρωστίας (condition factor)

Μετά την τοποθέτηση των μορφομετρικών οροσήμων πάνω στις φωτογραφίες των ατόμων φυσικής προέλευσης και των δύο δειγμάτων ελέγχου εκτρεφόμενης προέλευσης, υπολογίστηκε το τυπικό μήκος του κάθε ψαριού (Standard Length, SL) με βάση την απόσταση των οροσήμων 1 και 5 και την κλίμακα της κάθε φωτογραφίας (5cm). Ακολούθως υπολογίστηκε η σχέση μήκους (SL) – βάρους (W) για το σύνολο των δειγμάτων άγριας προέλευσης ($W = a \cdot SL^b$). Με βάση τη σχέση αυτή, για κάθε άτομο υπολογίστηκε ο συντελεστής ευρωστίας, ως η % αναλογία του παρατηρούμενου προς το αναμενόμενο βάρος (W_{obs}/W_{exp}). Ο έλεγχος της επίδρασης του κάθε υπό εξέταση παράγοντα (περιοχή προέλευσης, SRD) στο συντελεστή ευρωστίας των ατόμων έγινε με ανάλυση διασποράς (ANOVA), Kruskal-Wallis και Mann–Whitney U tests.

2.1.4 Γοναδοσωματικός (G. I.) και Καρδιοσωματικός (H. I.) δείκτης

Κατά την επεξεργασία των ψαριών στο εργαστήριο, πραγματοποιήθηκε εξαγωγή των γονάδων και της καρδιάς σε δείγμα ψαριών φυσικής προέλευσης από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές. Το ολικό βάρος των γονάδων και της καρδιάς του κάθε ψαριού μετρήθηκε και υπολογίστηκαν ο γοναδοσωματικός και ο καρδιοσωματικός δείκτης. Ο κάθε δείκτης προκύπτει ως η % αναλογία του βάρους των γονάδων (G.I.) ή της καρδιάς (H.I.) προς το παρατηρούμενο βάρος του κάθε ψαριού. Ο έλεγχος της επίδρασης του κάθε υπό εξέταση παράγοντα (περιοχή προέλευσης,

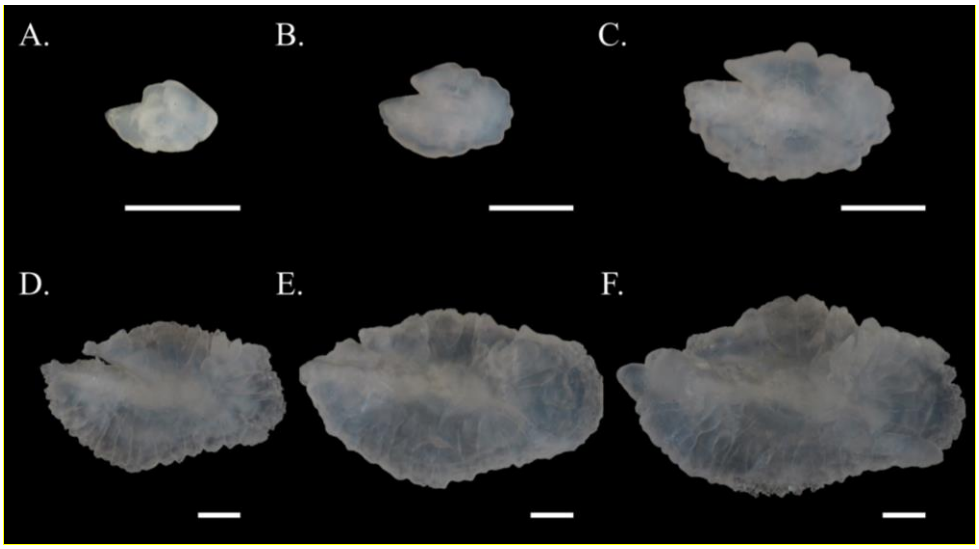
SRD) στο γοναδωσωματικό ή στο καρδιοσωματικό δείκτη των ατόμων έγινε με ανάλυση διασποράς (ANOVA), Kruskal-Wallis και Mann–Whitney U tests.

2.1.5 Ανάλυση σχήματος ωτολίθων

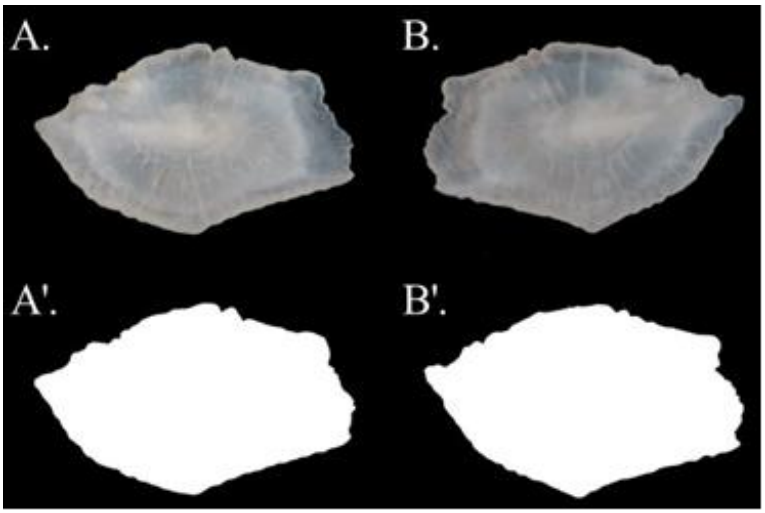
Έπειτα από την εξαγωγή κάθε ζεύγους, οι ωτόλιθοι καθαρίστηκαν με 75% αιθανόλη και φωτογραφήθηκαν ατομικά μέσω ψηφιακής μηχανής (Lumenera's INFINITY1-5C) τοποθετημένης πάνω σε στερεοσκόπιο (Olympus SZ61). Για το σκοπό αυτό, κάθε ωτόλιθος τοποθετήθηκε κάτω από προσπίπτον φωτισμό πάνω σε μαύρο φόντο μέσα σε νερό (Εικόνα 2.6). Το σύνολο των φωτογραφιών των ωτολίθων επεξεργάστηκε μέσω του λογισμικού ανάλυσης εικόνας ImageJ (Schneider *et al.* 2012). Για την καθιέρωση κοινού προσανατολισμού μεταξύ των δύο πλευρών, οι φωτογραφίες των δεξιών ωτολίθων αναστράφηκαν στο οριζόντιο επίπεδο. Όλες οι φωτογραφίες μετασχηματίστηκαν σε δυαδική ασπρόμαυρη εικόνα (binary image) και χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της ποικιλομορφίας του σχήματος των ωτολίθων (Εικόνα 2.7). Για το σκοπό αυτό έγινε χρήση του πακέτου 'ShapeR' (Libungan and Palsson 2015), ειδικού για τη μελέτη της διακύμανσης του σχήματος των ωτολίθων, μέσω της γλώσσας προγραμματισμού 'R'. Μέσω μιας σειράς συγκεκριμένων εντολών, δημιουργήθηκε το περίγραμμα των ωτολίθων όλων των εικόνων της κάθε ανάλυσης. Όλα τα περιγράμματα τοποθετήθηκαν πάνω σε ένα σύστημα αξόνων (x, y) με σκοπό να ευθυγραμμιστούν. Στη συνέχεια, λήφθηκε η επιφάνεια (O_S, mm^2), η περίμετρος (O_P, mm), το μέγιστο μήκος (O_L, mm) και το μέγιστο πλάτος (O_D, mm) του κάθε ωτόλιθου με βάση την αντίστοιχη κλίμακα. Από μια σειρά εντολών πραγματοποιήθηκε κανονικοποιημένη ανάλυση ελλειπτικών Fourier και λήφθηκαν 12 αρμονικές (Fourier harmonics), κάθε μια από τις οποίες περιλαμβάνει 4 συντελεστές Fourier (Fourier coefficients). Ο αριθμός των αρμονικών επιλέχθηκε με κριτήριο την ανασυγκρότηση του σχήματος των ωτολίθων με ακρίβεια 98,5% (Libungan and Palsson 2015). Για την εξάλειψη των επιπτώσεων της θέσης του μεγέθους και του προσανατολισμού του κάθε δείγματος ωτολίθου, οι τρεις πρώτοι συντελεστές Fourier παραλείφθηκαν αυτόματα. Για την εξάλειψη της αλλομετρίας, έγινε συσχέτιση των συντελεστών Fourier του σχήματος με τα μήκη των ψαριών, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση των βασικών αλλομετρικών διαφορών στο κάθε δείγμα. Τέλος, για την οπτική απεικόνιση της διακύμανσης του σχήματος των ωτολίθων, εκτιμήθηκε το μέσο σχήμα της κάθε ομάδας ψαριών.

Για τον έλεγχο της διακύμανσης του σχήματος των ωτολίθων με βάση την περιοχή προέλευσης και το βαθμό αναγέννησης των λεπιών για τα άτομα τσιπούρας φυσικής προέλευσης, εφαρμόστηκε μη παραμετρική ανάλυση διασποράς (PERMANOVA, Anderson and Braak 2003) και κανονική ανάλυση κύριων συντεταγμένων (CAP, Anderson and Willis 2003). Στο σύνολο των

ατόμων και ανεξάρτητα της περιοχής προέλευσης, ελέγχθηκαν οι διαφορές μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων με διαφορετικά επίπεδα SRD, ως προς διακύμανση του σχήματος των ωτολίθων, εφαρμόζοντας ανάλυση κανονικών μεταβλητών (CVA). Για το κάθε τεστ υπολογίστηκε ο βαθμός σημαντικότητας της επίδρασης του κάθε παράγοντα και η τιμή του Wilks' Lambda (λ). Οι βαθμοί σημαντικότητας των διαφορών μεταξύ των ομάδων υπολογίστηκαν με βάση το τετράγωνο των αποστάσεων Mahalanobis.



Εικόνα 2.6. Αριστεροί ωτόλιθοι τσιπούρας (sulcus acusticus στραμμένος προς τα κάτω) σε έξι διαφορετικά μήκη σώματος (SL, Τυπικό μήκος). A: 2,2 cm SL, B: 3,4 cm SL, C: 5,4 cm SL, D: 14,6 cm SL, E: 19,8 cm, F: 24,2 cm. Οι μπάρες κλίμακας αντιστοιχούν σε 0,5 mm. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν με ανακλώμενο φως, σε μαύρο φόντο.



Εικόνα 2.7. A: Φωτογραφία αριστερού ωτόλιθου, B: Φωτογραφία δεξιού ωτόλιθου, A': Δυαδική ασπρόμαυρη εικόνα αριστερού ωτόλιθου, B': Δυαδική ασπρόμαυρη εικόνα ανεστραμμένου δεξιού ωτόλιθου. Οι ωτόλιθοι ανήκουν σε ψάρι τυπικού μήκους 18,1 cm.

2.1.6 Ανάλυση μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους ωτολίθων

Σύμφωνα με τον (Reist 2011) για την ανάλυση των μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους των ωτολίθων (επιφάνεια-O_S, περίμετρος-O_P, μήκος-O_S, πλάτος-O_D) είναι αναγκαία η απομάκρυνση των διαφορών μεταξύ των ατόμων που οφείλονται στο μέγεθος τους (αλλομετρίκες διαφορές). Για τον λόγο αυτό, εκτιμήθηκε η αλλομετρική σχέση ($Y=aSL^b$) για κάθε μορφολογικό χαρακτήρα. Έτσι, κάθε εκτιμώμενη τιμή μετασχηματιστικέ σύμφωνα με τη φόρμουλα:

$$Y_i^*=Y(SL_{mean}/SL_i)^b$$

όπου SL_i το τυπικό μήκος κάθε ατόμου και SL_{mean} το μέσο τυπικό μήκος όλων των ατόμων σε κάθε ανάλυση (Lleonart *et al.* 2000). Με τη χρήση των νέων κανονικοποιημένων τιμών (Y_i^*) εκτιμήθηκε η αναλογία πλάτους προς μήκος (O_D/O_L). Η σημαντικότητα των διαφορών ως προς τις κανονικοποιημένες τιμές των μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους των ωτολίθων μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ψαριών, εξετάστηκε μέσω της ανάλυσης διασποράς (ANOVA) και των Kruskal-Wallis και Mann–Whitney U tests. Η διόρθωση Bonferroni εφαρμόστηκε σε όλες τις κατά ζεύγη συγκρίσεις.

2.1.7 Ανάλυση ασυμμετρίας ωτολίθων

Τέσσερις μορφολογικοί χαρακτήρες μεγέθους (O_S, O_P, O_S, O_D μη κανονικοποιημένοι ως προς το μήκος) και επτά κύριες αρμονικές Fourier (high-amplitude harmonics, H_2-H_8 που περιγράφουν τα κύρια χαρακτηριστικά του σχήματος των ωτολίθων, (Tort 2003), χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση αμφίπλευρης ασυμμετρίας στα ζεύγη ωτολίθων των διαφορετικών ομάδων ψαριών. Οι τιμές των κύριων αρμονικών υπολογίστηκαν από τους μη κανονικοποιημένους ως προς το τυπικό μήκος συντελεστές Fourier. Συγκεκριμένα η κάθε αρμονική *n* υπολογίστηκε σύμφωνα με τη σχέση:

$$amp_n = \frac{1}{2}\sqrt{a_n^2 + b_n^2 + c_n^2 + d_n^2}, \text{ (Tort 2003)}$$

Αρχικά, όλοι οι μορφολογικοί χαρακτήρες εξετάστηκαν ως προς τον τύπο της ασυμμετρίας: κυμαινόμενη ασυμμετρία, κατευθυνόμενη ασυμμετρία ή αντισυμμετρία (Palmer and Strobeck 1986). Η ύπαρξη της κατευθυνόμενης ασυμμετρίας (directional asymmetry, DA) ελέγχθηκε με Student's t-test και εκφράστηκε όταν η μέση διαφορά μεταξύ των δύο πλευρών του σώματος (L-R), για το σύνολο των ατόμων της κάθε ανάλυσης, ήταν σημαντικά διαφορετική από το μηδέν. Αντίστοιχα, η αντισυμμετρία (bimodal distribution of R-L) ελέγχθηκε με Kolmogorov–Smirnov test και εκφράστηκε όταν οι τιμές της διαφοράς μεταξύ των δύο πλευρών του σώματος (R-L) δεν είχαν κανονική κατανομή. Βασική προϋπόθεση για τον υπολογισμό της κυμαινόμενης ασυμμετρίας

(fluctuating asymmetry, FA), ήταν ο έλεγχος για τον αποκλεισμό της ύπαρξης των δύο άλλων τύπων αμφίπλευρης ασυμμετρίας.

Δύο δείκτες χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό της ασυμμετρίας του κάθε ζεύγους ωτολίθων (Left-Right) στο σύνολο των ατόμων: η διακύμανση της διαφοράς των δύο πλευρών [δείκτης FA_1=var(R-L)] και η μέση απόλυτη τιμή της διαφοράς των δύο πλευρών (δείκτης $FA_2=\Sigma|R-L|/N$, όπου N ίσο με τα μέγεθος του κάθε δείγματος) (Palmer and Strobeck 1986). Για την αφαίρεση της μεγεθο-εξαρτόμενης διακύμανσης της ασυμμετρίας στο σύνολο των ατόμων, εφαρμόστηκε απλή ανάλυση παλινδρόμησης (simple regression analysis) μεταξύ των απόλυτων τιμών ασυμμετρίας (ln|R-L|) για τον κάθε μορφολογικό χαρακτήρα και του φυσικού λογάριθμου του τυπικού μήκους των ψαριών ln(SL) (Somarakis *et al.* 1997b). Όπου η επίδραση του μεγέθους ήταν σημαντική, ο κάθε δείκτης ασυμμετρίας (FA_1, FA_2) μετασχηματίστηκε, διαιρώντας τις τιμές (R-L) ή |R-L| με το ήμισυ του μέσου όρου τους (Palmer and Strobeck 1986). Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των δειγμάτων για το δείκτη FA_1 ελέγχθηκε με τη χρήση του Barlett test. Αντίστοιχα, για το δείκτη FA_2, χρησιμοποιήθηκε ανάλυσης διασποράς (ANOVA), Kruskal-Wallis και Mann–Whitney U tests. Η διόρθωση Bonferroni εφαρμόστηκε στις κατά ζεύγη συγκρίσεις.

2.1.8 Ανάλυση μικροδορυφορικού DNA (microsatellite DNA)

Η γενετική ανάλυση των δειγμάτων φυσικής προέλευσης και των δύο δειγμάτων εκτροφής (δείγματα ελέγχου) πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Εφαρμοσμένης Γενετικής & Γενετικής Βελτίωσης ενός από τα τρία μέλη της τριμελούς επιτροπής (Αναπληρωτής Καθηγητής Κ. Μπαταργιάς, Παν. Πατρών). Η εξαγωγή του DNA πραγματοποιήθηκε με χημική λύση των κυττάρων δείγματος ιστού της ουράς κάθε ψαριού, μέσω χημικού διαλύματος 10% Chelex 100 (Walsh, Metzger *et al.* 1991). Μέσω μιας σειράς επαναλαμβανόμενων φυγοκεντρήσεων και θέρμανσης στους 95°C, το DNA κάθε δείγματος ιστού απελευθερώθηκε στο υπερκείμενο κάθε διαλύματος. Με τον τρόπο αυτό, το DNA κάθε ψαριού διαχωρίστηκε από τα υπόλοιπα συστατικά του κυττάρου και απομονώθηκε, για την πολλαπλή αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (multiplex PCR). Για την πραγματοποίηση της PCR, χρησιμοποιήθηκε ένα σετ εκκινητών (primers) για τον πολλαπλασιασμό 9 μικροδορυφορικών τόπων του πυρηνικού DNA της τσιπούρας. Το σετ περιλαμβάνει τα ζεύγη εκκινητών των παρακάτω τόπων: Dd67, SAGT1, VBC003, Bd10, ELD10, BMAP54, SAGT32, VBC160, SAGT41, όπως αναπτύχθηκε από τους Batargias *et al.* (1999), Franch *et al.* (2006), Sarropoulou *et al.* (2006) και Loukovitis *et al.* (2011b). Ο πολλαπλασιασμός των αντιγράφων του DNA κάθε ψαριού πραγματοποιήθηκε σε τελικό όγκο 10μl που περιείχε τελικές συγκεντρώσεις: Taq Πολυμεράση 2,5 U (KAPA2G Fast HotStart DNA), KAPA2G Buffer A: 1x at 1x, dNTPs: 0.2 mM ανά dNTP, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,2-0,7 μM από κάθε ζεύγος εκκινητών

(Forward and Reverse) και 1,5μl του διαλύματος DNA κάθε ψαριού εκτιμώμενης ποσότητας 100ng. Για την πραγματοποίηση της PCR ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα: αρχική αποδιάταξη του DNA στους 95 °C για 3 λεπτά (initial denaturation), 35 κύκλοι που περιλαμβάνουν την αποδιάταξη του DNA στους 94 °C για 30 δευτερόλεπτα (denaturation), την προσκόλληση των εκκινητών στο DNA στους 56 °C για 30 δευτερόλεπτα (annealing) και την επιμήκυνση του DNA μέσω της DNA πολυμεράσης στους 72 °C για 30 δευτερόλεπτα (elongation), τελική επιμήκυνση (final elongation) του DNA στους 72 °C για 45 λεπτά. Το κάθε προϊόν της PCR προετοιμάστηκε μαζί με Φορμαμίδιο (HI-DI TM FORMAMIDE, Life Technologies) καθώς και με φθορίζοντα (στο 5' άκρο) κομμάτια DNA γνωστού μοριακού μεγέθους (GENESCAN-500-LIZ size standard, Life Technologies), για τη διάκριση των πολλαπλασιασμένων μικροδορυφορικών τόπων κάθε δείγματος DNA, μέσω της χρήσης Γενετικού Αναλυτή (3500 ABI, Applied Biosystems). Τα αποτελέσματα του Γενετικού αναλυτή παρουσιάστηκαν σε χρωματογράφημα και ο εντοπισμός του μεγέθους του κάθε μικροδορυφορικού τόπου πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος GeneMapper v. 3.5 (Applied Biosystems).

Τα δεδομένα της γενετικής ανάλυσης, ελέγχθηκαν ως προς την παρουσία γονοτυπικών λαθών (genotyping errors) και ουδέτερων αλληλομόρφων (null alleles) μέσω του προγράμματος Micro-cheker v.2.2.3 (Oosterhout *et al.* 2004). Στη συνέχεια, για τις διαφορετικές ομάδες, υπολογίστηκαν οι βασικές γενετικές παράμετροι. Μέσω του προγράμματος MS Tools (Kavan and Man 2011), για την κάθε ομάδα καθώς και για το σύνολο των δεδομένων της κάθε ανάλυσης, , υπολογίστηκε η παρατηρούμενη (Ho) και η αναμενόμενη (He) ετεροζυγωτία καθώς και ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο (A). Μέσω του προγράμματος FSTAT v.2.9.4 (Goudet 2003), υπολογίστηκε η αλληλική αφθονία (Ar) και ο δείκτης ομομιξίας (F_{IS}). Ο μέσος δραστικός αριθμός αλληλομόρφων (Ae) υπολογίστηκε με τη χρήση του προγράμματος POPGENE v.1.32 (Yeh *et al.* 1999). Τέλος, η εξέταση της ανισορροπίας σύνδεσης (linkage disequilibrium) για το κάθε ζεύγος γενετικών τόπων της κάθε ανάλυσης, πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος FSTAT, χρησιμοποιώντας 1100 επαναλήψεις και επίπεδο σημαντικότητας (p-value) 0,05.

Η απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE) για κάθε ομάδα και γενετικό τόπο καθώς και η γονοτυπική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων, εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας αμερόληπτα Fisher exact tests και αλγορίθμους Markov Chain (10,000 dememorisation steps, 100 batches and 5,000 iterations), μέσω του προγράμματος GENEPOP v.4.7.5 (Reymont and Rousset 2020). Οι δείκτες γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των ομάδων (Pair-wise Fst values) και η στατιστική σημαντικότητα των διαφορών τους (χρήση 1,000 επαναλήψεων και 5% επίπεδο εμπιστοσύνης), εκτιμήθηκαν μέσω του προγράμματος FSTAT. Η διόρθωση Bonferroni

εφαρμόστηκε σε όλες τις κατά ζεύγη συγκρίσεις των παραπάνω στατιστικών αναλύσεων (Rice 1989). Για το σύνολο των γενετικών τόπων στο κάθε σετ δεδομένων, υπολογίστηκε ο δείκτης της συνολικής γενετικής διαφοροποίησης (Global Fst) μέσω του προγράμματος ARLEQUIN v.3.5.2.2 (Excoffier and Lischer 2015). Τέλος, μέσω του προγράμματος FreeNA (Chapuis and Estoup 2007), πραγματοποιήθηκε η μέθοδος διόρθωσης ENA, η οποία παρέχει ακριβή εκτίμηση των τιμών F_{ST} εξαιτίας της πιθανής παρουσίας ουδέτερων αλληλομόρφων στο κάθε σετ δεδομένων.

2.2 Όρια φαινοτυπικής διακύμανσης των ωτολίθων και των λεπιών ως απόκριση στο περιβάλλον ανάπτυξης

2.2.1 Πείραμα επίδρασης της θερμοκρασίας ανάπτυξης στη μορφολογία των ωτολίθων

Η θερμοκρασία του νερού κατά το αυτότροφο στάδιο των ψαριών έχει δειχθεί ότι επηρεάζει φυσιολογικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των ψαριών σε επόμενα στάδια ανάπτυξης (Jonsson and Jonsson 2014, Kourkouta *et al.* 2021). Για το λόγο αυτό, πάρθηκαν τυχαία δείγματα από πειραματικούς πληθυσμούς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες πρώιμης ανάπτυξης και εξετάστηκαν ως προς τη διακύμανση της μορφολογίας των ωτολίθων τους.

2.2.1.1 <u>Πειραματικός σχεδιασμός και εκτροφή</u>

Στον ερευνητικό ιχθυογεννητικό σταθμό του Ινστιτούτου θαλάσσιας βιολογίας, βιοτεχνολογίας και υδατοκαλλιεργειών (HCMR) του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ), εννιά ομάδες ψαριών τοποθετήθηκαν ανά τρεις στις θερμοκρασίες των 17, 20 και 23 °C, από το στάδιο της επιβολής έως το τέλος του αυτότροφου σταδίου (κατανάλωση όλων των λεκιθικών αποθεμάτων) και την αρχή της εξωγενούς σίτισης. Στη συνέχεια, όλες οι ομάδες διατηρήθηκαν υπό πανομοιότυπες συνθήκες εκτροφής και θερμοκρασίας (20°C) έως το τέλος της πειραματικής διαδικασίας (Εικόνα 2.2). Ο εγκλιματισμός των αυγών από τη θερμοκρασία ωοτοκίας (17°C) έως τις θερμοκρασίες που εφαρμόστηκαν στο πείραμα (17, 20 και 23 °C) και στη συνέχεια στην κοινή θερμοκρασία για την εκτροφή των νυμφών πραγματοποιήθηκε με ρυθμό 0,5 και 0,2 °C ανά ώρα (h^{-1}) αντίστοιχα. Όλα τα αυγά προέρχονταν από την ίδια μαζική αναπαραγωγή γεννητόρων. Η εκτροφή των πληθυσμών έγινε στο πλαίσιο του ερευνητικού προγράμματος PerformFish (Horizon 2020), όπως περιγράφεται από τους Kourkouta *et al.* (2021). Περιληπτικά, η εκτροφή των νυμφών έγινε με αρχική πυκνότητα 100 νύμφες ανά λίτρο, υπό την παρουσία φυτοπλαγκτού (Chlorella sp.), καταλήγοντας στις 2-5 νύμφες ανά λίτρο, στο τέλος της περιόδου της προπάχυνσης. Η διατροφή των νυμφών αποτελούνταν από ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς (rotifers) μέχρι το συνολικό μήκος (TL) των 6-10 mm, και από ναύπλιων Artemia sp μετά τα 10 mm TL. Κατά την περίοδο της νυμφικής εκτροφής ο κορεσμός σε οξυγόνου κυμάνθηκε από 5,8 ±

1.0 έως 7,8 ± 0.3 mg·L^{-1}, η αλατότητα μεταξύ 35-36‰ (PSU), το pH ήταν 7.8 ± 0.3 και η φωτοπερίοδος βρισκόταν σε αναλογία 18 ωρών φως (L):6 ωρών σκοτάδι (D) (Πίνακας 2.2).

Πίνακας 2.2. Μέσες τιμές (±SD) της θερμοκρασία, της συγκέντρωσης οξυγόνου και του pH σε κάθε επανάληψη (a, b, c) και θερμοκρασιακή συνθήκη. DT, θερμορασία του νερού κατά το εμβρυϊκό και λεκιθοφόρο νυμφικό στάδιο. T_{com}, θερμοκρασία που εφαρμόστηκε μετά το τέλος του αυτότροφου σταδίου.

Group	Rep	DT (ºC)	T_{com} (ºC)	O_2 (mg L^{-1})	pH
17	a	17,1±0,1	19,9±0,2	6,0±0,9	7,8±0,3
	b	17,0±0,1	19,9±0,2	5,8±1,0	7,8±0,3
	c	17,1±0,1	19,8±0,2	6,0±0,9	7,8±0,2
20	a	20,1±0,1	19,9±0,2	5,8±0,7	7,8±0,3
	b	20,1±0,1	19,9±0,2	5,8±0,7	7,8±0,2
	c	20,1±0,1	19,9±0,2	5,9±0,7	7,8±0,2
23	a	22,8±0,1	19,9±0,3	6,0±0,6	7,8±0,2
	b	22,7±0,1	19,9±0,2	6,0±0,8	7,8±0,2
	c	22,7±0,1	19,9±0,3	5,9±0,7	7,8±0,2

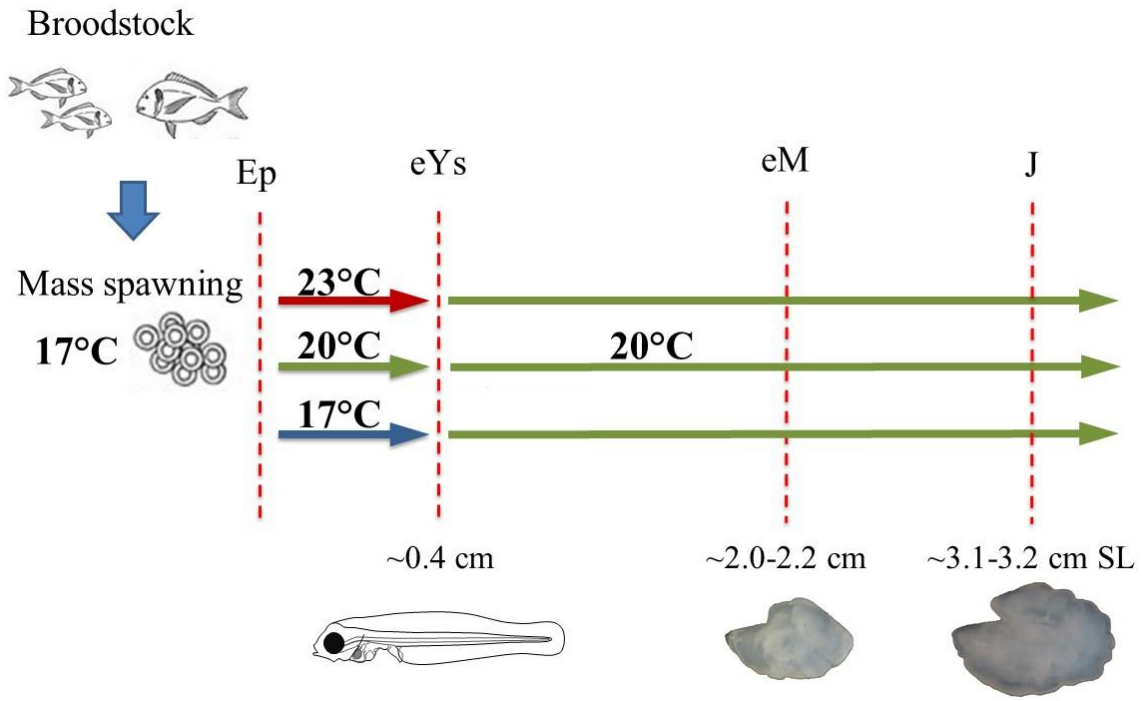
2.2.1.2 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Συνολικά, έξι δείγματα από τον ερευνητικό ιχθυογεννητικό σταθμό (10 άτομα ανά επανάληψη ανά θερμοκρασία) πάρθηκαν τυχαία σε δύο διαφορετικές ηλικίες: κατά το τέλος του σταδίου της μεταμόρφωσης (56-58 ημέρες μετά την εκκόλαψη, dph) και στο στάδιο του ιχθυδίου (93-95 dph) (Πίνακας 2.3). Έπειτα από τη συλλογή κάθε δείγματος, τα ψάρια καταψύχονταν άμεσα. Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων στο εργαστήριο, έπειτα από την απόψυξη των ατόμων, μετρήθηκε το τυπικό μήκος κάθε ψαριού μέσω χάρακα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε κάθετη τομή στο πίσω μέρος της κεφαλής του κάθε ψαριού, για την εξαγωγή του ζεύγους των ωτολίθων του.

2.2.1.3 Ανάλυση ωτολίθων

Η ανάλυση του σχήματος των ωτολίθων περιγράφεται στο §2.1.5. Η επίδραση της θερμοκρασίας ανάπτυξης (17, 20, 23 °C) στο σχήμα των ωτολίθων των πειραματικών πληθυσμών τσιπούρας εξετάστηκε μέσω της ανάλυσης κανονικών συνιστωσών (CVA) στα δεδομένα Fourier. Για το κάθε τεστ υπολογίστηκαν ο βαθμοί σημαντικότητας και η τιμή του Wilks' Lambda (λ). Τέλος, στη κάθε δειγματοληψία, εξετάσθηκε η ύπαρξη διαφοροποίησης ως προς το μέσο μέγεθος των ατόμων μεταξύ των θερμοκρασιακών ομάδων, μέσω ανάλυση διασποράς (ANOVA) και *a* posteriori Bonferroni test.

Η ανάλυση των κανονικοποιημένων τιμών μεγέθους και της ασυμμετρίας των ωτολίθων για τους πειραματικούς πληθυσμούς με διαφορετική θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης (17, 20, 23 °C) πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα §2.1.6 και §2.1.7 αντίστοιχα.



Εικόνα 2.2. Πειραματικός σχεδιασμός. Τα ψάρια υποβλήθηκαν σε μία από τις τρεις θερμοκρασίες ανάπτυξης (17, 20, 23°C) από την έναρξη της επιβολής (Ep) έως το τέλος του αυτότροφου σταδίου (eYs) και στη συνέχεια σε μια κοινή θερμοκρασία μέχρι το στάδιο του ιχθυδίου (3,1-3,2 cm SL). Όλες οι θερμοκρασιακές συνθήκες εφαρμόστηκαν εις τριπλούν. eM, ανάλυση ωτολίθων στο τέλος του σταδίου της μεταμόρφωσης (2,0-2,2 cm, SL). J, ανάλυση ωτολίθων στο στάδιο του ιχθυδίου (3,1-3,2 cm, SL).

2.2.2 Πειράματα επίδρασης του περιβάλλοντος ανάπτυξης στην εξέλιξη της μορφολογίας των ωτολίθων και του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD)

Το περιβάλλον ανάπτυξης των ψαριών επιδρά στην μορφολογία των ωτολίθων τους (Cardinale *et al.* 2004, Vignon, M. and F. Morat 2010). Ως εκ τούτου, δείγματα κοινού εκτρεφόμενου πληθυσμού πάρθηκαν κατά τη περίοδο της σωματικής τους αύξησης (περίοδος πάχυνσης) από δύο γεωγραφικά διακριτά κλουβιά θαλάσσης, για τη μελέτη της επίδρασης του διαφορετικού περιβάλλοντος ανάπτυξης στην εξέλιξη της μορφολογίας των ωτολίθων τους. Ο πληθυσμός προήλθε από ιδιωτικό ιχθυογεννητικό σταθμό και διαχωρίστηκε στα κλουβιά θαλάσσης μετά την ολοκλήρωση της φάσης παραγωγής γόνου. Για τον έλεγχο της επίδρασης του διαφορετικού περιβάλλοντος ανάπτυξης στην εξέλιξη του SRD εξετάστηκαν τα δείγματα από τον ερευνητικό σταθμό (§2.2.1), δείγματα από τον ιδιωτικό σταθμό, καθώς και τα δείγματα από τους διαφορετικούς κλωβούς κατά την περίοδο πάχυνσης.

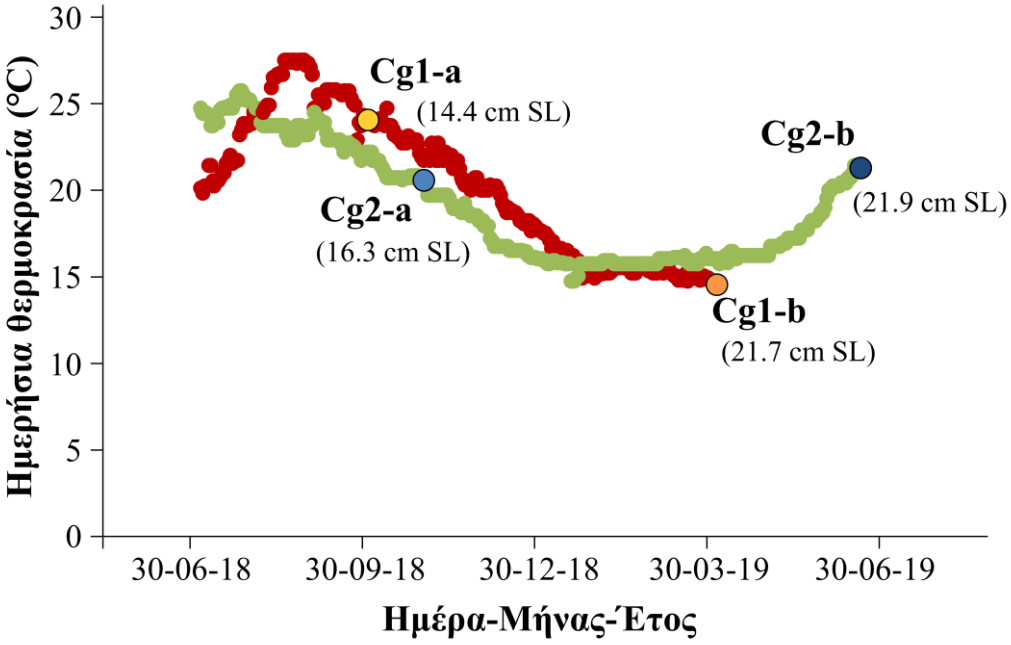
2.2.2.1 Εκτροφή πληθυσμών ιχθύων στον ιχθυογεννητικό σταθμό και στα κλουβιά πάχυνσης

Η επώαση των αυγών και η εκτροφή των νυμφών στον ιδιωτικό ιχθυογεννητικό σταθμό πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με την καθιερωμένη μεθοδολογία για το είδος (Koumoundouros *et al.* 2009, Fragkoulis *et al.* 2017). Η εκτροφή των νυμφών έγινε με αρχική πυκνότητα 100 νύμφες ανά

λίτρο, υπό την παρουσία φυτοπλαγκτού (*Chlorella sp.*), καταλήγοντας στις 5-10 νύμφες ανά λίτρο, στο τέλος της περιόδου της προπάχυνσης. Η διατροφή των νυμφών αποτελούνταν από ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς *Brachionus plicatilis* για το διάστημα 5 - 27 dph (μέρες μετά την εκκόλαψη, days post-hatching) και ναύπλιων Artemia sp. για το διάστημα 17 - 40 dph. Η χρήση ξηρής εμπορικής τροφής ξεκίνησε από τις 27 dph. Κατά την περίοδο της νυμφικής εκτροφής η θερμοκρασία του νερού κυμάνθηκε μεταξύ 19°C και 21°C, ο κορεσμός σε οξυγόνου μεταξύ 90-95% και η αλατότητα μεταξύ 35-36‰ (PSU). Ο πληθυσμός των ιχθυδίων του ιδιωτικού σταθμού στη συνέχεια διαχωρίστηκε και μεταφέρθηκε σε δύο γεωγραφικά διακριτές μονάδες εκτροφής. Η μία εδράζεται στη Δυτική (Ιόνιο Πέλαγος, Cg1) και η άλλη στην Ανατολική Ελλάδα (Αιγαίο Πέλαγος, Cg2). Κατά την περίοδο της πάχυνσης στα κλουβιά, η θερμοκρασία ακολουθούσε τις εποχικές διακυμάνσεις με 20.6 ± 4.1°C (εύρος 15-27,8°C) και 19,3 ± 3.3°C (εύρος 15-26°C) μέση θερμοκρασία για το Cg1 και το Cg2 αντίστοιχα (Εικόνα 2.3). Η πυκνότητα στα κλουβιά κυμάνθηκε από 0,3 σε 20 κιλά ανά κυβικό στο Cg1 και από 0,1 σε 10 κιλά ανά κυβικό στο Cg2.

2.2.2.2 Συλλογή και επεξεργασία δειγμάτων

Συνολικά, τρία δείγματα από τον ιδιωτικό ιχθυογεννητικό σταθμό πάρθηκαν τυχαία σε διαφορετικές ηλικίες στο διάστημα από τις 62 έως 122 ημέρες μετά την εκκόλαψη (dph). Κατά την επακόλουθη περίοδο πάχυνσης, δύο τυχαία δείγματα ψαριών πάρθηκαν από κάθε κλουβί, στη μέση και στο τέλος της παραγωγικής διαδικασίας. Έπειτα από τη συλλογή κάθε δείγματος, τα ψάρια καταψύχονταν άμεσα. Κατά την επεξεργασία των δειγμάτων στο εργαστήριο, έπειτα από την απόψυξη των ατόμων, κάθε ψάρι ηλικίας ≥122 dph, φωτογραφήθηκε με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή από την αριστερή πλευρά του και υπολογίστηκε το τυπικό του μήκος (Standard Length, SL) μέσω του λογισμικού tpsDig (Version 2.12, Rohlf [2010]). Συγκεκριμένα τοποθετήθηκαν δύο ομόλογα μορφομετρικά ορόσημα, ένα στο πρόσθιο σημείο της άνω γνάθου και ένα στο μέσο της βάσης του ουραίου πτερυγίου κάθε ψαριού. Το τυπικό μήκος υπολογίστηκε με βάση την απόσταση μεταξύ των οροσήμων καθώς και την κλίμακα της κάθε φωτογραφίας (25 cm ή 45 cm). Το τυπικό μήκος των ατόμων ηλικίας <122 dph, μετρήθηκε με χάρακα. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε κάθετη τομή στο πίσω μέρος της κεφαλής του κάθε ψαριού, για την εξαγωγή του ζεύγους των ωτολίθων του (sagittae).



Εικόνα 2.3. Ημερήσια μέτρηση της θερμοκρασίας στους κλωβούς πάχυνσης στο Ιόνιο (Cg1) και στο Αιγαίο (Cg2) πέλαγος. Cg1-a, Cg1-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg1 στις 136 και 314 ημέρες μετά την εκκόλαψη (dph) αντίστοιχα. Cg2-a, Cg2-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg2 στις 165 και 393 dph αντίστοιχα. SL: τυπικό μήκος.

2.2.2.3 Ανάλυση ωτολίθων

Η ανάλυση του σχήματος των ωτολίθων πραγματοποιήθηκε, όπως περιγράφεται στο §2.1.5. Για τον έλεγχο της επίδρασης του διαφορετικού περιβάλλοντος ανάπτυξης (Cg1, Cg2) στο σχήμα των ωτολίθων τσιπούρας κατά την περίοδο της πάχυνσης, εφαρμόστηκε ανάλυση διαχωρισμού (Discriminant analysis). Για το κάθε τεστ υπολογίστηκαν ο βαθμοί σημαντικότητας και η τιμή του Wilks' Lambda (λ). Επιπλέον, ελέγχθηκε η οντογένεση του σχήματος των ωτολίθων από το τέλος της περιόδου παραγωγής γόνου στο εκκολαπτήριο (Ht-c) έως το τέλος της περιόδου πάχυνσης στα κλουβιά (Cg1-b, Cg2-b). Σύμφωνα με τους (Rohlf and Archie 1984), με σκοπό τη μείωση των μεταβλητών που περιγράφουν τη διακύμανση του σχήματος των ωτολίθων, πραγματοποιήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (Principal component analysis, PCA) στα πολυδιάστατων δεδομένα που προέκυψαν μέσω της ελλειπτικής Fourier ανάλυσης (μη κανονικοποιημένους, ως προς το μέγεθος, συντελεστές Fourier). Θέτοντας τα δεδομένα της ανάλυσης PCA (scores of PC1-PC45) ως τη νέα μήτρα δεδομένων σχήματος (η κάθε PCs αντιπροσωπεύει ένα ποσοστό της μεταβλητότητας του σχήματος των ωτολίθων), χρησιμοποιήθηκαν οι Προκρούστειες αποστάσεις (Procrustes Distances, PDs) για την εκτίμηση των αλλαγών ολόκληρου του σχήματος. Οι PDs υπολογίστηκαν για κάθε άτομο ξεχωριστά. Για τον υπολογισμό τους, χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς, τα τριάντα ιχθύδια με το μικρότερο τυπικό μήκος (Ht-c, 5,1 ± 0,3 cm SL, 122 dph). Για τον υπολογισμό των PDs για κάθε άτομο χρησιμοποιήθηκε ο τύπος:

$$\boldsymbol{PD} = \sqrt{\sum}(\mathrm{PC}i - r\mathrm{PC}i)^2 \text{ (Zelditch 2012)},$$

όπου PCi, είναι η τιμή κάθε ατόμου για την εκάστοτε μεταβλητή PC (PC1 – PC45) και rPCi είναι η μέση τιμή PCi του δείγματος αναφοράς. Για να ελέγξουμε την επίδραση του διαφορετικού περιβάλλοντος ανάπτυξης (Cg1, Cg2) στην εξέλιξη του σχήματος των ωτολίθων από το στάδιο του ιχθυδίου έως το ενήλικο, οι Προκρούστειες αποστάσεις χρησιμοποιήθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές σε μια ανάλυση συνδιακύμανσης (ANCOVA), με το τυπικό μήκος ως ανεξάρτητο συνεχόμενο παράγοντα (SL, cm). Η ανάλυση ANCOVA πραγματοποιήθηκε μεσώ πακέτων της γλώσσας R και για τις δύο πλευρές του σώματος.

Η ανάλυση των κανονικοποιημένων τιμών μεγέθους και ασυμμετρίας των ωτολίθων ως προς την επίδραση του διαφορετικού περιβάλλοντος ανάπτυξης (Cg1, Cg2) στα άτομα τσιπούρας κατά την περίοδο της πάχυνσης, πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα §2.1.6 και §2.1.7 αντίστοιχα.

2.2.2.4 Εξέταση του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) κατά την ανάπτυξη της τσιπούρας σε διαφορετικά περιβάλλοντα εκτροφής

Ο βαθμός αναγέννησης των λεπιών εξετάστηκε την περίοδο μεταξύ του τέλους της μεταμόρφωσης (φάση όπου ολοκληρώνεται η κάλυψη του σώματος των ψαριών με λέπια) και του τέλους της πάχυνσης στα κλουβιά. Για το σκοπό αυτό, το σύνολο των δειγμάτων από τον πειραματικό (6 δείγματα) και τον εμπορικό σταθμό (3 δείγματα), καθώς και τα δείγματα των κλωβών θαλάσσης (4 δείγματα) κατά την περίοδο της πάχυνσης, εξετάστηκαν ως προς το βαθμό αναγέννησης των λεπιών. Συγκεκριμένα, ένα τυχαίο δείγμα 20 λεπιών αφαιρέθηκε από την περιοχή μεταξύ του ραχιαίου πτερυγίου και της πλευρικής γραμμής της αριστερής όψης του κάθε ψαριού με σκοπό τον υπολογισμό του βαθμού της αναγέννησής τους (scale regeneration degree, SRD). Κάθε λέπι καθαρίστηκε (με αιθανόλη 75%) και φωτογραφήθηκε πάνω σε αντικειμενοφόρο πλάκα, με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή (Lumenera’s INFINITY1-5C) προσαρμοσμένη σε στερεοσκόπιο (Olympus SZ61). Σε κάθε λέπι εξετάστηκε η παρουσία αναγεννημένου πυρήνα. Από τον αριθμό των αναγεννημένων λεπιών υπολογίστηκε ο βαθμός αναγέννησης για κάθε ψάρι (SRD, %). Επιλεκτική χρώση δείγματος λεπιών από ψάρια διαφορετικής ηλικίας πραγματοποιήθηκε με το ερυθρό της Αλιζαρίνης για τη μετέπειτα παρατήρηση της εξωτερικής μορφολογίας τους.

Για την περιγραφή της σχέσης μεταξύ του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) και του τυπικού μήκους των ψαριών (SL), χρησιμοποιήθηκε ένα μοντέλο γραμμικής παλινδρόμησης (piecewise linear regression) με ξεκάθαρο σημείο μετάβασης (inflection point), στο ρυθμό απώλειας των λεπιών (Nikolioudakis *et al.* 2010). Συγκεκριμένα το μοντέλο ήταν της μορφής:

$$\mathrm{Ln(SRD)}=b_0+b_1*\mathrm{SL}+b_2*(\mathrm{SL}-\mathrm{SL}_i)*(\mathrm{SL}\geq\mathrm{SL}_i),$$

όπου SRD και SL ο μέσος βαθμός αναγέννησης των λεπιών και το μέσο τυπικό μήκος για κάθε δείγμα, b_0 το σημείο τομής του μοντέλου στον y άξονα, b_1 και b_2 οι κλίσεις των ευθειών πριν και μετά το σημείο μετάβασης, SL_i το τυπικό μήκος στο σημείο μετάβασης.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο παρόν Κεφάλαιο παρουσιάζονται όλα τα αποτελέσματα από τη χρήση των διαφορετικών μεθόδων σε τρία υπό-κεφάλαια. Τα δύο πρώτα υπό-κεφάλαια αφορούν στον έλεγχο της δομής των φυσικών πληθυσμών τσιπούρας μέσω της ανάλυσης μορφολογικών και γενετικών χαρακτήρων, λαμβάνοντας υπόψιν το βαθμό αναγέννησης των λεπιών ως κριτήριο διάκρισης των πιθανών δραπετών ψαριών από μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας. Το τρίτο υπό-κεφάλαιο αφορά στον έλεγχο των ορίων της φαινοτυπικής διακύμανσης των ωτολίθων και των λεπιών στη τσιπούρα ως απόκριση στο περιβάλλον ανάπτυξης των πρώιμων σταδίων ή/και των ιχθυδίων και ενήλικών ατόμων.

3.1 Ταυτοποίηση φυσικών πληθυσμών τσιπούρας μέσω μορφολογικών χαρακτήρων

Στη μέθοδο για την ταυτοποίηση της δομής των φυσικών πληθυσμών τσιπούρας μέσω της χρήσης μορφολογικών χαρακτήρων χρησιμοποιήθηκε ο βαθμός αναγέννησης των λεπιών (SRD). Για τη μελέτη της πραγματικής φυσικής ποικιλομορφίας καθώς και της επίδρασης των δραπετεύσεων στη διακύμανση του φυσικού φαινοτύπου, τα δείγματα φυσικής προέλευσης διαχωρίστηκαν σε τρεις ομάδες (κατηγορίες) με βάση τα ποσοστά SRD. Στην ομάδα των άγριων ατόμων με μικρή πιθανότητα συμμετοχής δραπετών από ιχθυοκαλλιέργειες ψαριών (≤30% SRD, L30), στην ομάδα με πιθανότητα συμμετοχής δραπετών (31-60% SRD, M30-60) και στην ομάδα με υψηλή πιθανότητα συμμετοχής δραπετών (>60%, M60). Σε κάθε ομάδα των ατόμων φυσικής προέλευσης με διαφορετικά επίπεδα SRD ελέγχθηκαν οι διαφορές μεταξύ των γεωγραφικών περιοχών. Επιπλέον, εντός του κάθε δείγματος (γεωγραφικής περιοχής) ελέγχθηκαν οι διαφορές μεταξύ των υποομάδων με διαφορετικά επίπεδα SRD (για ασυμμετρία και μέγεθος ωτολίθων). Προκειμένου να διερευνηθεί η φαινοτυπική διακύμανση των ατόμων που αλιεύθηκαν στη φύση ανεξαρτήτως γεωγραφικής προέλευσης σε σχέση με τη πιθανή συμμετοχή δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας, ελέγχθηκαν οι μορφολογικές διαφορές μεταξύ των τριών ομάδων (κατηγοριών) των ατόμων φυσικής προέλευσης με διαφορετικά επίπεδα SRD και δύο δειγμάτων εκτροφής (δείγματα ελέγχου), από δύο διακριτές γεωγραφικά περιοχές.

3.1.1 Κύρια βιολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων

Ο Πίνακας 3.1 παρουσιάζει τα βιολογικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων με βάση την περιοχή προέλευσης και το βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD). Το μέσο μήκος (SL) των δειγμάτων με βάση την περιοχή προέλευσης κυμάνθηκε από 17,0 cm στη περιοχή του Μεσολογγίου έως 25,2 cm στα ψάρια εκτροφής του Βόρειου Αιγαίου. Αντίστοιχα, το μέσο ολικό βάρος (TW) κυμάνθηκε από 142,9 g στη περιοχή της Κέρκυρας έως 501,5 g στα ψάρια εκτροφής του Βόρειου Αιγαίου. Ο μέσος βαθμός αναγέννησης των λεπιών κυμάνθηκε από 27,8% στη

περιοχή του Μαλιακού έως 99,7% στα ψάρια εκτροφής του Βόρειου Αιγαίου και του Ιονίου. Στην ομάδα των ατόμων με χαμηλά επίπεδα SRD (≤30%), το μέσο μήκος κυμάνθηκε από 16,8 cm στο δείγμα του κεντρικού Ιονίου έως 18,3 cm στο δείγμα της Καλύμνου. Αντίστοιχα, το μέσο ολικό βάρος κυμάνθηκε από 136,9 g στο δείγμα της Κέρκυρας έως 186,6 g στο δείγμα του Βόρειου Αιγαίου. Στα άτομα με ενδιάμεσα επίπεδα SRD (31-60%), το μέσο μήκος κυμάνθηκε από 17,0 cm στο δείγμα του Μεσολογγίου έως 20,1 cm στο δείγμα του Βόρειου Αιγαίου. Αντίστοιχα, το μέσο ολικό βάρος κυμάνθηκε από 138,7 g στο δείγμα της Κέρκυρας έως 268,1 g στο δείγμα του Βόρειου Αιγαίου. Τέλος, στα άτομα με υψηλά επίπεδα SRD (>60%), το μέσο μήκος κυμάνθηκε από 17,0 cm στο δείγμα του Μεσολογγίου έως 20,4 cm στο δείγμα του Βόρειου Αιγαίου. Αντίστοιχα, το μέσο ολικό βάρος κυμάνθηκε από 124 g στο δείγμα του Μαλιακού έως 261,2 g στο δείγμα του Βόρειου Αιγαίου.

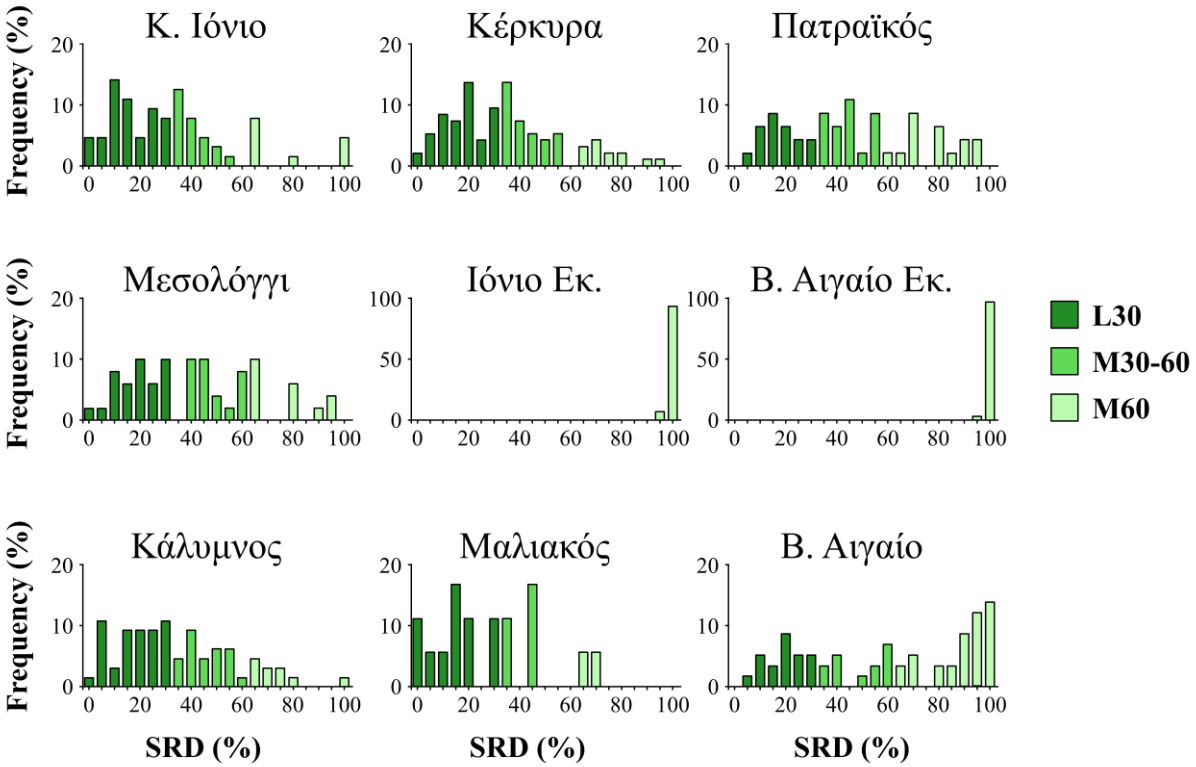
Πίνακας 3.1. Sample code, κωδικός περιοχής δειγματοληψίας, Region, περιοχή δειγματοληψίας, n, μέγεθος δείγματος ή υποομάδας, SL, μέσο τυπικό μήκος (σε cm), TW, μέσο ολικό βάρος (σε g) και SRD, μέσος βαθμός αναγέννησης λεπιών (%) των ατόμων τσιπούρας (εντός παρένθεσης δίνεται η τυπική απόκλιση κάθε μέσου όρου, SD). Δίνονται οι τιμές του συνόλου των δειγμάτων (All), καθώς και των υποομάδων κάθε δείγματος, με βάση το βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD). L30, άτομα με SRD ≤30%, M30-60, άτομα με SRD 31-60%. M60, άτομα με SRD >60%.

	Sample code	**CI**	**Cor**	**Ptr**	**Klm**	**Mal**	**NA**	**Mes**	**IR**	**NAR**
	Region	**Κ. Ιόνιο**	**Κέρκυρα**	**Πατραϊκός**	**Κάλυμνος**	**Μαλιακός**	**Β. Αιγαίο**	**Μεσολόγγι**	**Ιόνιο εκτροφής**	**Β. Αιγαίο εκτροφής**
All	**n**	64	95	46	65	18	58	50	28	30
	SL(SD)	17,4(2,2)	17,8(1,8)	18,1(1,2)	18,4(1,2)	17,9(1,7)	19,5(2,0)	17,0(0,5)	21,4(0,7)	25,2(2,0)
	TW(SD)	155,2(62,7)	142,9(49,6)	163,6(27,0)	173,0(34,6)	171,9(31,2)	240,7(67,8)	148,8(13,6)	252,0(26,4)	501,5(106,9)
	SRD	32,0(23,9)	33,3(21,3)	46,1(25,9)	34,6(22,1)	27,8(20,5)	60,4(32,4)	41,6(24,7)	99,6(1,3)	99,8(0,9)
L30	**n**	36	48	15	35	11	17	22	-	-
	SL(SD)	16,8(1,5)	17,6(1,9)	18,1(1,1)	18,3(1,2)	17,6(1,5)	17,7(2,2)	17,0(0,4)	-	-
	TW(SD)	138,7(43,5)	136,9(48,4)	164,0(30,6)	172,1(33,3)	183,7(19,7)	186,6(77,7)	148,5(11,5)	-	-
	SRD	15,8(9,2)	17,0(8,4)	17,7(7,5)	17,9(9,4)	14,5(10,4)	19,4(7,7)	18,9(8,9)	-	-
M30-60	**n**	19	34	18	21	5	12	17	-	-
	SL(SD)	17,9(2,3)	17,8(1,6)	17,6(1,4)	18,6(1,3)	18,6(2,2)	20,1(0,4)	17,0(0,5)	-	-
	TW(SD)	163,7(62,8)	138,7(36,9)	153,2(28,1)	176,3(39,0)	154,7(50,7)	268,1(25,0)	149,7(17,1)	-	-
	SRD	40,5(6,2)	41,0(7,8)	45,3(8,1)	45,7(7,6)	41,0(5,5)	49,2(10,4)	48,2(7,9)	-	-
M60	**n**	9	13	13	9	2	29	11	28	30
	SL(SD)	19,0(3,4)	19,0(2,1)	18,7(0,4)	18,3(0,9)	17,5(2,4)	20,4(1,5)	17,0(0,6)	21,4(0,7)	25,2(2,0)
	TW(SD)	203,2(99,4)	176,1(70,5)	177,7(12,6)	168,7(31,5)	124(-)	261,2(55,9)	148,3(12,4)	252,0(26,4)	501,5(106,9)
	SRD	78,3(17,0)	73,5(10,4)	80,0(10,4)	73,6(11,5)	67,5(3,5)	89,1(11,4)	76,8(12,5)	99,6(1,3)	99,8(0,9)

3.1.2 Ανάλυση του βαθμού αναγέννησης λεπιών (SRD)

Όλα τα άτομα των δειγμάτων ελέγχου (εκτροφής) εμφάνισαν επίπεδα SRD ≥95% (Εικόνα 3.1). Στα δείγματα φυσικής προέλευσης, το ποσοστό των ατόμων με χαμηλά επίπεδα SRD (≤30%) κυμάνθηκε από 61% στη δείγμα του Μαλιακού έως 29,3% στο δείγμα του Β. Αιγαίου. Το ποσοστό των ατόμων με ενδιάμεσα επίπεδα SRD (31-60%) κυμάνθηκε από 20,7% στο δείγμα του Β. Αιγαίου έως 39,1% στο δείγμα του Πατραϊκού. Αντίστοιχα, το ποσοστό των ατόμων με υψηλά επίπεδα SRD (>60%) κυμάνθηκε από 11,1% στο δείγμα του Μαλιακού έως 50% στο δείγμα του Β. Αιγαίου. Με βάση τα παραπάνω, το δείγμα του Β. Αιγαίου παρουσίασε το μεγαλύτερο μέσο βαθμό αναγέννησης λεπιών μεταξύ των δειγμάτων φυσικής προέλευσης (60,4%, Πίνακας 3.1). Το γεγονός

αυτό αποδίδεται αφενός στο μικρό ποσοστό ατόμων με χαμηλό SRD και αφετέρου στο πολύ υψηλό ποσοστό ατόμων (34,5%) με βαθμό αναγέννησης κοντά στα επίπεδα των ενήλικων εκτρεφόμενων ατόμων (>90%, Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1. Κατανομή συχνοτήτων του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD, %) στα δείγματα των διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών. Η ένταση του χρώματος σε κάθε κατανομή αντιστοιχεί στις διαφορετικές κατηγορίες των ατόμων με βάση το SRD (L30 ή ≤30%, M30-60 ή 31-60%, M60 ή >60%).

3.1.3 Σχέση της περιοχής και του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) με το σχήμα των ωτολίθων των ατόμων φυσικής προέλευσης

Το σχήμα των ωτολίθων παρουσίασε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων ψαριών φυσικής προέλευσης και για τις δύο πλευρές του σώματος (PERMANOVA, $p<0,01$) (Πίνακας 3.2). Σημαντική ήταν και η διαφοροποίηση μεταξύ των υποομάδων ψαριών φυσικής προέλευσης με βάση τη γεωγραφική προέλευση και το SRD και για τις δύο πλευρές του σώματος ($p<0,05$). Τέλος, δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση και για τις δύο σωματικές πλευρές μεταξύ των ομάδων ψαριών με διαφορετικά επίπεδα SRD, ανεξάρτητα της γεωγραφικής προέλευσης των ατόμων ($p>0,05$) (Πίνακας 3.2).

Οι διαφορές στο σχήμα των ωτολίθων μεταξύ των ψαριών των διαφορετικών γεωγραφικών ομάδων εξετάστηκαν ανά κατηγορία βαθμού αναγέννησης λεπιών (SRD ήταν ο χαρακτήρας που χρησιμοποιήθηκε για τη διάκριση των εν δυνάμει δραπετών). Για την παραπάνω ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος CAP. Στην ομάδα των άγριων ατόμων (L30), και για τις δύο πλευρές του σώματος, οι γεωγραφικές υποομάδες διαφοροποιήθηκαν σύμφωνα με τη γεωγραφική τους

κατανομή και διακρίθηκαν στις γεωγραφικές ομάδες του Αιγαίου (Klm, Mal, NA), του Ιονίου (CI, Cor, Ptr) και της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου (Mal) (Εικόνα 3.2). Κατά μήκος του άξονα CAP1 υπήρξε διάκριση μεταξύ των ομάδων του Αιγαίου και του Ιονίου (συμπεριλαμβανομένης και της λιμνοθάλασσας, Mes) (Πίνακας 3.3). Κατά μήκος του άξονα CAP2 διαφοροποιήθηκε η υποομάδα της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου (Mes) από τις υπόλοιπες υποομάδες του Ιονίου. Για την αριστερή πλευρά, η επιλογή του m=42 (αριθμός αξόνων της ανάλυσης PCO της CAP, βλέπε §2.1.2) έγινε με βάση τη μέγιστη ορθή κατηγοριοποίηση των ατόμων στις αρχικές τους υποομάδες (=58,4% misclassification error). Η ανάλυση της CAP εμφάνισε στατιστικά σημαντική επαναληψιμότητα και η συσχέτιση του πρώτου άξονα με τα πολυπαραγοντικά δεδομένα σχήματος ήταν δ_1=0,827 (trace statistic=2,564, p<0,001, d_1^2=0,685, p<0,001). Παρόμοια για τους δεξιούς ωτόλιθους, η επιλογή του m=21 έγινε με βάση τη μέγιστη ορθή κατηγοριοποίηση των ατόμων στις αρχικές τους υποομάδες (=63,4% misclassification error). Η ανάλυση της CAP εμφάνισε στατιστικά σημαντική επαναληψιμότητα και η συσχέτιση του πρώτου άξονα με τα πολυπαραγοντικά δεδομένα σχήματος ήταν δ_1=0,642 (trace statistic=1,321, p<0,001, d_1^2=0,413, p<0,001). Οι ανά ζεύγη συγκρίσεις μεταξύ των γεωγραφικών υποομάδων αποκάλυψαν σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ Αιγαίου και Ιονίου, με εξαίρεση την υποομάδα του Πατραϊκού (Ptr) για την αριστερή και του Πατραϊκού και της Καλύμνου (Klm) για τη δεξιά πλευρά του σώματος (Πίνακας 3.4, Πίνακας 3.5). Η περιοχή του Μεσολογγίου (Mes) διαφοροποιήθηκε σημαντικά από όλες τις υπόλοιπες ομάδες και για τις δύο πλευρές του σώματος.

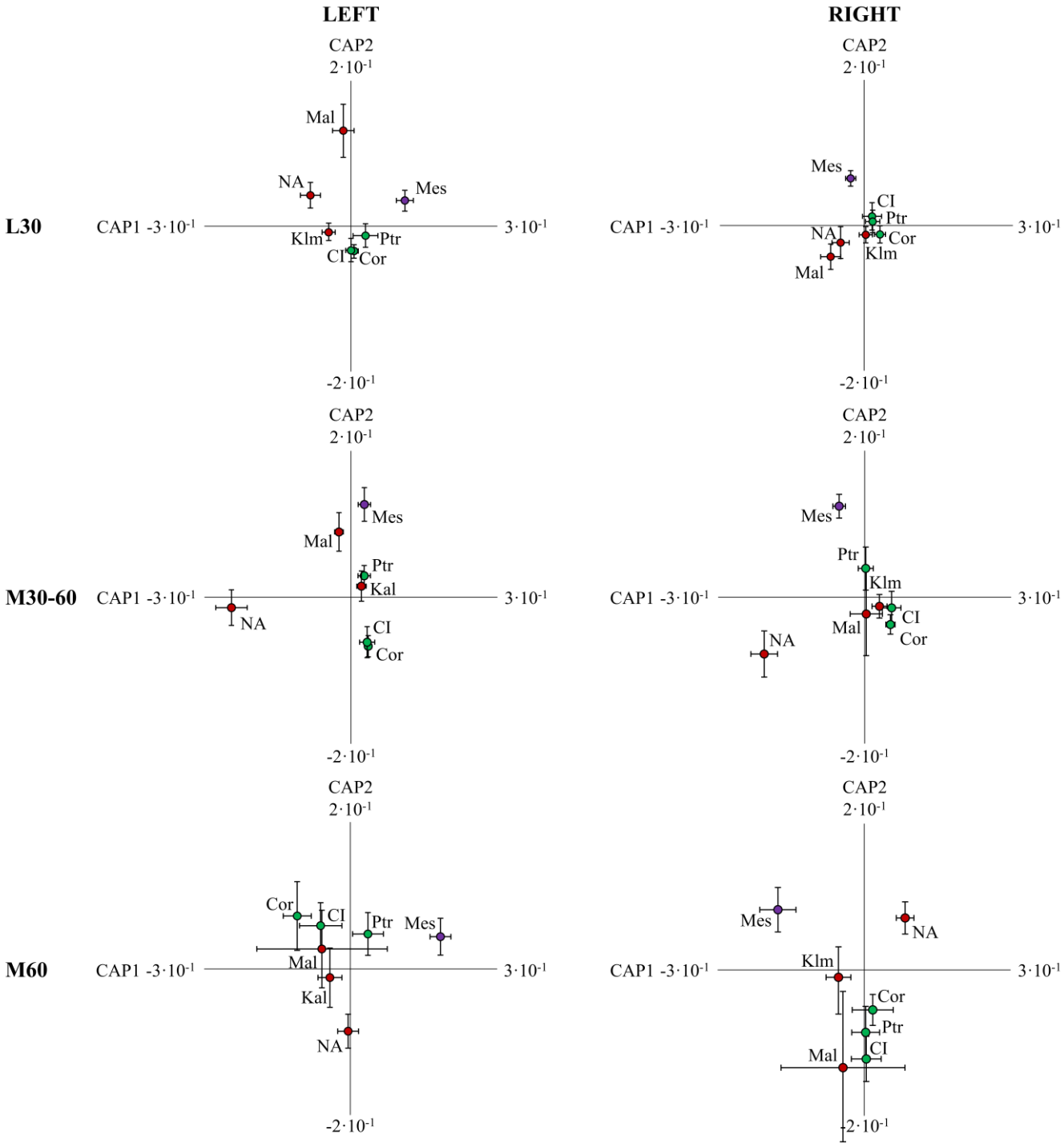
Στην ομάδα με πιθανότητα συμμετοχής δραπετών ψαριών (M30-60) οι γεωγραφικές υποομάδες δεν διακρίθηκαν με βάση τη γεωγραφική τους κατανομή και για τις δύο πλευρές του σώματος (Εικόνα 3.2). Στους δύο πρώτους άξονες της CAP (Πίνακας 3.3), έντονη διαφοροποίηση παρουσίασε η υποομάδα του Β. Αιγαίου (NA) (κατά μήκος του άξονα CAP1) και η υποομάδα του Μεσολογγίου (Mes) (κατά μήκος του άξονα CAP2) από τις υπόλοιπες, και για τις δύο πλευρές του σώματος. Στην περίπτωση των αριστερών ωτολίθων, η επιλογή του m=36 έγινε με βάση τη μέγιστη ορθή κατηγοριοποίηση των ατόμων στις αρχικές τους υποομάδες (=52,1% misclassification error). Η ανάλυση της CAP εμφάνισε στατιστικά σημαντική επαναληψιμότητα και η συσχέτιση του πρώτου άξονα με τα πολυπαραγοντικά δεδομένα σχήματος ήταν δ_1=0,948 (trace statistic=3,267, p<0,001, d_1^2=0,899, p<0,001). Παρόμοια για τους δεξιούς ωτόλιθους, η επιλογή του m=28 έγινε με βάση τη μέγιστη ορθή κατηγοριοποίηση των ατόμων στις αρχικές τους υποομάδες (=42,5% misclassification error). Η ανάλυση της CAP εμφάνισε στατιστικά σημαντική επαναληψιμότητα και η συσχέτιση του πρώτου άξονα με τα πολυπαραγοντικά δεδομένα σχήματος ήταν δ_1=0,920 (trace statistic=2,929, p<0,001, d_1^2=0,845, p<0,001). Οι ανά ζεύγη συγκρίσεις, και για τις δυο

πλευρές του σώματος, αποκάλυψαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των γεωγραφικών υποομάδων, οι οποίες όμως δεν ήταν ανάλογες των μεταξύ τους γεωγραφικών αποστάσεων (Πίνακας 3.4, Πίνακας 3.5).

Στην ομάδα με υψηλή πιθανότητα συμμετοχής δραπετών ψαριών (M60), δεν παρατηρήθηκε ξεκάθαρη γεωγραφική διαφοροποίηση μεταξύ των γεωγραφικών υποομάδων ενώ αυξήθηκε η διακύμανση του σχήματος των ωτολίθων εντός της κάθε υποομάδας (Εικόνα 3.2). Στους δύο πρώτους άξονες της CAP (Πίνακας 3.3), έντονη διαφοροποίηση παρουσίασε η υποομάδα του Μεσολογγίου (Mes) (κατά μήκος του άξονα CAP1) (Εικόνα 3.2). Στην περίπτωση των αριστερών ωτολίθων, η επιλογή του m=21 έγινε με βάση τη μέγιστη ορθή κατηγοριοποίηση των ατόμων στις αρχικές τους υποομάδες (=53,8% misclassification error). Η ανάλυση της CAP εμφάνισε στατιστικά σημαντική επαναληψιμότητα και η συσχέτιση του πρώτου άξονα με τα πολυπαραγοντικά δεδομένα σχήματος ήταν δ_1=0,857 (trace statistic=2,555, p<0,001, d_1^2=0,735, p<0,001). Παρόμοια για τους δεξιούς ωτόλιθους, η επιλογή του m=27 έγινε με βάση τη μέγιστη ορθή κατηγοριοποίηση των ατόμων στις αρχικές τους υποομάδες (=42.9% misclassification error). Η ανάλυση της CAP εμφάνισε στατιστικά σημαντική επαναληψιμότητα και η συσχέτιση του πρώτου άξονα με τα πολυπαραγοντικά δεδομένα σχήματος ήταν δ_1=0,864 (trace statistic=3,158, p<0,001, d_1^2=0,746, p<0,001). Οι ανά ζεύγη συγκρίσεις δεν αποκάλυψαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των υποομάδων στην πλειονότητα των περιπτώσεων με κύρια εξαίρεση την υποομάδα του Μεσολογγίου (Mes), η οποία διαφοροποιήθηκε από τις υπόλοιπες, και για τις δυο πλευρές του σώματος (Πίνακας 3.4, Πίνακας 3.5).

Πίνακας 3.2. Αποτελέσματα ανάλυσης PERMANOVA για τον έλεγχο των διαφορών στο σχήμα των ωτολίθων στα δείγματα ψαριών φυσικής προέλευσης. Region, περιοχή δειγματοληψίας. SRD, βαθμός αναγέννησης των λεπιών. Πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστές δοκιμές για την κάθε πλευρά του σώματος (Left-Right). Αριθμός επαναλήψεων: 9,999.

Otolith	Source	Type III sum of squares	d.f.	Mean squares	Pseudo-F	*P*(perm)
Left	Region	0,041	6	0,007	4,005	<0,001
	SRD	0,003	2	0,003	0,907	0,491
	Region:SRD	0,029	12	0,002	1,390	<0,05
	Residuals	0,598	349	0,002		
	Total	0,681	369			
Right	Region	0,068	6	0,011	4,982	<0,01
	SRD	0,004	2	0,002	0,854	0,58
	Region:SRD	0,040	12	0,003	1,466	<0,01
	Residuals	0,799	351	0,002		
	Total	0,914	371			



Εικόνα 3.2. Επίδραση της περιοχής προέλευσης στο σχήμα των ωτολίθων (Left-Right) άγριων ατόμων τσιπούρας. Οι υποδιαιρέσεις των δειγμάτων (υποομάδες) έχουν γίνει με βάση τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD). L30, άτομα με SRD ≤30%. M30-60, άτομα με SRD 31-60%. M60, άτομα με SRD >60%. CI, Κ. Ιόνιο, Cor, Κέρκυρα, Ptr, Πατραϊκός, Mes, Μεσολόγγι, Klm, Κάλυμνος, Mal, Μαλιακός, NA, Β. Αιγαίο. Δίνεται η μέση τιμή (±2SE) για τους δύο πρώτους άξονες της CAP (CAP1-CAP2).

Πίνακας 3.3. Μέσες τιμές των διαφορετικών γεωγραφικών υποομάδων κατά μήκος των αξόνων CAP1-CAP2 για το σχήμα των ωτολίθων. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60%, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. Δίνεται το ποσοστό αντιπροσώπευσης της διακύμανσης του σχήματος (δ_1) για τον κάθε άξονα. Πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστές δοκιμές για την κάθε πλευρά του σώματος (Αριστερά-Δεξιά).

Αριστερά

	REGION	CAP1	CAP2
L30	Κεντρικό Ιόνιο (CI)	0,000	-0,033
	Κέρκυρα (Cor)	0,007	-0,034
	Πατραϊκός (Ptr)	0,030	-0,013
	Μεσολόγγι (Mes)	0,110	0,035
	Κάλυμνος (Klm)	-0,044	-0,008
	Μαλιακός (Mal)	-0,015	0,132
	Βόρειο Αιγαίο (NA)	-0,083	0,043
	Canonical correlation (δ1)	0,827	0,763
M30-60	REGION	CAP1	CAP2
	Κεντρικό Ιόνιο (CI)	0,033	-0,061
	Κέρκυρα (Cor)	0,036	-0,066
	Πατραϊκός (Ptr)	0,027	0,030
	Μεσολόγγι (Mes)	0,028	0,128
	Κάλυμνος (Klm)	0,021	0,016
	Μαλιακός (Mal)	-0,024	0,090
	Βόρειο Αιγαίο (NA)	-0,244	-0,013
	Canonical correlation (δ1)	0,948	0,854
M60	REGION	CAP1	CAP2
	Κεντρικό Ιόνιο (CI)	-0,061	0,059
	Κέρκυρα (Cor)	-0,109	0,072
	Πατραϊκός (Ptr)	0,036	0,048
	Μεσολόγγι (Mes)	0,184	0,044
	Κάλυμνος (Klm)	-0,042	-0,011
	Μαλιακός (Mal)	-0,058	0,028
	Βόρειο Αιγαίο (NA)	-0,005	-0,085
	Canonical correlation (δ1)	0,858	0,759

Δεξιά

	REGION	CAP1	CAP2
L30	Κεντρικό Ιόνιο (CI)	0,017	0,008
	Κέρκυρα (Cor)	0,032	-0,012
	Πατραϊκός (Ptr)	0,016	0,011
	Μεσολόγγι (Mes)	-0,029	0,065
	Κάλυμνος (Klm)	0,002	-0,012
	Μαλιακός (Mal)	-0,069	-0,043
	Βόρειο Αιγαίο (NA)	-0,050	-0,023
	Canonical correlation (δ1)	0,642	0,608
M30-60	REGION	CAP1	CAP2
	Κεντρικό Ιόνιο (CI)	0,055	-0,014
	Κέρκυρα (Cor)	0,054	-0,037
	Πατραϊκός (Ptr)	0,002	0,038
	Μεσολόγγι (Mes)	-0,052	0,124
	Κάλυμνος (Klm)	0,030	-0,012
	Μαλιακός (Mal)	0,004	-0,022
	Βόρειο Αιγαίο (NA)	-0,205	-0,078
	Canonical correlation (δ1)	0,920	0,802
M60	REGION	CAP1	CAP2
	Κεντρικό Ιόνιο (CI)	0,004	-0,122
	Κέρκυρα (Cor)	0,017	-0,055
	Πατραϊκός (Ptr)	0,003	-0,087
	Μεσολόγγι (Mes)	-0,177	0,083
	Κάλυμνος (Klm)	-0,053	-0,014
	Μαλιακός (Mal)	-0,044	-0,134
	Βόρειο Αιγαίο (NA)	0,082	0,071
	Canonical correlation (δ1)	0,864	0,830

Πίνακας 3.4. Αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA για τη σημαντικότητα των διαφορών στο σχήμα των αριστερών ωτολίθων μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών υποομάδων. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. CI, K. Ιόνιο, Cor, Κέρκυρα, Ptr, Πατραϊκός, Mes, Μεσολόγγι Klm, Κάλυμνος Mal, Μαλιακός NA, B. Αιγαίο. Αριθμός επαναλήψεων 9,999. ns: P (perm) >0,05, *: P (perm) <0,05, ** P (perm) <0,01, *** P (perm) <0,001

L30	CI	Cor	Ptr	Klm	Mal	NA	Mes
CI		ns	Ns	*	**	**	**
Cor	0,0549		*	**	**	**	***
Ptr	0,0567	0,0572		ns	ns	ns	*
Klm	0,0569	0,0571	0,0576		ns	ns	***
Mal	0,0601	0,0594	0,0572	0,0568		ns	**
NA	0,0599	0,0602	0,0585	0,0573	0,0571		***
Mes	0,0596	0,0598	0,0589	0,0636	0,0641	0,0640	

M30-60	CI	Cor	Ptr	Klm	Mal	NA	Mes
CI		*	**	ns	**	**	***
Cor	0,0557		*	ns	*	*	**
Ptr	0,0569	0,0564		ns	*	ns	ns
Klm	0,0561	0,0565	0,0547		*	ns	ns
Mal	0,0762	0,0688	0,0673	0,0699		ns	*
NA	0,0676	0,0645	0,0631	0,0651	0,0715		ns
Mes	0,0590	0,0585	0,0528	0,0561	0,0688	0,0646	

M60	CI	Cor	Ptr	Klm	Mal	NA	Mes
CI		ns	ns	ns	*	*	**
Cor	0,0683		ns	ns	*	*	***
Ptr	0,0626	0,0599		ns	ns	ns	**
Klm	0,0689	0,0663	0,0618		*	ns	***
Mal	0,0611	0,0670	0,0590	0,0701		ns	**
NA	0,0607	0,0605	0,0521	0,0607	0,0552		*
Mes	0,0621	0,0617	0,0522	0,0616	0,0588	0,0510	

Πίνακας 3.5: Αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA για τη σημαντικότητα των διαφορών στο σχήμα των δεξιών ωτολίθων μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών υποομάδων. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. Αριθμός επαναλήψεων 9,999. ns: p (perm) >0,05, *: p (perm) <0,05, **: p (perm) <0,01, ***: p (perm) <0,001

L30	CI	Cor	Ptr	Klm	Mal	NA	Mes
CI		ns	ns	ns	*	*	**
Cor	0,0631		ns	ns	*	*	***
Ptr	0,0610	0,0632		ns	ns	ms	**
Klm	0,0622	0,0644	0,0613		*	ns	***
Mal	0,0649	0,0670	0,0611	0,0642		ns	**
NA	0,0664	0,0685	0,0641	0,0659	0,0644		*
Mes	0,0604	0,0621	0,0593	0,0626	0,0641	0,0642	

M30-60	CI	Cor	Ptr	Klm	Mal	NA	Mes
CI		ns	*	ns	**	***	**
Cor	0,0644		**	ns	**	***	***
Ptr	0,0630	0,0633		ns	**	***	ns
Klm	0,0627	0,0625	0,0602		**	***	*
Mal	0,0772	0,0710	0,0677	0,0718		ns	ns
NA	0,0864	0,0816	0,0784	0,0802	0,0745		**
Mes	0,0698	0,0686	0,0602	0,0653	0,0674	0,0782	

M60	CI	Cor	Ptr	Klm	Mal	NA	Mes
CI		ns	ns	ns	ns	*	**
Cor	0,0707		ns	ns	ns	ns	*
Ptr	0,0759	0,0799		ns	ns	*	**
Klm	0,0695	0,0736	0,0783		ns	ns	ns
Mal	0,0773	0,0768	0,0809	0,0663		na	ns
NA	0,0731	0,0753	0,0773	0,0689	0,0684		ns
Mes	0,0750	0,0767	0,0763	0,0680	0,0667	0,0671	

3.1.4 Σχέση της περιοχής και του βαθμού αναγέννησης λεπιών (SRD) με την ασυμμετρία και το μέγεθος των ωτολίθων των ατόμων φυσικής προέλευσης

Ο έλεγχος της ασυμμετρίας για το δείκτη FA_1 αποκάλυψε σημαντική επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης στα δείγματα ψαριών άγριας συλλογής σε τρεις από τους 11 μορφολογικούς χαρακτήρες, οι οποίοι εμφάνισαν κυμαινόμενη ασυμμετρία (επιφάνεια) και αντισυμμετρία (περίμετρος, αρμονική 2) ($p<0,05$, Bartlett test). Σημαντική ήταν επίσης η διαφοροποίηση μεταξύ των υποομάδων ψαριών φυσικής προέλευσης με βάση τη γεωγραφική περιοχή και το SRD ως προς την περίμετρο και την αρμονική 2 ($p<0,01$). Εντούτοις, στις διαφορετικές ομάδες των ατόμων φυσικής προέλευσης με βάση το SRD (L30, M30-60, M60), η ασυμμετρία δεν διέκρινε τις γεωγραφικές υποομάδες με βάση τη γεωγραφική τους κατανομή (Πίνακας $Π_{1.1}$, Παράρτημα 1).

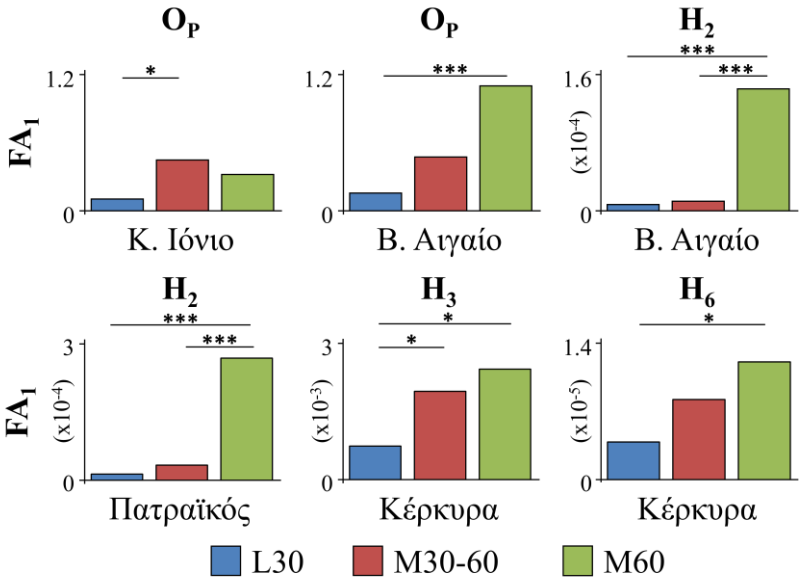
Ο έλεγχος της ασυμμετρίας εντός του κάθε δείγματος (γεωγραφικής περιοχής) μεταξύ των ατόμων (υποομάδων) με διαφορετικά επίπεδα SRD, αποκάλυψε σημαντικά μεγαλύτερη κυμαινόμενη ασυμμετρία (FA) και αντισυμμετρία (Ant) των ατόμων με υψηλό SRD (M60), για χαρακτήρες μεγέθους (περίμετρος) και σχήματος (αρμονικές 2, 3 και 6) στις περιοχές του Βόρειου Αιγαίου, του Πατραϊκού και της Κέρκυρας (Εικόνα 3.3). Τέλος, στο σύνολο των ατόμων φυσικής προέλευσης και ανεξάρτητα γεωγραφικής περιοχής, ο έλεγχος της ασυμμετρίας μεταξύ των διαφορετικών ομάδων ψαριών με βάση το SRD έδειξε μεγαλύτερα επίπεδα ασυμμετρίας στα M60 ως προς την επιφάνεια (κυμαινόμενη ασυμμετρία, FA), την περίμετρο (αντισυμμετρία, Ant) και τις αρμονικές 2 (Ant), 4 (κατευθυνόμενη ασυμμετρία, DA) και 6 (DA) (Εικόνα 3.4).

Ο έλεγχος της ασυμμετρίας για το δείκτη FA_2 δεν αποκάλυψε σημαντική διαφοροποίηση με βάση τη γεωγραφική προέλευση και τα επίπεδα SRD για τους υπό εξέταση μορφολογικούς δείκτες ($p>0,05$, MANOVA & Kruskal Wallis tests) (Πίνακας $Π_{1.2}$, Παράρτημα 1).

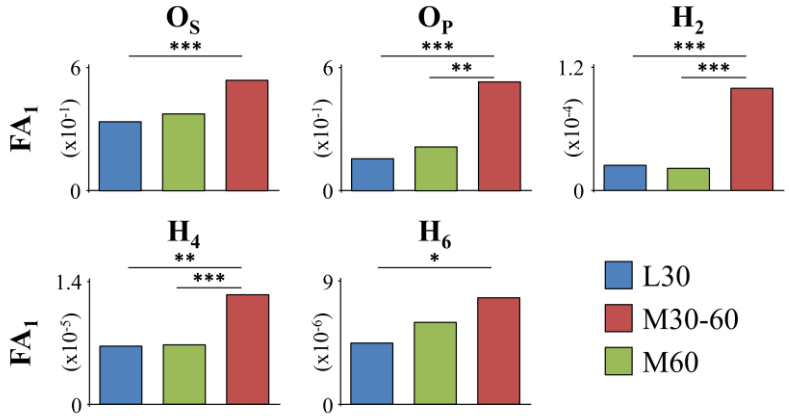
Η πολλαπλή ανάλυση διασποράς (MANOVA) έδειξε σημαντική επίδραση της γεωγραφικής προέλευσης στις κανονικοποιημένες μεταβλητές μεγέθους των (αριστερών και δεξιών) ωτολίθων των δειγμάτων άγριας συλλογής ($p<0,001$) (Πίνακας 3.6). Σημαντική επίσης διαφοροποίηση προέκυψε μεταξύ των υποομάδων ψαριών φυσικής προέλευσης με βάση την περιοχή και το SRD ($p<0,01$) (Πίνακας 3.6). Εντούτοις, στις διαφορετικές ομάδες των ατόμων φυσικής προέλευσης με βάση το SRD (L30, M30-60, M60), δεν υπήρξε διάκριση ως προς τις κανονικοποιημένες τιμές μεγέθους σύμφωνα με τη γεωγραφική προέλευση των υποομάδων (Πίνακας $Π_2$, Παράρτημα 2).

Ο έλεγχος των κανονικοποιημένων τιμών μεγέθους εντός του κάθε δείγματος (γεωγραφικής περιοχής) μεταξύ των υποομάδων με διαφορετικά επίπεδα SRD, αποκάλυψε σημαντικά μεγαλύτερη επιφάνεια (O_S*) και μέγιστο μήκος (O_L*) ωτολίθων στα άτομα του Β. Αιγαίου με

υψηλά επίπεδα SRD (M60) συγκριτικά με τα άγρια άτομα (L30), και για τις δύο πλευρές του σώματος (Εικόνα 3.5). Τέλος, δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων ψαριών με διαφορετικά επίπεδα SRD, ανεξάρτητα της γεωγραφικής τους προέλευσης (p>0,05) (Πίνακας 3.6).



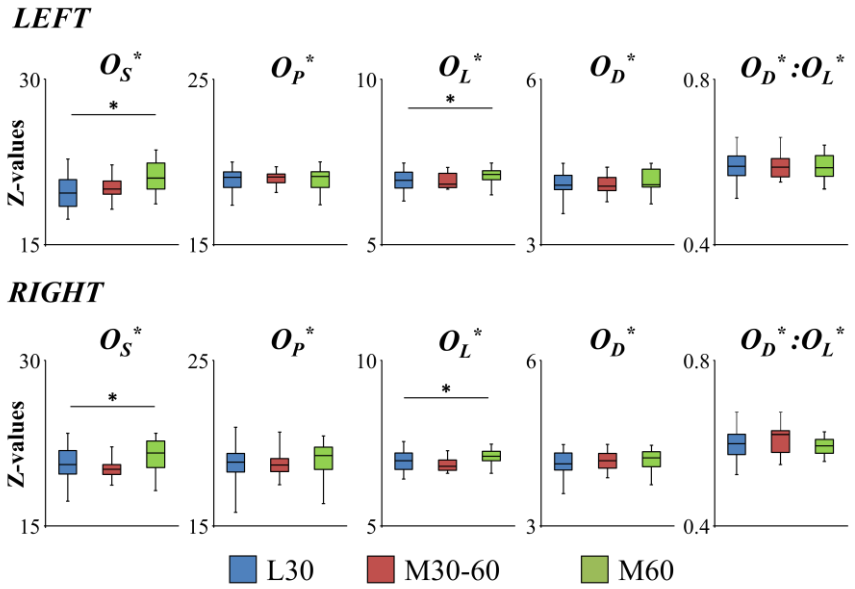
Εικόνα 3.3. Δείκτης ασυμμετρίας (FA_1) των ωτολίθων των υποομάδων τσιπούρας με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) εντός των διαφορετικών γεωγραφικών δειγμάτων. L30, άτομα με SRD ≤30%. M30-60, άτομα με SRD 31-60%. M60, άτομα με SRD >60%. O_P: περίμετρος, H_2, H_3, H_6: αρμονικές 2, 3, 6. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων συμβολίζεται με *(p<0,05), ***(p<0,001).



Εικόνα 3.4. Δείκτης ασυμμετρίας (FA_1) των ωτολίθων των ομάδων τσιπούρας με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) ανεξάρτητα της γεωγραφικής προέλευσης. L30, άτομα με SRD ≤30%. M30-60, άτομα με SRD 31-60%. M60, άτομα με SRD >60%. O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, H_2, H_4, H_6: αρμονικές 2, 4, 6. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων συμβολίζεται με *(p<0,05), ** (p<0,01), ***(p<0,001).

Πίνακας 3.6. Αποτελέσματα πολλαπλής ανάλυσης διασποράς (MANOVA) για τον έλεγχο των διαφορών ως προς το σύνολο των κανονικοποιημένων μεταβλητών σχήματος των (αριστερών & δεξιών) ωτολίθων στα δείγματα ψαριών φυσικής προέλευσης. Region: Περιοχή δειγματοληψίας, SRD: βαθμός αναγέννησης των λεπιών.

Two-way MANOVA	Test	Value	DF	Error	F	P-value
Intercept	Wilks λ'	0,000	10	326,000	3,729,058,503	<0,001
REGION	Wilks λ'	0,416	60	1713,071	5,200	<0,001
SRD	Wilks λ'	0,925	20	652,000	1,302	0,170
REGION*SRD	Wilks λ'	0,612	120	2544,841	1,383	<0,01



Εικόνα 3.5. Box plots (—, διάμεσος; □, 25 and 75% εκατοστημόρια; I, υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές) των κανονικοποιημένων τιμών των μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους ωτολίθου (Z-values) για τα άτομα τσιπούρας του Β. Αιγαίου με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD). L30, άτομα με SRD ≤30%. M30-60, άτομα με SRD 31-60%. M60, >60%. O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος. *: p <0,05

3.1.5 Σχέση της περιοχής και του βαθμού αναγέννησης λεπιών (SRD) με το σχήμα του σώματος των ατόμων φυσικής προέλευσης

Το σχήμα του σώματος παρουσίασε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων ψαριών φυσικής προέλευσης (PERMANOVA, p<0,001) (Πίνακας 3.7). Σημαντική διαφοροποίηση παρουσιάστηκε και μεταξύ των υποομάδων ψαριών φυσικής προέλευσης με βάση τη γεωγραφική περιοχή και το SRD (p<0,001). Τέλος, υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων ψαριών με διαφορετικά επίπεδα SRD, ανεξάρτητα της γεωγραφικής προέλευσης των ατόμων (p<0,05) (Πίνακας 3.7).

Οι διαφορές στο σχήμα του σώματος μεταξύ των ψαριών των διαφορετικών γεωγραφικών ομάδων εξετάστηκαν ανά κατηγορία βαθμού αναγέννησης λεπιών (SRD) μέσω της μεθόδου CAP. Στην ομάδα των άγριων ατόμων (L30) οι υποομάδες διαφοροποιήθηκαν (οριακά) σύμφωνα με τη γεωγραφική τους κατανομή και διακρίθηκαν στις γεωγραφικές ομάδες του Αιγαίου (Klm, Mal, NA), του Ιονίου (CI, Cor ,Ptr) και της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου (Mes) (Εικόνα 3.6). Κατά μήκος του άξονα CAP1 υπήρξε οριακή διάκριση μεταξύ των ομάδων του Αιγαίου και του Ιονίου

(Πίνακας 3.8). Η υποομάδα του Μεσολογγίου διακρίθηκε από το Ιόνιο κατά μήκος του CAP1 και από το Αιγαίο κατά μήκος του CAP2 (Πίνακας 3.8, Εικόνα 3.6). Η επιλογή του m=24 (αριθμός αξόνων της ανάλυσης PCO της CAP, βλέπε §2.1.2) έγινε με βάση τη μέγιστη ορθή κατηγοριοποίηση των ατόμων στις αρχικές τους υποομάδες (=29,9% misclassification error). Η ανάλυση της CAP εμφάνισε στατιστικά σημαντική επαναληψιμότητα και η συσχέτιση του πρώτου άξονα με τα πολυπαραγοντικά δεδομένα σχήματος ήταν δ_1=0,857 (trace statistic=2,597, p<0,001, d_1^2=0,735, p<0,001). Οι ανά ζεύγη συγκρίσεις αποκάλυψαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ όλων των γεωγραφικών υποομάδων (Πίνακας 3.9).

Στην ομάδα με πιθανότητα συμμετοχής δραπετών ψαριών (M30-60), οι υποομάδες δεν διακρίθηκαν με βάση τη γεωγραφική τους κατανομή (Εικόνα 3.6). Κατά μήκος του άξονα CAP1, έντονη διαφοροποίηση παρουσίασαν οι υποομάδες του Κ. Ιονίου (CI) και της Κέρκυρας (Cor) από τις υπόλοιπες (Πίνακας 3.8). Κατά μήκος του CAP2, οι υποομάδες του Μαλιακού (Mal), της Καλύμνου (Kal) και του Κ. Ιονίου (CI) διακρίθηκαν από τις υπόλοιπες (Πίνακας 3.8, Εικόνα 3.6). Η επιλογή του m=24 έγινε με βάση τη μέγιστη ορθή κατηγοριοποίηση των ατόμων στις αρχικές τους υποομάδες (=29,4% misclassification error). Η ανάλυση της CAP εμφάνισε στατιστικά σημαντική επαναληψιμότητα και η συσχέτιση του πρώτου άξονα με τα πολυπαραγοντικά δεδομένα σχήματος ήταν δ_1=0,857 (trace statistic=2,877, p<0,001, d_1^2=0,799, p<0,001). Οι ανά ζεύγη συγκρίσεις αποκάλυψαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ όλων των γεωγραφικών υποομάδων με εξαίρεση τη διάκριση μεταξύ Καλύμνου (Klm) και Μαλιακού (Mal) (Πίνακας 3.9).

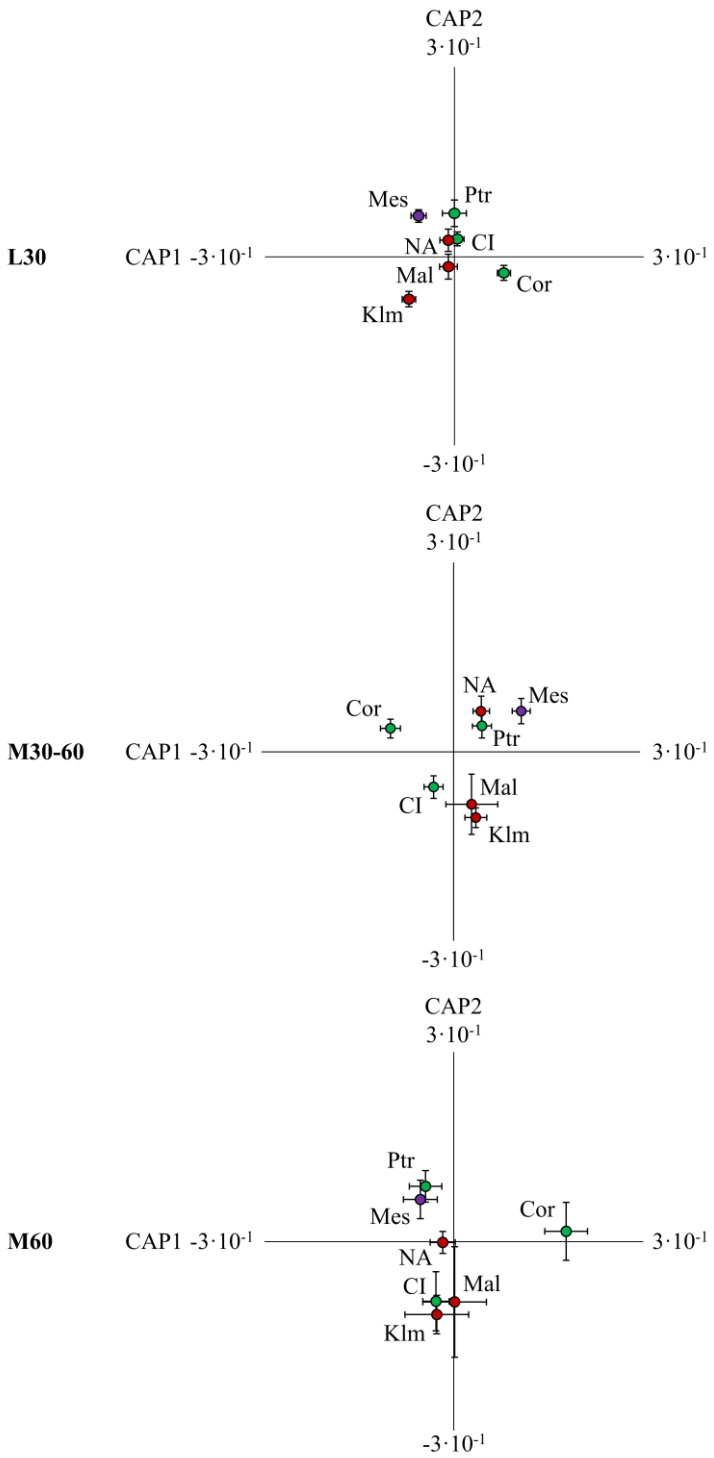
Στην ομάδα με υψηλή πιθανότητα συμμετοχής δραπετών ψαριών (M60), οι γεωγραφικές υποομάδες δεν διακρίθηκαν με βάση τη γεωγραφική τους κατανομή ενώ αυξήθηκε η διακύμανση του σχήματος του σώματος εντός της κάθε υποομάδας (Εικόνα 3.6) Στους δύο πρώτους άξονες της CAP, έντονη διαφοροποίηση παρουσίασε η υποομάδα της Κέρκυρας (Cor) (κατά μήκος του άξονα CAP1) και οι υποομάδες Πατραϊκού (Ptr) και Μεσολογγίου (Mes) (κατά μήκος του άξονα CAP2) από τις υπόλοιπες (Πίνακας 3.8, Εικόνα 3.6). Η επιλογή του m=13 έγινε με βάση τη μέγιστη ορθή κατηγοριοποίηση των ατόμων στις αρχικές τους υποομάδες (=43% misclassification error). Η ανάλυση της CAP εμφάνισε στατιστικά σημαντική επαναληψιμότητα και η συσχέτιση του πρώτου άξονα με τα πολυπαραγοντικά δεδομένα σχήματος ήταν δ_1=0,837 (trace statistic= 2,489, p<0,001, d_1^2= 0,700, p<0,001). Οι ανά ζεύγη συγκρίσεις αποκάλυψαν σημαντικές διαφοροποιήσεις μεταξύ όλων των γεωγραφικών υποομάδων με εξαίρεση τη διάκριση μεταξύ Καλύμνου (Klm) και Μαλιακού (Mal), καθώς και μεταξύ Καλύμνου και Κεντρικού Ιονίου (CI) (Πίνακας 3.9).

Στην Εικόνα 3.7 δίνεται η οπτική απεικόνιση (διαγράμματα ανυσμάτων) της διακύμανσης του σχήματος του σώματος των γεωγραφικών υποομάδων κατά μήκος των αξόνων CAP1-CAP2,

σε κάθε ομάδα των ατόμων φυσικής προέλευσης με βάση το SRD. Συνολικά, η διακύμανση του σχήματος του σώματος φαίνεται να αυξάνεται μεταξύ των γεωγραφικών υποομάδων με την αύξηση του SRD. Κατά μήκος του άξονα CAP1,και στις τρεις ομάδες αναγέννησης (L30, M30-60, M60), η υποομάδα της Κέρκυρας, συγκριτικά με τις υπόλοιπες, εμφάνισε πλατύτερη επιφάνεια σώματος με πάχυνση της πρόσθιο-κοιλιακής χώρας και οπίσθιο-ραχιαία μετατόπιση του ραχιαίου πτερυγίου. Επιπρόσθετα στις ομάδες των M30-60 και M60, η υποομάδα της Κέρκυρας, συγκριτικά με τις υπόλοιπες, εμφάνισε μεγαλύτερο μέγεθος κεφαλής, πρόσθιο-ραχιαία μετατόπιση του στόματος και κοντύτερο ουραίο μίσχο. Αντίστοιχα, κατά μήκος του άξονα CAP2 στην ομάδα των άγριων ατόμων (L30), η υποομάδα της Καλύμνου, συγκριτικά με τις υποομάδες του Πατραϊκού και του Μεσολογγίου, εμφάνισε πάχυνση της κοιλιακής χώρας. Κατά μήκος του ίδιου άξονα, στις ομάδες των M30-60 και M60, η υποομάδα της Καλύμνου, συγκριτικά με τις υποομάδες του Πατραϊκού, του Μεσολογγίου, της Κέρκυρας και του Β. Αιγαίου (για τα M30-60), εμφάνισε πλατύτερη επιφάνεια σώματος (ειδικά στα M60) με πάχυνση της κοιλιακής χώρας και ραχιαία μετατόπιση του ραχιαίου πτερυγίου, μεγαλύτερο μέγεθος κεφαλής και πρόσθιο-νωτιαία μετατόπιση του στόματος.

Πίνακας 3.7. Αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA για τον έλεγχο των διαφορών στο σχήμα του σώματος στα δείγματα ψαριών φυσικής προέλευσης. Region: Περιοχή δειγματοληψίας, SRD: βαθμός αναγέννησης των λεπιών. Αριθμός επαναλήψεων: 9,999.

Source	Type III sum of squares	df	Mean squares	Pseudo-F	P(perm)
Region	0,034	6	0,006	12,274	<0,001
SRD	0,002	2	0,001	1,889	<0,05
Region*SRD	0,009	12	0,001	1,556	<0,001
Residuals	0,173	375	0,000		
total	0,219	395			



Εικόνα 3.6. Επίδραση της περιοχής προέλευσης στο σχήμα του σώματος άγριων ατόμων τσιπούρας. Οι υποδιαιρέσεις των δειγμάτων έχουν γίνει με βάση τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD). L30, άτομα με SRD ≤30%. M30-60, άτομα με SRD 31-60%. M60, άτομα με SRD >60%. CI, Κ. Ιόνιο, Cor, Κέρκυρα, Ptr, Πατραϊκός, Mes, Μεσολόγγι Klm, Κάλυμνος, Mal, Μαλιακός, NA, Β. Αιγαίο. Δίνεται η μέση τιμή (±2SE) για τους δύο πρώτους άξονες της ανάλυσης CAP (CAP1-CAP2).

Πίνακας 3.8. Μέσες τιμές των διαφορετικών γεωγραφικών υποομάδων κατά μήκος των αξόνων CAP1-CAP2 για το σχήμα του σώματος. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. Δίνεται το ποσοστό αντιπροσώπευσης της διακύμανσης του σχήματος (δ_1) για τον κάθε άξονα.

L30

REGION	CAP1	CAP2
Κεντρικό Ιόνιο (CI)	0,005	0,027
Κέρκυρα (Cor)	0,078	-0,026
Πατραϊκός (Ptr)	0,001	0,068
Μεσολόγγι (Mes)	-0,055	0,064
Κάλυμνος (Klm)	-0,071	-0,068
Μαλιακός (Mal)	-0,008	-0,016
Βόρειο Αιγαίο (NA)	-0,009	0,025
Canonical correlation (δ_1)	0,867	0,793

M30-60

REGION	CAP1	CAP2
Κεντρικό Ιόνιο (CI)	-0,033	-0,058
Κέρκυρα (Cor)	-0,1	0,036
Πατραϊκός (Ptr)	0,045	0,039
Μεσολόγγι (Mes)	0,106	0,062
Κάλυμνος (Klm)	0,035	-0,106
Μαλιακός (Mal)	0,028	-0,085
Βόρειο Αιγαίο (NA)	0,043	0,063
Canonical correlation (δ_1)	0,894	0,848

M60

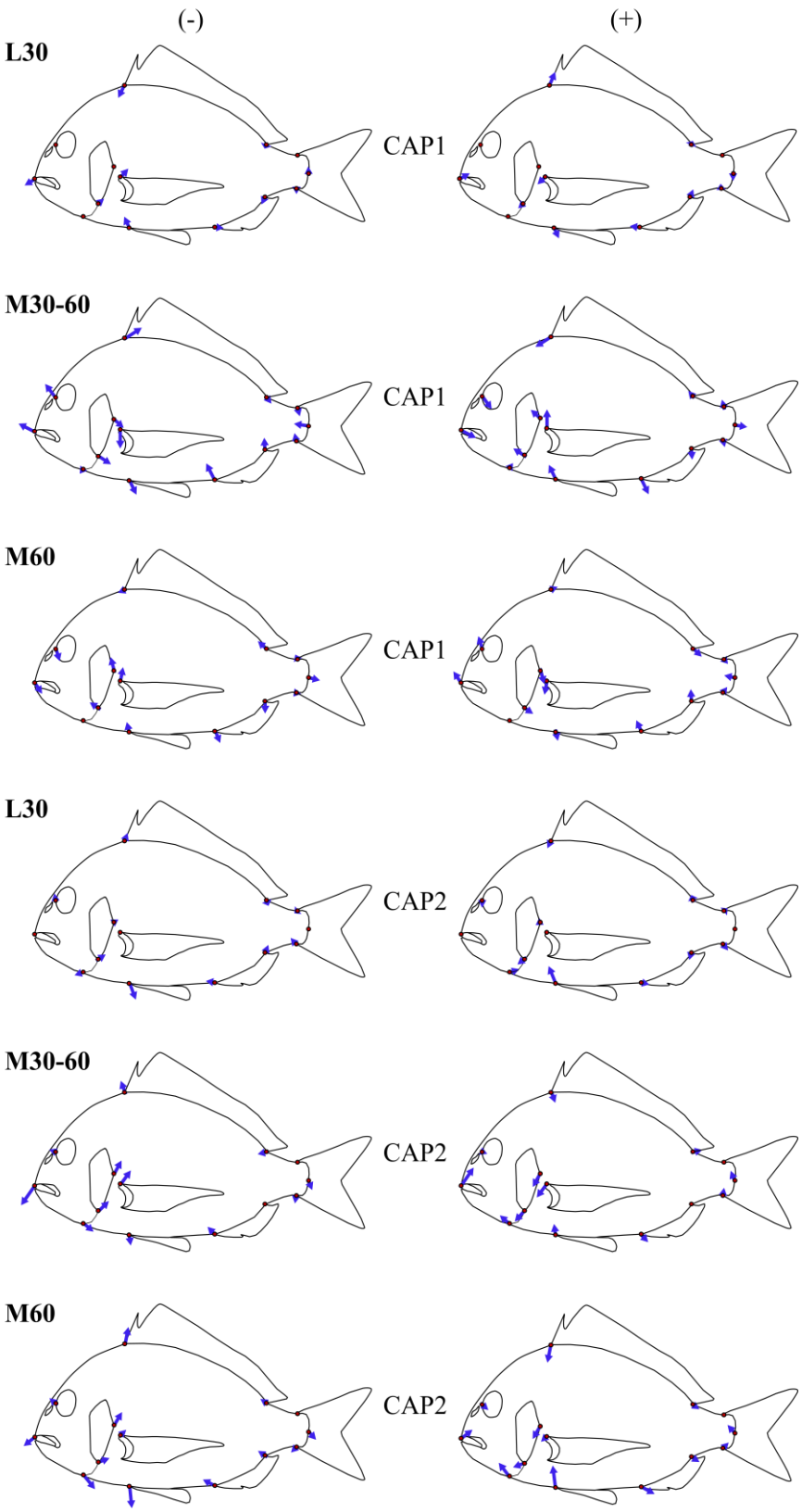
REGION	CAP1	CAP2
Κεντρικό Ιόνιο (CI)	-0,029	-0,094
Κέρκυρα (Cor)	0,176	0,017
Πατραϊκός (Ptr)	-0,047	0,088
Μεσολόγγι (Mes)	-0,054	0,067
Κάλυμνος (Klm)	-0,030	-0,115
Μαλιακός (Mal)	0,000	-0,095
Βόρειο Αιγαίο (NA)	-0,019	-0,001
Canonical correlation (δ_1)	0,837	0,780

Πίνακας 3.9. Αποτελέσματα της ανάλυσης PERMANOVA για τη σημαντικότητα των διαφορών στο σχήμα του σώματος μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών ομάδων. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. CI, K. Ιόνιο, Cor, Κέρκυρα, Ptr, Πατραϊκός, Mes, Μεσολόγγι, Klm, Κάλυμνος, Mal, Μαλιακός, NA, B. Αιγαίο. Αριθμός επαναλήψεων 9,999. ns: P (perm) > 0,05, *: P (perm) < 0,05, **: P (perm) < 0,01, ***: P (perm) < 0,001

L30	CI	Cor	Ptr	Klm	Mal	NA	Mes
CI		***	**	***	***	***	***
Cor	0,0318		***	***	***	***	***
Ptr	0,0297	0,0336			***	***	*
Klm	0,0294	0,0326	0,0316		**	***	***
Mal	0,0297	0,0318	0,0319	0,0286		***	***
NA	0,0290	0,0317	0,0302	0,0304	0,0291		***
Mes	0,0284	0,0325	0,0273	0,0297	0,0305	0,0275	

M30-60	CI	Cor	Ptr	Klm	Mal	NA	Mes
CI		***	***	***	**	***	***
Cor	0,0359		**	***	**	***	***
Ptr	0,0339	0,0360		***	**	**	**
Klm	0,0324	0,0371	0,0323		ns	***	***
Mal	0,0343	0,0376	0,0337	0,0301		**	***
NA	0,0379	0,0389	0,0317	0,0329	0,0331		**
Mes	0,0343	0,0367	0,0287	0,0314	0,0340	0,0290	

M60	CI	Cor	Ptr	Klm	Mal	NA	Mes
CI		**	***	ns	*	***	***
Cor	0,0394		***	*	*	***	***
Ptr	0,0350	0,0373		***	*	***	*
Klm	0,0328	0,0385	0,0346		ns	***	***
Mal	0,0375	0,0415	0,0383	0,0312		**	*
NA	0,0363	0,0378	0,0305	0,0329	0,0306		***
Mes	0,0366	0,0381	0,0289	0,0343	0,0361	0,0278	



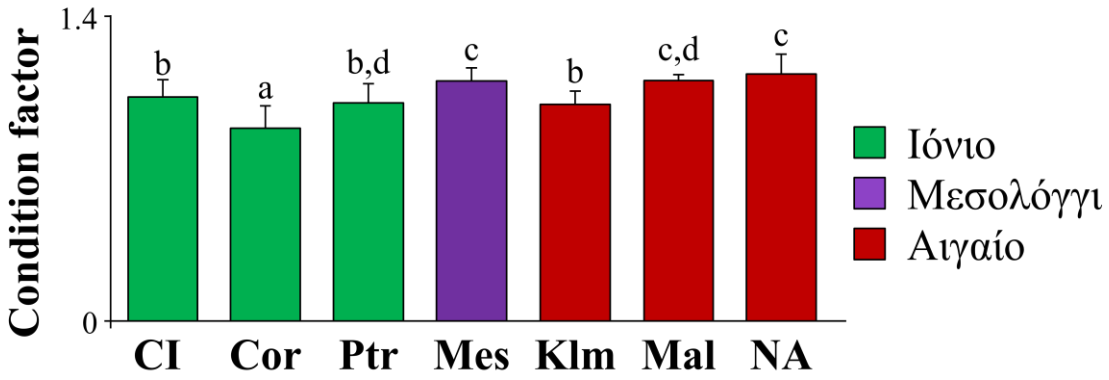
Εικόνα 3.7. Διαγράμματα ανυσμάτων που δείχνουν τη μεταβολή του σχήματος του σώματος σε σχέση με τις ακραίες τιμές των αξόνων της ανάλυσης CAP (CAP1-2) για τα άτομα των διαφορετικών γεωγραφικών υποομάδων, σε κάθε ομάδα των ατόμων φυσικής προέλευσης με βάση τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD, %). L30, άτομα με SRD ≤30%. M30-60, άτομα με SRD 31-60%. M60, άτομα με SRD >60%.

3.1.6 Σχέση της περιοχής προέλευσης και του βαθμού αναγέννησης λεπιών (SRD) με τον συντελεστή ευρωστίας (condition factor) των ατόμων φυσικής προέλευσης

Ο συντελεστής ευρωστίας διέφερε σημαντικά μεταξύ των δειγμάτων ψαριών φυσικής προέλευσης (ANOVA, p<0,001). Αντίθετα, τα άτομα με διαφορετικά επίπεδα SRD (L30, M30-60, M60), δεν διαφοροποιήθηκαν εντός του κάθε γεωγραφικού δείγματος ή στο σύνολο των ατόμων φυσικής προέλευσης ανεξαρτήτως γεωγραφικής περιοχής (Πίνακας 3.10). Το δείγμα της Κέρκυρας (Cor) είχε σημαντικά χαμηλότερο συντελεστή ευρωστίας σε σχέση με τα δείγματα των υπόλοιπων περιοχών (Εικόνα 3.8). Σημαντικά μεγαλύτερο συντελεστή ευρωστίας παρουσίασαν τα δείγματα των περιοχών του Β. Αιγαίου (NA) και του Μεσολογγίου (Mes) σε σχέση με τις υπόλοιπες περιοχές εκτός του Μαλιακού (Mal) (Εικόνα 3.8).

Πίνακας 3.10. Αποτελέσματα ανάλυσης διασποράς (ANOVA) για τον έλεγχο των διαφορών ως προς τον συντελεστή ευρωστίας στα δείγματα ψαριών φυσικής προέλευσης. Region: Περιοχή δειγματοληψίας, SRD: βαθμός αναγέννησης των λεπιών.

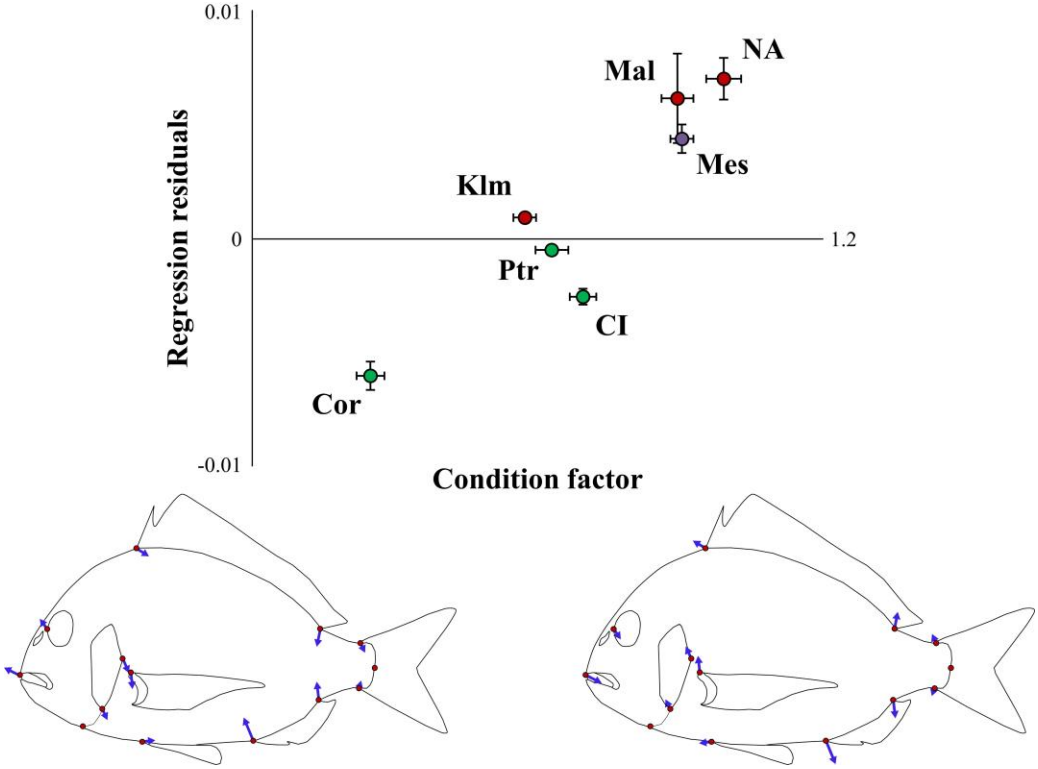
Two-way ANOVA	SS	DF	MS	F	P-value
Intercept	172,960	1	172,960	27,491,984	<0,001
REGION	2,511	6	0,419	66,521	<0,001
SRD	0,005	2	0,003	0,419	0,658
REGION*SRD	0,105	12	0,009	1,391	0,167
Error	2,309	367	0,006		



Εικόνα 3.8. Μέσος συντελεστής ευρωστίας (Mean, +SD) των δειγμάτων τσιπούρας φυσικής προέλευσης. CI, K. Ιόνιο, Cor, Κέρκυρα, Ptr, Πατραϊκός, Mes, Μεσολόγγι, Klm, Κάλυμνος, Mal, Μαλιακός, NA, Β. Αιγαίο. Οι τιμές χωρίς κοινό γράμμα είναι στατιστικά διαφορετικές (p<0,05). Με διαφορετικό χρώμα συμβολίζονται οι περιοχές του Αιγαίου, του Ιονίου και της Λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου.

3.1.7 Σχέση μεταξύ του σχήματος του σώματος και του συντελεστή ευρωστίας στα δείγματα φυσικής προέλευσης

Η ανάλυση παλινδρόμησης αποκάλυψε ότι η διακύμανση στο συντελεστή ευρωστίας (μεταξύ των δειγμάτων των διαφορετικών περιοχών) αντανακλά στη διακύμανση των κανονικοποιημένων (ως προς το μέγεθος) μεταβλητών του σχήματος του σώματος ($p<0,01$), εξηγώντας το 5% της συνολικής διακύμανσης σχήματος των ατόμων φυσικής προέλευσης. Σύμφωνα με το διάγραμμα διασποράς και κατά μήκος των τιμών του συντελεστή ευρωστίας, υπήρξε διάκριση μεταξύ των περιοχών Αιγαίου και Ιονίου για το σχήμα του σώματος, με τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου (Mes) να ομαδοποιείται με τα δείγματα του Αιγαίου (Εικόνα 3.9). Κατά μήκος του άξονα των τιμών του δείκτη ευρωστίας, οι διαφορές σχήματος αφορούσαν τα δείγματα με μεγάλο δείκτη ευρωστίας (Mal, Mes NA) έναντι εκείνων με μικρό (Cor). Συγκεκριμένα, τα δείγματα μεγάλης ευρωστίας (Mal, Mes NA), συγκριτικά με το δείγμα της Κέρκυρας, εμφάνισαν πιο εύρωστο σχήμα σώματος με πάχυνση της κοιλιακής χώρας και του ουραίου μίσχου, μικρότερο μέγεθος κεφαλής και ραχιαία μετατόπιση του ραχιαίου και του θωρακικού πτερυγίου.



Εικόνα 3.9. Κατανομή των μεταβλητών του σχήματος του σώματος (Regression residuals) κατά μήκος του συντελεστή ευρωστίας (Condition factor) των δειγμάτων τσιπούρας φυσικής προέλευσης. Δίνεται η μέση τιμή (±SE). Τα διαγράμματα ανυσμάτων (x1) δείχνουν τη μεταβολή του σχήματος σε σχέση με τις ακραίες τιμές του άξονα των τιμών του συντελεστή ευρωστίας. CI, Κ. Ιόνιο, Cor, Κέρκυρα, Ptr, Πατραϊκός, Mes, Μεσολόγγι, Klm, Κάλυμνος, Mal, Μαλιακός, NA, Β. Αιγαίο.

3.1.8 Σχέση της περιοχής και του βαθμού αναγέννησης λεπιών με τον γοναδοσωματικό (G.I.) και καρδιοσωματικό (H.I.) δείκτη των δειγμάτων φυσικής προέλευσης

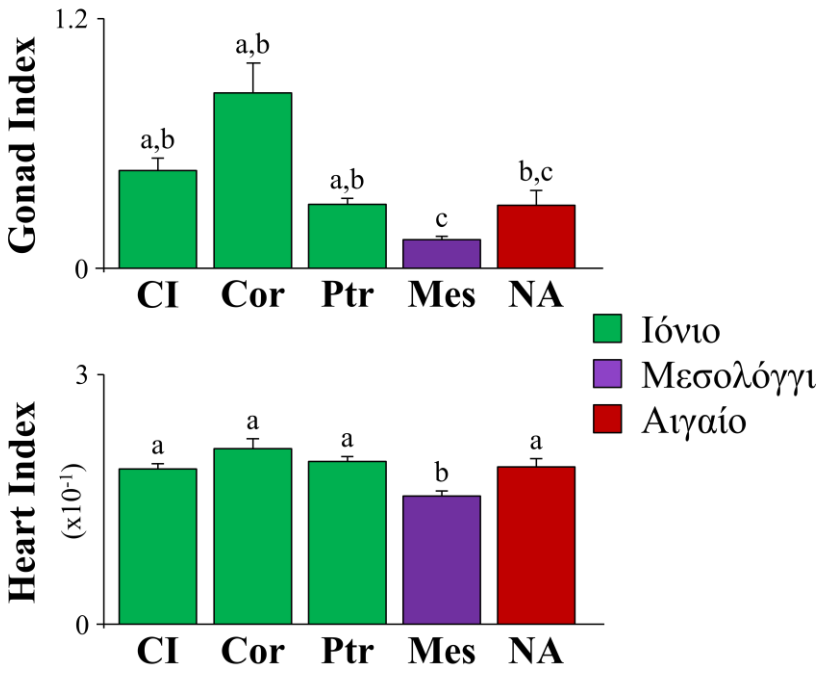
Ο γοναδοσωματικός και καρδιοσωματικός δείκτης έδειξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των δειγμάτων ψαριών φυσικής προέλευσης (ANOVA, $p<0,001$). Αντίθετα, τα άτομα με διαφορετικά επίπεδα SRD (L30, M30-60, M60) δεν διαφοροποιήθηκαν με βάση τους παραπάνω δείκτες εντός του κάθε γεωγραφικού δείγματος ή στο σύνολο των ατόμων φυσικής προέλευσης ανεξαρτήτως γεωγραφικής περιοχής (Πίνακας 3.11)

Για το γοναδοσωματικό δείκτη, το δείγμα του Μεσολογγίου (Mes) παρουσίασε σημαντικά μικρότερη τιμή σε σχέση με τα δείγματα των υπόλοιπων περιοχών εκτός του Β. Αιγαίου (Εικόνα 3.10). Ακολούθησε το δείγμα του Β. Αιγαίου (NA), με σημαντικά μικρότερο γοναδοσωματικό δείκτη σε σχέση με το δείγμα της Κέρκυρας (Cor), το οποίο εμφάνισε τον υψηλότερο δείκτη στο σύνολο των δειγμάτων. Για τον καρδιοσωματικό δείκτη, το δείγμα του Μεσολογγίου (Mes) παρουσίασε σημαντικά μικρότερη τιμή σε σχέση με τα δείγματα των υπόλοιπων περιοχών (Εικόνα 3.10).

Πίνακας 3.11. Αποτελέσματα ανάλυσης διασποράς (ANOVA) για τον έλεγχο των διαφορών ως προς τον γοναδοσωματικό (G.I.) και καρδιοσωματικό (H.I.) δείκτη σε δείγματα τσιπούρας φυσικής προέλευσης. Region: Περιοχή προέλευσης, SRD: βαθμός αναγέννησης των λεπιών

G.I.	SS	DF	MS	F	P-value
Intercept	22,982	1	22,982	217,162	<0,001
REGION	5,882	4	1,470	13,894	<0,001
SRD	0,108	2	0,054	0,509	0,602
REGION*SRD	1,077	8	0,135	1,272	0,261
Error	18,414	174	0,106		

H.I.	SS	DF	MS	F	P-value
Intercept	4,480	1	4,480	2164,283	<0,001
REGION	0,060	4	0,015	7,277	<0,001
SRD	0,003	2	0,001	0,671	0,513
REGION*SRD	0,032	8	0,004	1,945	0,056
Error	0,364	176	0,002		



Εικόνα 3.10. Μέσος (+SE) Γοναδοσωματικός (Gonad Index) και Καρδιοσωματικός δείκτης (Heart Index) στα δείγματα τσιπούρας διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης. CI, Κ. Ιόνιο, Cor, Κέρκυρα, Ptr, Πατραϊκός, Mes, Μεσολόγγι, NA, Β. Αιγαίο. Οι τιμές χωρίς κοινό γράμμα είναι στατιστικά διαφορετικές ($p<0,05$). Με διαφορετικό χρώμα συμβολίζονται οι περιοχές του Αιγαίου, του Ιονίου και της Λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου.

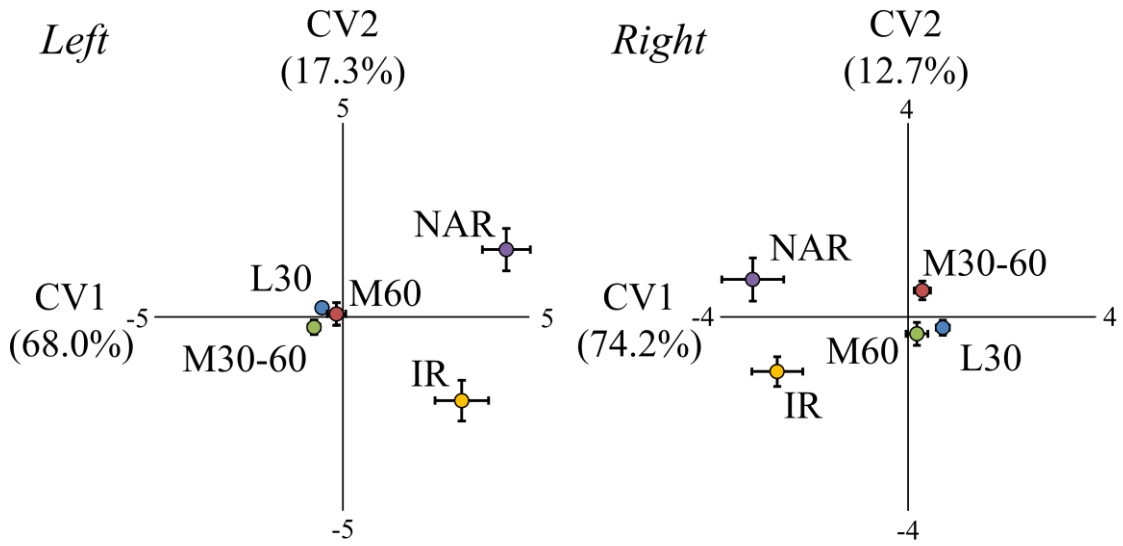
3.1.9 Σύγκριση της μορφολογίας των ωτολίθων μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων

Στο παρόν υποκεφάλαιο διερευνάται η διακύμανση της μορφολογίας των ωτολίθων ανεξαρτήτως γεωγραφικής προέλευσης μεταξύ των ομάδων ψαριών άγριας συλλογής με διαφορετικά επίπεδα SRD και δύο δειγμάτων εκτροφής. Το σχήμα των ωτολίθων διέφερε σημαντικά μεταξύ των εκτρεφόμενων και των διαφορετικών ομάδων ψαριών φυσικής προέλευσης τόσο για την αριστερή (Wilks λ'=0,2576, $p<0,001$) όσο και για τη δεξιά (Wilks λ'=0,1411, $p<0,001$) πλευρά του σώματος. Η ανάλυση κανονικών μεταβλητών (CVA), κατά μήκος του άξονα CV1 που αντιπροσωπεύει το 74,2% της συνολικής διακύμανσης σχήματος για την αριστερή και το 68% για τη δεξιά πλευρά του σώματος, διέκρινε τα δείγματα εκτροφής από τα άτομα φυσικής προέλευσης (Εικόνα 3.11). Ο άξονας CV2 διέκρινε το δείγμα εκτροφής του Β. Αιγαίου από το δείγμα εκτροφής του Ιονίου και στις δύο πλευρές του σώματος (Εικόνα 3.11). Τα τετράγωνα των αποστάσεων Mahalanobis έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των ομάδων και για τις δύο πλευρές του σώματος (Πίνακας 3.12). Η μέση διαμόρφωση του σχήματος των ωτολίθων έδειξε μια χαρακτηριστική εγκοπή (*notch*) στο πρόσθιο-ραχιαίο όριο των ωτολίθων των δειγμάτων εκτροφής (μεταξύ των τμημάτων *rostrum* & *antirostrum*), καθώς και πλατύτερη επιφάνεια της οπίσθιας περιοχής (*cauda*) (Εικόνα 3.12) και για τις δύο πλευρές του σώματος. Στην Εικόνα 3.13

παρουσιάζονται αντιπροσωπευτικά παραδείγματα ωτολίθων δύο άγριων και δύο εκτρεφόμενων ατόμων. Στους ωτόλιθους των ατόμων εκτροφής (Εικόνα 3.13B, 313B') φαίνεται καθαρά η εγκόλπωση (notch) στη πρόσθιο-ραχιαία περιοχή, ενώ η περιφέρεια τους είναι περισσότερο δαντελωτή (μεγαλύτερη περίμετρο σε σχέση με αυτή των ωτολίθων των άγριων ψαριών).

Ο έλεγχος της ασυμμετρίας για το δείκτη FA_1 αποκάλυψε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων ($p<0,05$). Σε όλες τις περιπτώσεις τα δείγματα εκτροφής εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερη ασυμμετρία σε σχέση με τις διαφορετικές ομάδες των ατόμων φυσικής προέλευσης με βάση το SRD (Εικόνα 3.14). Σε ορισμένους χαρακτήρες (O_S, O_P, H_2, H_3, H_6, H_8) φαίνεται μια αύξηση των επιπέδων ασυμμετρίας με την αύξηση του SRD, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική. Ο έλεγχος της ασυμμετρίας για τον δείκτη FA_2 αποκάλυψε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων σε 3 από τους 11 μορφολογικούς χαρακτήρες ($p<0,05$). Συγκεκριμένα στις αρμονικές 3 (H_3), 4 (H_4) και 5 (H_5) τα δείγματα εκτροφής είχαν σημαντικά μεγαλύτερη ασυμμετρία από τα άτομα με χαμηλά επίπεδα SRD (L30) (Εικόνα 3.15). Η επιφάνεια (O_S), το μέγιστο πλάτος (O_D) και οι αρμονικές 7 (H_7) και 8 (H_8) εμφάνισαν κυμαινόμενη ασυμμετρία (FA), το μέγιστο μήκος και οι αρμονικές 3 (H_3), 4 (H_4) και 6 (H_6) κατευθυνόμενη ασυμμετρία (DA) και η περίμετρος (O_P) μαζί με τις αρμονικές 2 (H_2) και 5 (H_5) αντισυμμετρία (Ant).

Ο έλεγχος των κανονικοποιημένων μεταβλητών μεγέθους αποκάλυψε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των εκτρεφόμενων και των ομάδων ψαριών φυσικής προέλευσης με διαφορετικά επίπεδα SRD. Οι διαφοροποιήσεις αυτές αφορούσαν τις μεταβλητές του μέγιστου μήκους (O_L^*) για την αριστερή πλευρά του σώματος και της επιφάνειας (O_S^*), της περιμέτρου (O_P^*), του μέγιστου μήκους και του μέγιστου πλάτους (O_D^*) για τη δεξιά πλευρά του σώματος ($p<0,01$). Σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση μεγέθους με την αύξηση του SRD (Εικόνα 3.16). Για την αριστερή πλευρά, τα άτομα με υψηλό SRD (M60) είχαν σημαντικά μεγαλύτερο O_L^* από τα άτομα με χαμηλό SRD (L30). Για τη δεξιά πλευρά, τα άτομα με υψηλό SRD (M60) είχαν σημαντικά μεγαλύτερο O_S^*, O_L^* και O_D^* από τα άτομα με χαμηλό SRD (L30) καθώς και σημαντικά μεγαλύτερο O_S^* από τα άτομα με ενδιάμεσα επίπεδα SRD (M30-60). Επιπλέον τα M30-60 είχαν σημαντικά μεγαλύτερο O_D^* από τα L30. Τέλος το δείγμα εκτροφής του Ιονίου παρουσίασε μεγαλύτερο O_P^* από τα άτομα χαμηλών και ενδιάμεσων επιπέδων SRD.

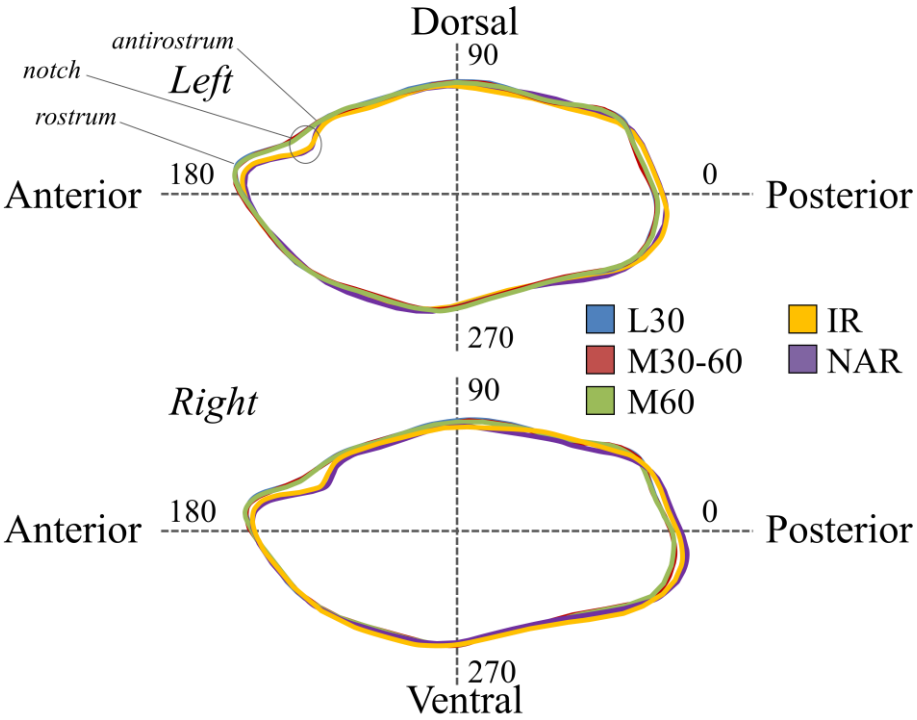


Εικόνα 3.11. Σύγκριση μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων τσιπούρας ως προς το σχήμα των ωτολίθων. Δίνεται η μέση τιμή (±2SE) για την κάθε κανονική μεταβλητή (CV1-CV2) ανά ομάδα. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο ποσοστό της διακύμανσης του σχήματος που εξηγεί ο κάθε άξονας κανονικών μεταβλητών (CV).

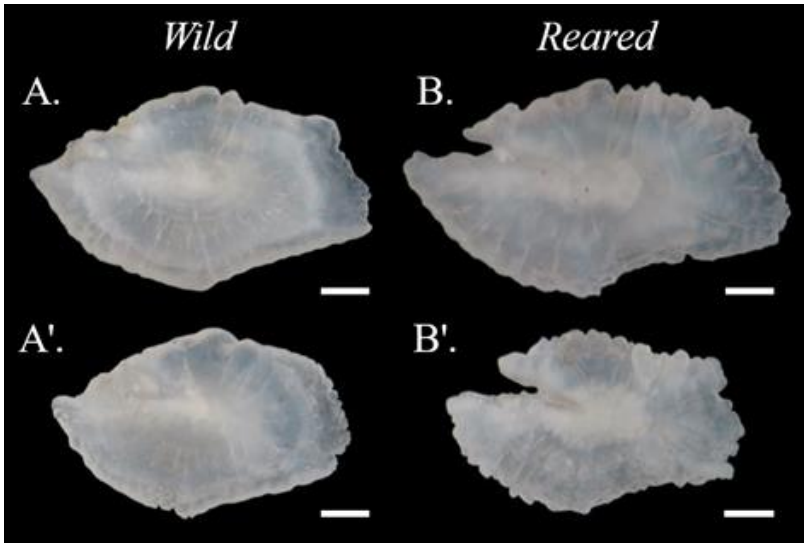
Πίνακας 3.12. Αποτελέσματα της ανάλυσης CVA για τη σημαντικότητα των διαφορών στο σχήμα των ωτολίθων μεταξύ των ομάδων ψαριών φυσικής προέλευσης με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) και δύο δειγμάτων εκτροφής. L30, ψάρια φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, ψάρια φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, ψάρια φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου. Δίνονται οι βαθμοί σημαντικότητας (πάνω) και το τετράγωνο των αποστάσεων Mahalanobis (κάτω) για την κάθε πλευρά του σώματος. ***: *p<0,01*

Αριστερά	L30	M30-60	M60	IR	NAR
L30		***	***	***	***
M30-60	1,347		***	***	***
M60	1,199	1,329		***	***
IR	14,000	12,342	10,532		***
NAR	17,547	14,402	14,550	6,025	

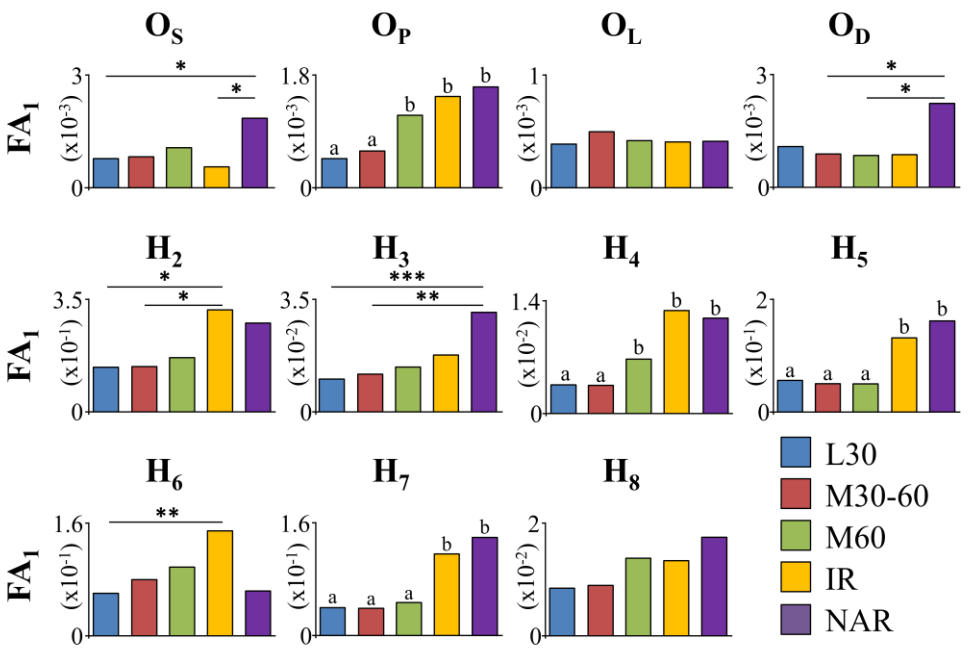
Δεξιά	L30	M30-60	M60	IR	NAR
L30		***	***	***	***
M30-60	1,801		***	***	***
M60	1,579	2,115		***	***
IR	19,501	20,133	17,128		***
NAR	27,324	30,180	24,557	17,336	



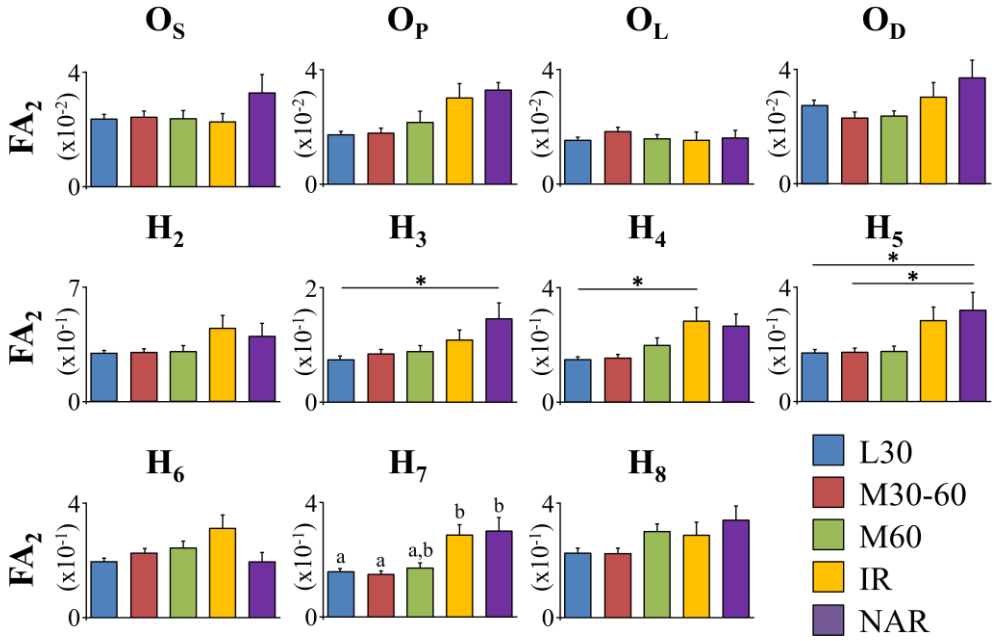
Εικόνα 3.12. Μέση διαμόρφωση του σχήματος των αριστερών (πάνω) και δεξιών (κάτω) ωτολίθων τσιπούρας για τις ομάδες ψαριών φυσικής προέλευσης με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) και δύο δειγμάτων εκτροφής, όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση Fourier. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου.



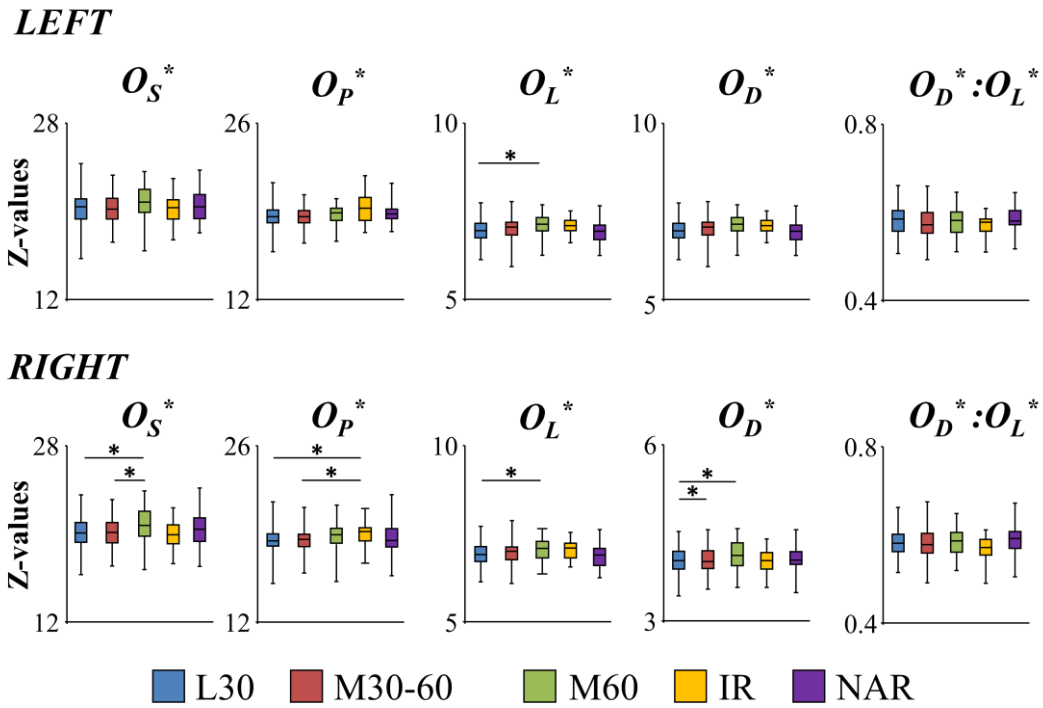
Εικόνα 3.13 Αριστεροί ωτόλιθοι τσιπούρας (sulcus acusticus στραμμένος προς τα κάτω) δύο άγριων (Wild) και δύο εκτρεφόμενων ατόμων (Reared). A: 18,1 cm SL (Τυπικό μήκος), A': 16,0 cm SL, B: 21,6 cm SL, B': 17,1 cm SL. Οι μπάρες κλίμακας αντιστοιχούν σε 1 mm. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν με ανακλώμενο φως, σε μαύρο φόντο.



Εικόνα 3.14. Δείκτης ασυμμετρίας (FA_1) των ωτολίθων των ομάδων τσιπούρας φυσικής προέλευσης με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) και δύο δειγμάτων εκτροφής. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου. O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8. Οι τιμές χωρίς κοινό γράμμα είναι στατιστικά διαφορετικές ($p<0,05$). *: $p<0,05$, **: $p<0,01$, ***: $p<0,001$



Εικόνα 3.15. Δείκτης ασυμμετρίας (FA_2, +SE) των ωτολίθων των ομάδων τσιπούρας φυσικής προέλευσης με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) και δύο δειγμάτων εκτροφής. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου. O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8. Οι τιμές χωρίς κοινό γράμμα είναι στατιστικά διαφορετικές ($p<0,05$). *: $p<0,05$



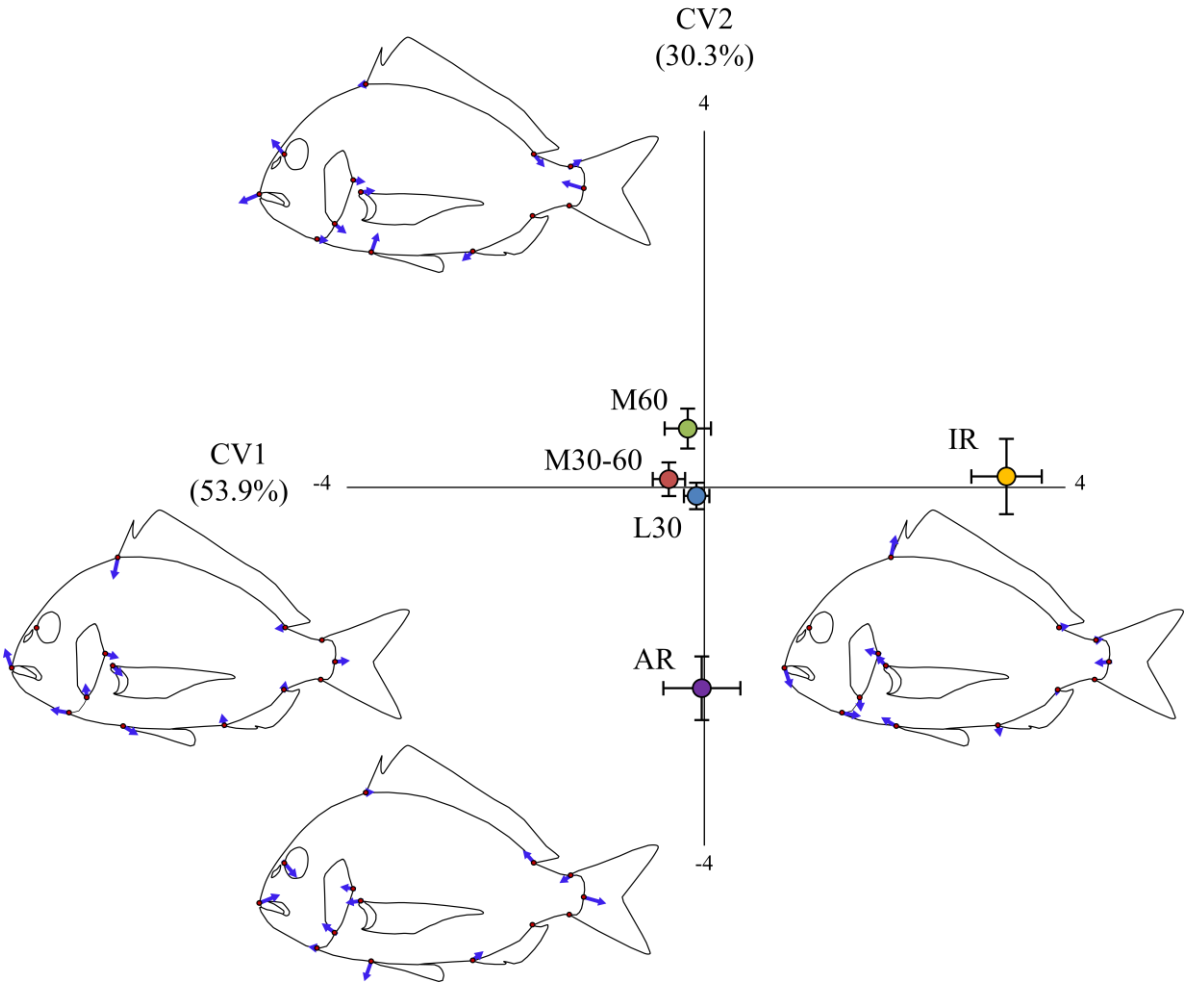
Εικόνα 3.16. Box plots (—, διάμεσος; □, 25 and 75% εκατοστημόρια; I, υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές) των κανονικοποιημένων τιμών των μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους ωτολίθου (Z-values) των ομάδων τσιπούρας φυσικής προέλευσης με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) και δύο δειγμάτων εκτροφής. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου. O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος. *: $p<0,05$

3.1.10 Σύγκριση του σχήματος του σώματος και του συντελεστή ευρωστίας μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων

Στο παρόν υποκεφάλαιο διερευνάται η διακύμανση του σχήματος του σώματος και του συντελεστή ευρωστίας ανεξαρτήτως γεωγραφικής προέλευσης μεταξύ των ομάδων ψαριών άγριας συλλογής με διαφορετικά επίπεδα SRD και δύο δειγμάτων εκτροφής. Το σχήμα του σώματος διέφερε σημαντικά μεταξύ των εκτρεφόμενων και των διαφορετικών ομάδων ψαριών φυσικής προέλευσης (Procrustes ANOVA, Pillai test: $p<0,001$), με τα ψάρια εκτροφής να εμφανίζουν μεγαλύτερη ποικιλομορφία σχήματος. Η ανάλυση κανονικών μεταβλητών (CVA) διέκρινε τα δείγματα εκτροφής από τα άτομα φυσικής προέλευσης (Εικόνα 3.17). Κατά μήκος του άξονα CV1, που αντιπροσωπεύει το 53,9% της συνολικής διακύμανσης του σχήματος, διαφοροποιήθηκε το δείγμα εκτροφής του Ιονίου από τις υπόλοιπες ομάδες. Κατά μήκος του άξονα CV2, που αντιπροσωπεύει το 30,3% της συνολικής διακύμανσης του σχήματος, διαφοροποιήθηκε το δείγμα εκτροφής του Β. Αιγαίου από τις υπόλοιπες ομάδες. Οι αποστάσεις Mahalanobis έδειξαν σημαντικές διαφορές μεταξύ όλων των ομάδων (Πίνακας 3.13). Κατά μήκος του άξονα CV1, τα διαγράμματα ανυσμάτων αποκάλυψαν ότι, το δείγμα εκτροφής του Ιονίου συγκριτικά με το άτομα φυσικής προέλευσης ενδιάμεσων επιπέδων SRD (M30-60), παρουσίασε κοιλιακή μετατόπιση του

στόματος, μικρότερο μέγεθος κεφαλής, πρόσθιά μετατόπιση του ουραίου μίσχου και ραχιαία μετατόπιση του ραχιαίου πτερυγίου (Εικόνα 3.17). Κατά μήκος του άξονα CV2, τα διαγράμματα ανυσμάτων αποκάλυψαν ότι, το δείγμα εκτροφής του Β. Αιγαίου συγκριτικά με το άτομα φυσικής προέλευσης υψηλών επιπέδων SRD (M60), παρουσίασε μικρότερο μέγεθος κεφαλής, πάχυνση της κοιλιακής χώρας και οπίσθια μετατόπιση του ουραίου μίσχου.

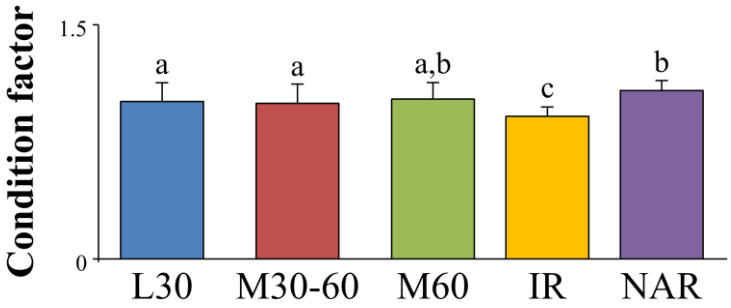
Ο συντελεστής ευρωστίας διέφερε σημαντικά μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων (Kruskal Wallis test, p<0,001). Συγκεκριμένα το δείγμα εκτροφής του Β. Αιγαίου εμφάνισε σημαντικά υψηλότερο συντελεστή ευρωστίας σε σχέση με τις ομάδες ψαριών φυσικής προέλευσης με χαμηλά και ενδιάμεσα επίπεδα SRD (Εικόνα 3.18). Από την άλλη το δείγμα εκτροφής του Ιονίου εμφάνισε σημαντικά μικρότερο συντελεστή ευρωστίας σε σχέση με όλες τις υπόλοιπες ομάδες (Εικόνα 3.18).



Εικόνα 3.17. Σύγκριση μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων τσιπούρας ως προς το σχήμα του σώματος. Δίνεται η μέση τιμή (±2SE) για την κάθε κανονική μεταβλητή (CV1-CV2) ανά ομάδα. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο ποσοστό της διακύμανσης του σχήματος που εξηγεί ο κάθε άξονας κανονικών μεταβλητών (CV). L30, άτομα φυσικής προέλευσης με βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου. Τα διαγράμματα ανυσμάτων (x5) δείχνουν τη μεταβολή του σχήματος σε σχέση με τις ακραίες τιμές των αξόνων CV.

Πίνακας 3.13. Αποτελέσματα της ανάλυσης CVA για τη σημαντικότητα των διαφορών στο σχήμα του σώματος μεταξύ των ατόμων φυσικής προέλευσης με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης (SRD) και δύο δειγμάτων εκτροφής. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου. Δίνονται οι βαθμοί σημαντικότητας (πάνω) και το τετράγωνο των αποστάσεων Mahalanobis (κάτω) για την κάθε πλευρά του σώματος. ***: *p<0,001*

	L30	M30-60	M60	IR	AR
L30		***	***	***	***
M30-60	0,899		***	***	***
M60	1,165	1,012		***	***
IR	3,501	3,768	3,632		***
AR	2,350	2,473	2,913	4,165	



Εικόνα 3.18. Μέσος συντελεστής ευρωστίας (Mean, +SD) των ομάδων τσιπούρας φυσικής προέλευσης με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) και δύο δειγμάτων εκτροφής. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου. Οι τιμές χωρίς κοινό γράμμα είναι στατιστικά διαφορετικές (p<0,05).

3.2 Ταυτοποίηση της γενετικής δομής φυσικών πληθυσμών τσιπούρας μέσω της χρήσης τόπων μικροδορυφορικού DNA

Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης των μορφολογικών χαρακτήρων στην ομάδα των άγριων ατόμων (L30) με μικρή πιθανότητα να περιέχουν δραπέτες ιχθυοκαλλιέργειας (≤30%, SRD), τα άτομα από τις διαφορετικές περιοχές (υποομάδες) κατηγοριοποιήθηκαν σε 3 γεωγραφικές ομάδες. Την ομάδα του Β. Αιγαίου (Μαλιακός και Βόρειο Αιγαίο), την ομάδα του Ιονίου (Κεντρικό Ιόνιο, Κέρκυρα, Πατραϊκός, Μεσολόγγι) και την ομάδα της Καλύμνου. Η ομάδα της Καλύμνου διαχωρίστηκε από τις υπόλοιπες ομάδες του Αιγαίου διότι στη συγκεκριμένη περιοχή είναι γνωστή η ύπαρξη φυσικού αποθέματος τσιπούρας με συγκεκριμένα χωρικά χαρακτηριστικά. Το δείγμα του Μεσολογγίου, αν και διαχωρίστηκε από τις υπόλοιπες περιοχές του Ιονίου βάσει μορφολογίας, αποτελεί τμήμα ενός κοινού γενετικά αποθέματος. Οι τσιπούρες της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου, κατά τους χειμερινούς μήνες, μεταναστεύουν στη ανοιχτή θάλασσα του Ιονίου για λόγους αναπαραγωγής. Με βάση τα παραπάνω, ελέγχθηκε η ύπαρξη γενετικής απομόνωσης μεταξύ των 3 γεωγραφικών ομάδων. Οι συγκρίσεις πραγματοποιήθηκαν ως προς τον έλεγχο της

ποικιλομορφίας μικροδορυφορικών τόπων DNA και στις 3 ομάδες των ατόμων τσιπούρας φυσικής προέλευσης με διαφορετικά επίπεδα SRD (L30, M30-60, M60). Επιπλέον, για τον έλεγχο της συμμετοχής δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας στη διακύμανση του φυσικού γονοτύπου, εξετάστηκε η διακύμανση της γενετικής ποικιλομορφίας εντός κάθε γεωγραφικής ομάδας (Β. Αιγαίο, Ιόνιο, Κάλυμνος), μεταξύ των ατόμων με διαφορετικά επίπεδα SRD (L30, M30-60, M60). Τέλος, ελέγχθηκαν τα επίπεδα της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των ομάδων των ατόμων άγριας συλλογής με διαφορετικά επίπεδα SRD, ανεξάρτητα της γεωγραφικής τους προέλευσης, καθώς και των δύο δειγμάτων εκτροφής (Β. Αιγαίου και Ιονίου), ως δείγματα ελέγχου.

3.2.1 Σχέση της περιοχής και του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) με τη γενετική ποικιλομορφία των ατόμων φυσικής προέλευσης

Από τους 9 μικροδορυφορικούς τόπους που εξετάστηκαν, όλοι ήταν πολυμορφικοί, με τον μέσο αριθμό των αλληλομόρφων (A) να κυμαίνεται από 7,11 ± 1,62 (Κάλυμνος, M60) έως 15,67 ± 4.,41 (Ιόνιο, L30) (Πίνακας 3.14). Μεταξύ των γεωγραφικών ομάδων στις διαφορετικές κατηγορίες αναγέννησης των ατόμων άγριας συλλογής, η αναμενόμενη ετεροζυγωτία (He) κυμάνθηκε από 0,82 έως 0,87. Η αλληλική αφθονία (Ar) και ο δραστικός αριθμός αλληλομόρφων (Ae) κυμάνθηκαν από 5,36 ± 1,17 (Ιόνιο, M60) έως 10,14 ± 3,35 (Κάλυμνος, L30) και από 5,33 ± 1,43 (Ιόνιο, M60) έως 8,84 ± 5,10 (Ιόνιο, L30), αντίστοιχα. Τέλος, για τις διαφορετικές γεωγραφικές ομάδες τα επίπεδα παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας κυμάνθηκαν στο 0,75, χαμηλότερα από την αναμενόμενη που ήταν στο 0,85 ενώ ο συντελεστής ομομιξίας (F_{IS}), κυμάνθηκε από 0,05 ± 0,12 (Β. Αιγαίο, M30-60) έως 0,21 ± 0,28 (Κάλυμνος, M60). Για κάθε ζεύγος μικροδορυφορικών τόπων σε κάθε ανάλυση, δεν παρατηρήθηκε σημαντική ένδειξη για την ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης με βάση τη διόρθωση Bonferroni. Οι πληθυσμοί εμφάνισαν σημαντική απόκλιση από την ισορροπία Hardy- Weinberg με σημαντική μείωση της ετεροζυγωτίας (Fisher exact test, $p<0,001$). Ένας από τους πιθανούς λόγους ήταν η πιθανή παρουσία γονοτυπικών λαθών σε δύο τόπους (Dd67, SAGT41) καθώς και «κρυφών» (null) αλληλομόρφων σε 6 τόπους (Dd67, SAGT41, SAGT1, Bd10, VBC003, Edl10), όπως διαπιστώθηκε μετά τον έλεγχο με το Microcheker. Ωστόσο, η ύπαρξη μηδενικών (null) αλληλομόρφων μπορεί να επηρεάσει την εκτίμηση της διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών, για παράδειγμα, μειώνοντας τη γενετική ποικιλομορφία εντός των πληθυσμών (π.χ. Paetkau and Strobeck 1995). Συγκεκριμένα, η μείωση της γενετικής ποικιλομορφίας εντός των πληθυσμών έχει γενικά ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών (αύξηση των τιμών του δείκτης γενετικής διαφοροποίησης-F_{ST}) καθώς και των μεταξύ τους γενετικών αποστάσεων (Slatkin 1995, Paetkau *et al.* 1997). Για το λόγο αυτό, οι τιμές γενετικής διαφοροποίησης (global F_{ST}, pairwise F_{ST}) στις διαφορετικές αναλύσεις υπολογίστηκαν με τη

μέθοδο της διόρθωσης ENA (λαμβάνει υπόψιν της την πιθανή ύπαρξη μηδενικών αλληλομόρφων στην εκτίμηση των τιμών F_{ST}) μέσω της χρήσης του προγράμματος FreeNA (Chapuis and Estoup 2007).

Σε κάθε ομάδα των ατόμων φυσικής προέλευσης με βάση το SRD (L30, M30-60, M60), η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των γεωγραφικών ομάδων του Αιγαίου και της ομάδας του Ιονίου δεν ήταν σημαντική (Πίνακας 3.15). Για τα L30, M30-60 και M60 ο δείκτης συνολικής γενετικής διαφοροποίησης (Global F_{ST}) ήταν -0,0021, 0,0057 και -0,0007 αντίστοιχα ($p>0,05$). Το Fisher exact test δεν αποκάλυψε σημαντική γονοτυπική διαφοροποίηση μεταξύ των γεωγραφικών ομάδων του Αιγαίου και του Ιονίου σε κάθε κατηγορία αναγέννησης ($p>0,05$, Πίνακας 3.16).

Εντός της κάθε γεωγραφικής ομάδας, η γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων (υποομάδων) με διαφορετικά επίπεδα SRD δεν ήταν σημαντική (Πίνακας 3.17). Για το Β. Αιγαίο, το Ιόνιο και τη Κάλυμνο ο δείκτης συνολικής γενετικής διαφοροποίησης (Global F_{ST}) ήταν 0,0013, -0,0003, -0,0033, αντίστοιχα ($p>0,05$). Παρόμοια, δεν υπήρξε σημαντική γονοτυπική διαφοροποίηση μεταξύ των ατόμων (υποομάδων) με διαφορετικά επίπεδα SRD σε κάθε γεωγραφική ομάδα (Fisher exact test, $p>0,05$, Πίνακας 3.18).

Πίνακας 3.14. Βασικές παράμετροι της γενετικής ποικιλομορφίας των διαφορετικών γεωγραφικών ομάδων σε κάθε κατηγορία των ατόμων φυσικής προέλευσης με βάση τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD). N: αριθμός ατόμων, A: μέσος αριθμός αλληλομόρφων, Ae: δραστικός αριθμός αλληλομόρφων, Ar: αλληλική αφθονία, Ho, He: παρατηρούμενη και αναμενόμενη ετεροζυγωτία, F_{IS}: συντελεστής ομομιξίας. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%.

POP ID	N	A	Ae	Ar	Ho	He	F_{IS}
L30							
Β. Αιγαίο	28	12,00 ± 4,39	7,28 ± 4,16	9,57 ± 3,36	0,75 ± 0,03	0,84 ± 0,04	0,11 ± 0,20
Ιόνιο	77	15,67 ± 4,41	8,84 ± 5,10	9,60 ± 3,13	0,74 ± 0,02	0,86 ± 0,03	0,14 ± 0,14
Κάλυμνος	35	13,33 ± 4,44	8,80 ± 4,78	10,14 ± 3,35	0,75 ± 0,03	0,86 ± 0,03	0,13 ± 0,19
Σύνολο	140	16,89 ± 5,42	9,18 ± 5,64	9,69 ± 3,09	0,74 ± 0,01	0,86 ± 0,03	
M30-60							
Β. Αιγαίο	15	10,00 ± 3,35	8,45 ± 4,70	8,21 ± 2,80	0,81 ± 0,04	0,86 ± 0,03	0,05 ± 0,12
Ιόνιο	56	13,89 ± 6,07	6,44 ± 3,38	7,88 ± 2,31	0,74 ± 0,02	0,86 ± 0,03	0,15 ± 0,22
Κάλυμνος	21	9,78 ± 3,15	7,12 ± 2,02	7,55 ± 2,60	0,76 ± 0,03	0,82 ± 0,04	0,07 ± 0,09
Σύνολο	92	15,67 ± 7,11	8,89 ± 5,45	7,91 ± 1,40	0,75 ± 0,02	0,85 ± 0,03	
M60							
Β. Αιγαίο	27	9,73 ± 3,47	8,31 ± 4,16	5,36 ± 1,17	0,78 ± 0,03	0,85 ± 0,04	0,08 ± 0,11
Ιόνιο	36	9,09 ± 3,27	5,33 ± 1,43	5,43 ± 0,94	0,76 ± 0,02	0,87 ± 0,02	0,13 ± 0,17
Κάλυμνος	9	6,82 ± 1,94	7,28 ± 3,71	5,45 ± 1,04	0,70 ± 0,06	0,87 ± 0,03	0,21 ± 0,28
Σύνολο	72	12,64 ± 4,84	8,82 ± 5,14	5,40 ± 0,97	0,76 ± 0,02	0,86 ± 0,02	

Πίνακας 3.15. Αποτελέσματα της γενετικής διαφοροποίησης (F_{ST} values) μεταξύ των γεωγραφικών ομάδων σε κάθε κατηγορία των ατόμων φυσικής προέλευσης με βάση τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD). L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. Δίνονται οι τιμές του δείκτη γενετική διαφοροποίησης F_{ST} (κάτω) και οι βαθμοί σημαντικότητας των τιμών (πάνω). ns: p>0,05

L30	Β. Αιγαίο	Ιόνιο	Κάλυμνος
Β. Αιγαίο		ns	ns
Ιόνιο	-0,0010		ns
Κάλυμνος	-0,0029	-0,0025	

M30-60	Β. Αιγαίο	Ιόνιο	Κάλυμνος
Β. Αιγαίο		ns	ns
Ιόνιο	0,0013		ns
Κάλυμνος	0,0104	0,0077	

M60	Β. Αιγαίο	Ιόνιο	Κάλυμνος
Β. Αιγαίο		ns	ns
Ιόνιο	0,0042		ns
Κάλυμνος	-0,0067	-0,0110	

Πίνακας 3.16. Αποτελέσματα του Fisher exact test για τον έλεγχο της γονοτυπικής διαφοροποίησης μεταξύ των γεωγραφικών ομάδων σε κάθε κατηγορία των ατόμων φυσικής προέλευσης με βάση το βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD). L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%.

L30	**Chi2**	**df**	**p-value**
Β. Αιγαίο – Ιόνιο	8,360	18	0,979
Β. Αιγαίο - Κάλυμνος	9,816	18	0,938
Ιόνιο - Κάλυμνος	12,296	18	0,832

M30-60			
Β. Αγαίο - Ιόνιο	19,652	18	0,353
Β. Αγαίο - Κάλυμνος	20,894	14	0,104
Ιόνιο - Κάλυμνος	27,782	18	0,065

M60			
Β. Αιγαίο - Ιόνιο	29,674	18	0,041
Β. Αιγαίο - Κάλυμνος	11,084	14	0,804
Ιόνιο - Κάλυμνος	9,813	18	0,938

Πίνακας 3.17. Αποτελέσματα της γενετικής διαφοροποίησης (F_{ST} values) μεταξύ των ατόμων με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD), σε κάθε γεωγραφική ομάδα. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31- 60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. Δίνονται οι τιμές του δείκτη γενετική απόκλισης F_{ST} (κάτω) και ο βαθμός σημαντικότητας των τιμών (πάνω). ns: p>0,05

Β. Αιγαίο	L30	M30-60	M60
L30		ns	ns
M30-60	0,0066		ns
M60	-0,0039	0,0026	

Ιόνιο	L30	M30-60	M60
L30		ns	ns
M30-60	0,0002		ns
M60	-0,0003	-0,0015	

Κάλυμνος	L30	M30-60	M60
L30		ns	ns
M30-60	0,0015		ns
M60	-0,0108	-0,0122	

Πίνακας 3.18. Αποτελέσματα του Fisher exact test για τον έλεγχο της γονοτυπικής διαφοροποίησης μεταξύ των ατόμων με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD), σε κάθε γεωγραφική ομάδα. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%.

Β. Αιγαίο	**Chi2**	**df**	**p-value**
L30 – M30-60	16,497	18	0,558
L30 – M60	18,678	18	0,412
M30-60 – M60	20,495	16	0,199
Ιόνιο			
L30 – M30-60	14,428	18	0,701
L30 – M60	12,040	18	0,845
M30-60 – M60	14,269	18	0,711
Κάλυμνος			
L30 – M30-60	17,273	16	0,368
L30 – M60	5,726	16	0,991
M30-60 – M60	9,934	14	0,767

3.2.2 Σύγκριση της γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων

Στις διαφορετικές ομάδες των εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων ο μέσος αριθμός των αλληλομόρφων (A) κυμάνθηκε από 9,11 ± 3,02 (Β. Αιγαίο εκτροφής) έως 16,89 ± 5,42 (L30) ενώ η αναμενόμενη ετεροζυγωτία (He) από 0,80 (Β. Αιγαίο εκτροφής) έως 0,86 (L30) (Πίνακας 3.19). Η αλληλική αφθονία (Ar) και ο δραστικός αριθμός αλληλομόρφων (Ae) κυμάνθηκαν από 5,27 ± 1,39 (Β. Αιγαίο εκτροφής) έως 6,22 ± 1,29 (M60) και από 5,38 ± 2,51 (Ιόνιο εκτροφής) έως 9,18 ± 5,64 (L30), αντίστοιχα. Τα δείγματα εκτροφής εμφάνισαν συνολικά μικρότερη γενετική ποικιλότητα σε σχέση με τα άτομα φυσικής προέλευσης (Πίνακας 3.19), εμφανίζοντας μικρότερο αριθμό αλληλομόρφων από τα δείγματα των φυσικών πληθυσμών. Τέλος, για τις διαφορετικές ομάδες, τα επίπεδα παρατηρούμενης ετερωζυγωτίας κυμάνθηκαν στο 0,72-0,76, χαμηλότερα από την αναμενόμενη που ήταν στο 0,80-0,86 ενώ ο συντελεστής ομομιξίας (F_{IS}) κυμάνθηκε από 0,06 ± 0,18 (Β. Αιγαίο εκτροφής) έως 0,14 ± 0,14 (L30). Όλες οι ομάδες εμφάνισαν σημαντική απόκλιση από την ισορροπία Hardy- Weinberg με σημαντική μείωση της ετεροζυγωτίας (Fisher exact test, $p<0,001$). Για κάθε ζεύγος μικροδορυφορικών τόπων, δεν παρατηρήθηκε σημαντική ένδειξη για την ύπαρξη ανισορροπίας σύνδεσης με βάση τη διόρθωση Bonferroni.

Ο έλεγχος της γενετικής ποικιλομορφίας αποκάλυψε σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ εκτρεφόμενων και ατόμων φυσικής προέλευσης ($p<0,05$), με δείκτη συνολικής γενετικής

διαφοροποίησης (Global F_{ST}) ίσο με 0,0097 ($p<0,001$) (Πίνακας 3.20). Εντούτοις, δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων των ατόμων φυσικής προέλευσης με διαφορετικά επίπεδα SRD καθώς και μεταξύ των δειγμάτων εκτροφής του Β. Αιγαίου και του Ιονίου ($p>0,05$, Πίνακας 3.21). Αντίστοιχα, η γονοτυπική διαφοροποίηση μεταξύ των εκτρεφόμενων και των ατόμων φυσικής προέλευσης ήταν σημαντική (Fisher exact test, $p<0,001$). Ωστόσο, δεν υπήρξε διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων φυσικής προέλευσης με διαφορετικά επίπεδα SRD καθώς και μεταξύ των εκτρεφόμενων δειγμάτων ($p>0,05$, Πίνακας 3.21).

Πίνακας 3.19. Βασικές παράμετροι της γενετικής ποικιλομορφίας του συνόλου των ατόμων φυσικής προέλευσης με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) και δύο δειγμάτων εκτροφής. N, αριθμός ατόμων. A, μέσος αριθμός αλληλομόρφων. Ae, δραστικός αριθμός αλληλομόρφων. Ar, αλληλική αφθονία. Ho, He, παρατηρούμενη και αναμενόμενη ετεροζυγωτία. F_{IS}, συντελεστής ομομειξίας. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου.

POP ID	N	A	Ae	Ar	Ho	He	F_{IS}
L30	140	16,89 ± 5,42	9,18 ± 5,64	6,15 ± 1,34	0,74 ± 0,01	0,86 ± 0,03	0,14 ± 0,14
M30-60	92	15,67 ± 7,11	8,89 ± 5,45	6,09 ± 1,44	0,75 ± 0,02	0,85 ± 0,03	0,12 ±0,16
M60	72	14.78 ± 5,36	8,82 ± 5,14	6,22 ± 1,29	0,76 ± 0,02	0,86 ± 0,02	0,12 ± 0,11
IR	27	9,44 ± 2,88	5,38 ± 2,51	5,57 ±1,39	0,72 ± 0,03	0,81 ± 0,03	0,11 ± 0,20
NAR	30	9,11 ± 3,02	5,52 ± 2,33	5,27 ± 1,39	0,76 ± 0.03	0,80 ± 0,04	0,06 ± 0,18
Overall	361	19,33 ± 7,35	9,52 ± 6,25	6,14 ± 1,38	0,75 ± 0,01	0,85 ± 0,03	

Πίνακας 3.20. Αποτελέσματα της γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των ατόμων φυσικής προέλευσης με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) και δύο δειγμάτων εκτροφής. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου. Δίνονται οι τιμές του δείκτη γενετική απόκλισης F_{ST} (κάτω) και ο βαθμός σημαντικότητας των τιμών (πάνω). ns: $p>0,05$, *: $p<0,05$, **: $p<0,01$

All	L30	M30-60	M60	IR	NAR
L30		ns	ns	*	**
M30-60	0,0014		ns	*	**
M60	0,0006	-0,0009		ns	**
IR	0,0274	0,0245	0,0250		ns
NAR	0,0273	0,0248	0,0246	-0,0037	

Πίνακας 3.21. Αποτελέσματα του Fisher exact test για τον έλεγχο της γονοτυπικής διαφοροποίησης μεταξύ των ατόμων φυσικής προέλευσης με διαφορετικό βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) και δύο δειγμάτων εκτροφής. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα εκτροφής Βόρειου Αιγαίου.

All	Chi2	df	p-value
L30 - (M30-60)	26,719	18	0,084
L30 - M60	16,694	18	0,544
(M30-60) - M60	21,413	18	0,259
IR - L30	102,806	18	<0,001
IR - (M30-60)	87,292	18	<0,001
IR - M60	77,693	18	<0,001
NAR - L30	120,418	18	<0,001
NAR - (M30-60)	117,025	18	<0,001
NAR - M60	112,304	18	<0,001
NAR - IR	10,504	18	0,914

3.3 Όρια μορφολογικής διακύμανσης των ωτολίθων και των λεπιών τσιπούρας

Στον έλεγχο των ορίων μορφολογικής διακύμανσης στη τσιπούρα, εξετάστηκε η πλαστικότητα των ωτολίθων ως απόκριση στη θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης από το στάδιο της μεταμόρφωσης έως το στάδιο του ιχθυδίου, καθώς και στο διαφορετικό περιβάλλον ανάπτυξης των ιχθυδίων και ενήλικων ατόμων. Στον έλεγχο της εξέλιξης του βαθμού αναγέννησης των λεπιών, εξετάστηκε η επίδραση της ηλικίας και του διαφορετικού περιβάλλοντος ανάπτυξης των εκτρεφόμενων πληθυσμών από το στάδιο της μεταμόρφωσης έως το τέλος της περιόδου πάχυνσης στα κλουβιά.

3.3.1 Επίδραση της θερμοκρασίας πρώιμης ανάπτυξης στη μορφολογία των ωτολίθων πειραματικών πληθυσμών τσιπούρας

3.3.1.1 Τέλος σταδίου μεταμόρφωσης (56-58 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph)

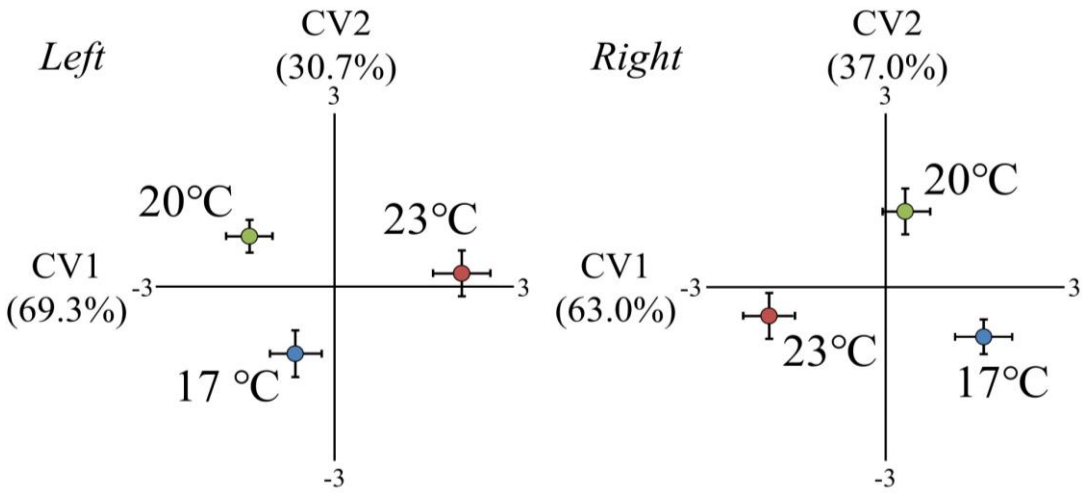
Κατά το τέλος της μεταμόρφωσης (56-58 dph), η θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης είχε σημαντική επίδραση στο μέγεθος των ψαριών, με την ομάδα των 23°C (2,2 ± 0,1 cm μέσο τυπικό μήκος, SL) να εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερο μέγεθος (ANOVA, $p<0,001$) σε σχέση με τις άλλες θερμοκρασιακές ομάδες (17°C: 2,0 ± 0 ,2 cm μέσο SL, 20°C: 2,0 ± 0,2 cm μέσο SL).

Η ανάλυση κανονικών μεταβλητών έδειξε ότι το σχήμα των ωτολίθων διέφερε σημαντικά ανάλογα με τη θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης των ατόμων τσιπούρας στο στάδιο της μεταμόρφωσης τόσο για την αριστερή (Wilks' λ: 0,2126, $p<0,05$) όσο και για τη δεξιά (Wilks' λ: 0,1124 $p<0,001$) πλευρά του σώματος. Με βάση τα τετράγωνα των αποστάσεων Mahalanobis, υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση της ομάδας των 23°C σε σχέση με τις άλλες δύο θερμοκρασιακές ομάδες για τη δεξιά πλευρά του σώματος ($p<0,05$, Πίνακας 3.22). Για την

αριστερή πλευρά, η διαφοροποίηση περιορίστηκε μόνο μεταξύ των ομάδων 23°C και 20°C ($p<0,05$). Ο πρώτος άξονας κανονικών μεταβλητών (CV1), όπου εξήγησε το 69,3% και το 63,0% της συνολικής διακύμανσης σχήματος για την αριστερή και τη δεξιά πλευρά αντίστοιχα, διέκρινε την ομάδα των 23°C από τις ομάδες των 17 και 20°C και για τις δύο πλευρές του σώματος (Εικόνα 3.19). Κατά μήκος του δεύτερου άξονα κανονικών μεταβλητών (CV2), όπου εξήγησε το 30.7% και το 37% της συνολικής διακύμανσης του σχήματος για την αριστερή και τη δεξιά πλευρά αντίστοιχα, η σημαντικότερη διαφοροποίηση παρουσιάστηκε μεταξύ των 17 και 20°C και για τις δύο πλευρές του σώματος, με την ομάδα των 23°C να κατανέμεται στο ενδιάμεσο (Εικόνα 3.19). Η μέση διαμόρφωση του σχήματος των ωτολίθων για την κάθε ομάδα έδειξε ότι, η ομάδα των 23°C συγκριτικά με τις ομάδες των 17 και 20°C, εμφάνισε εντονότερη εγκόλπωση (*notch*) στη προσθιο-ραχιαία περιοχή (μεταξύ *rostrum & antirostrum*) της επιφάνειας του ωτολίθου καθώς και πλατύτερη επιφάνεια της οπίσθιας περιοχής και για τις δύο πλευρές του σώματος (Εικόνα 3.20).

Ο έλεγχος της ασυμμετρίας για το δείκτη FA_1 (Barlett test) έδειξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων ψαριών με διαφορετική θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης ως προς την ασυμμετρία των ωτολίθων ($p<0,05$, Εικόνα 3.21). Συγκεκριμένα, η ομάδα των 23°C εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερη κυμαινόμενη ασυμμετρία (FA) σε σχέση με τις ομάδες των 17 και 20°C ως προς την επιφάνεια (O_S) και την αρμονική 5 (H_5). Για την αρμονική H_5 η ομάδα των 20°C εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερη FA σε σχέση με την ομάδα των 17°C. Ο έλεγχος για το δείκτη FA_2 (Kruskal-Wallis test) δεν έδειξε κάποια σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των πειραματικών ομάδων ως προς την ασυμμετρία των υπό εξέταση μορφολογικών χαρακτήρων ($p>0,05$, Εικόνα 3.22).

Μεταξύ των ομάδων με διαφορετική θερμοκρασίας πρώιμης ανάπτυξης δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση ως προς τις κανονικοποιημένες τιμές των μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους του ωτολίθου ($z\text{-}O_S$, $z\text{-}O_P$, $z\text{-}O_L$, $z\text{-}O_D$) κατά το τέλος του σταδίου της μεταμόρφωσης (Kruskal-Wallis test, $p>0,05$) (Πίνακας $\Pi_{3.1}$, Παράρτημα 3).



Εικόνα 3.19. Επίδραση της θερμοκρασίας πρώιμης ανάπτυξης (17, 20, 23°C) στο σχήμα των ωτολίθων τσιπούρας στο στάδιο της μεταμόρφωσης (56-58 μέρες μετά την εκκόλαψη). Δίνεται η μέση τιμή (±2SE) για την κάθε κανονική μεταβλητή (CV1-CV2) ανά θερμοκρασία. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο ποσοστό της διακύμανσης του σχήματος που εξηγεί ο κάθε άξονας κανονικών μεταβλητών (CV).

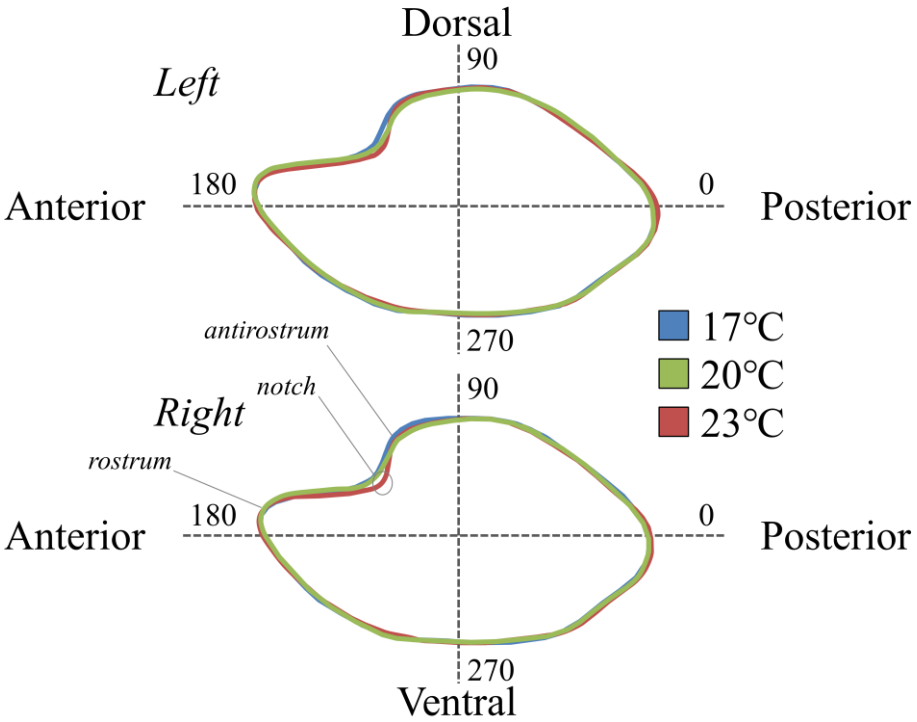
Πίνακας 3.22. Αποτελέσματα της ανάλυσης CVA για τη σημαντικότητα των διαφορών στο σχήμα των ωτολίθων μεταξύ των ομάδων με διαφορετική θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης (17, 20, 23°C) που συλλέχθηκαν κατά το τέλος της μεταμόρφωσης (56-58 μέρες μετά την εκκόλαψη). Δίνονται οι βαθμοί σημαντικότητας (πάνω) και το τετράγωνο των αποστάσεων Mahalanobis (κάτω) για την κάθε πλευρά του σώματος. **: p<0,05, **: p<0,01, ns: p>0,05*

Αριστερά

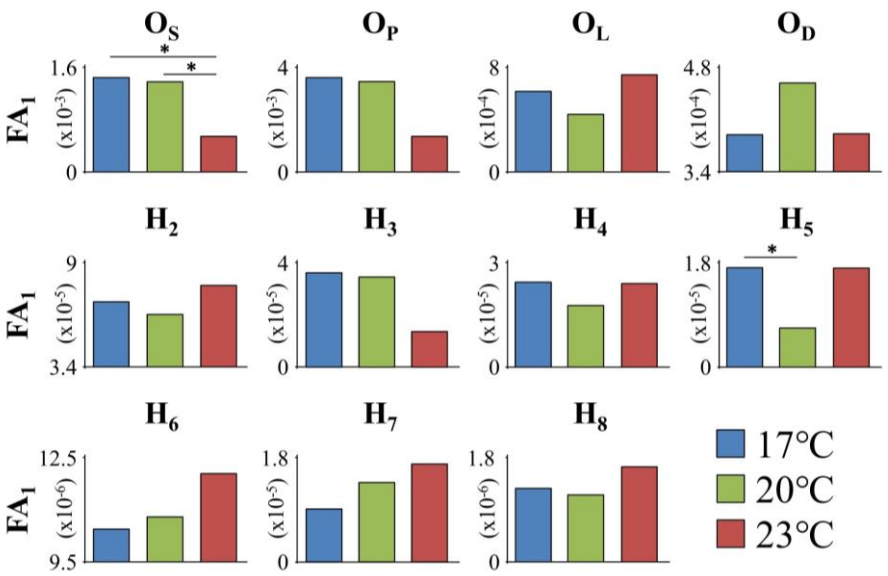
DT°C	17	20	23
17		ns	ns
20	4,5814		*
23	7,3490	9,2801	

Δεξιά

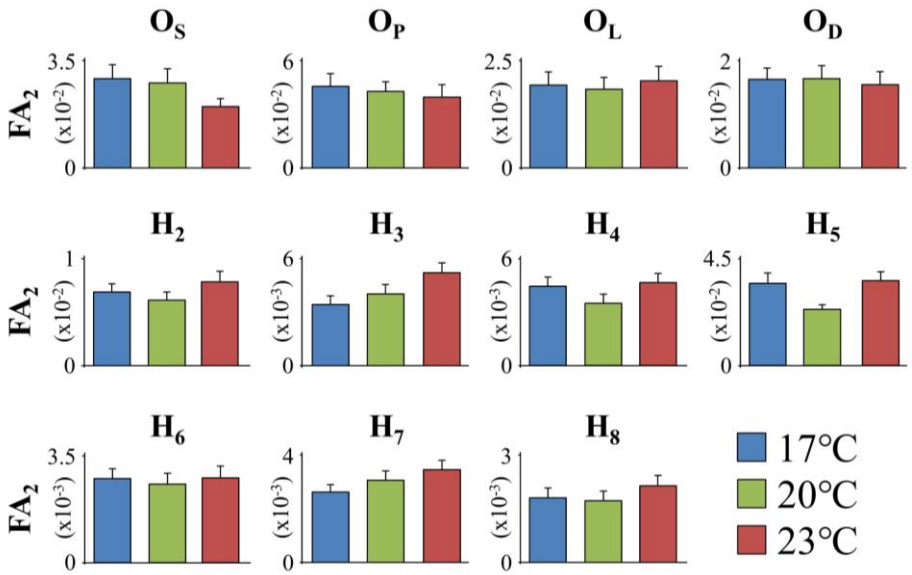
DT°C	17	20	23
17		ns	**
20	9,5028		*
23	13,8358	11,6904	



Εικόνα 3.20. Μέση διαμόρφωση του σχήματος των αριστερών (πάνω) και δεξιών (κάτω) ωτολίθων τσιπούρας από τις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες (17, 20, 23°C) στο στάδιο της μεταμόρφωσης (56-58 μέρες μετά την εκκόλαψη), όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση Fourier.



Εικόνα 3.21. Δείκτης ασυμμετρίας (FA_1) των ωτολίθων των 3 πειραματικών ομάδων (17, 20, 23°C) στο στάδιο της μεταμόρφωσης (56-58 μέρες μετά την εκκόλαψη). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων συμβολίζεται με *($p<0,05$).



Εικόνα 3.22. Δείκτης ασυμμετρίας (FA_2, +SE) των ωτολίθων των 3 πειραματικών ομάδων (17, 20, 23°C) στο στάδιο της μεταμόρφωσης (56-58 μέρες μετά την εκκόλαψη). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8.

3.3.1.2 Στάδιο ιχθυδίου (93-95 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph)

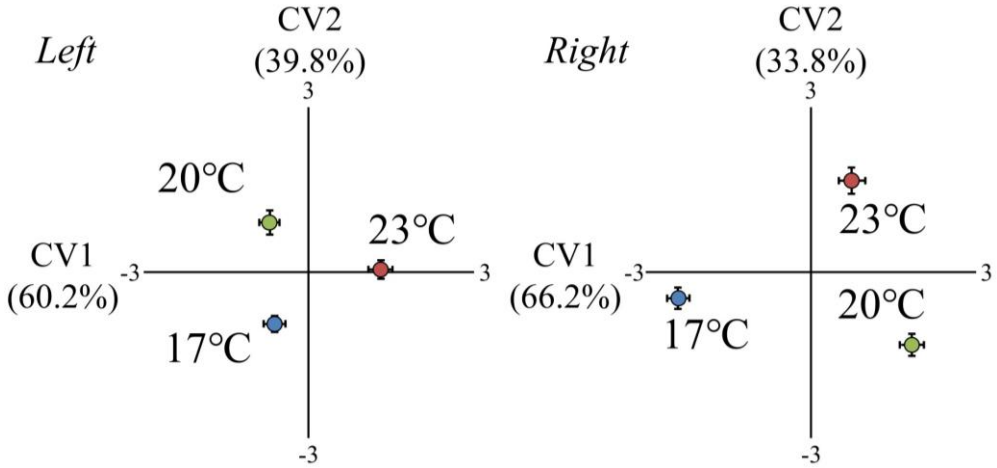
Στο στάδιο του ιχθυδίου, δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση ως προς το σωματικό μέγεθος (ANOVA, $p>0,05$) μεταξύ των ομάδων των ατόμων με διαφορετική θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης (17°C: 3,2 ± 0,3 cm μέσο SL, 20°C: 3,2 ± 0,3 cm μέσο SL, 23°C: 3,1 ± 0,3 cm μέσο SL).

Η ανάλυση κανονικών μεταβλητών έδειξε ότι το σχήμα των ωτολίθων διέφερε σημαντικά ανάλογα με τη θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης των ατόμων τσιπούρας στο στάδιο του ιχθυδίου (93-95 dph) για τη δεξιά πλευρά του σώματος (Wilks' λ: 0,1453, $p<0,01$), ενώ δεν υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση για την αριστερή (Wilks' λ: 0,3324, $p>0,05$). Με βάση τα τετράγωνα των αποστάσεων Mahalanobis για τη δεξιά πλευρά του σώματος, η ομάδα των 17°C διέφερε σημαντικά από τις ομάδες των 20°C και 23°C ($p<0,05$, Πίνακας 3.23). Για την αριστερή πλευρά του σώματος, κατά μήκος του πρώτου άξονα (CV1, εξήγησε το 60,2% της συνολικής διακύμανσης του σχήματος) διαφοροποιήθηκε η ομάδα των 23°C από τις υπόλοιπες ενώ ο CV2 (εξήγησε το 39,8% της συνολικής διακύμανσης του σχήματος) διέκρινε την ομάδα των 17°C από την ομάδα των 20°C (Εικόνα 3.23). Για τη δεξιά πλευρά του σώματος, ο πρώτος άξονας κανονικών μεταβλητών (CV1, εξήγησε το 66,2% της συνολικής διακύμανσης του σχήματος) διέκρινε την ομάδα των 17°C από τις ομάδες των 20 και 23°C, ενώ στο δεύτερο άξονα (CV2, εξήγησε το 33,8% της συνολικής διακύμανσης του σχήματος) διαφοροποιήθηκε η ομάδα των 23°C από τις υπόλοιπες (Εικόνα 3.23). Η μέση διαμόρφωση του σχήματος των δεξιών ωτολίθων έδειξε μικρές επιμέρους διαφοροποιήσεις μεταξύ των ομάδων, με την ομάδα των 23°C να εμφανίζει συγκριτικά πλατύτερη επιφάνεια ωτολίθου σε κατά τόπους περιοχές της περιμέτρου (Εικόνα 3.24).

Ο έλεγχος της ασυμμετρίας για το δείκτη FA_1 έδειξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των ομάδων με διαφορετική θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης, με την ομάδα των 23°C να αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα ασυμμετρίας των ωτολίθων της στο στάδιο του ιχθυδίου ($p<0,05$, Εικόνα 3.25) (συγκριτικά με το στάδιο της μεταμόρφωσης). Συγκεκριμένα, η ομάδα των 23°C εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη ασυμμετρία μεγέθους και σχήματος είτε από τους 17°C (O_S, O_P), είτε από τους 20°C (O_L, H_2), είτε και από τις δύο ομάδες ταυτόχρονα (H_4) (Εικόνα 3.25). Το μέγιστο μήκος του ωτολίθου (O_L) και η αρμονική 4 (H_4) εμφάνισαν κατευθυνόμενη ασυμμετρία (DA), ενώ η περίμετρος (O_P) και η αρμονική 2 (H_2) εμφάνισαν κυμαινόμενη ασυμμετρία (FA). Τέλος, η επιφάνεια του ωτολίθου (O_S) εμφάνισε αντισυμμετρία (Ant). Ο έλεγχος της ασυμμετρίας για το δείκτη FA_2 (Kruskal-Wallis test) έδειξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των πειραματικών ομάδων, με την ομάδα των 23°C να εμφανίζει συνολικά μεγαλύτερα επίπεδα (Εικόνα 3.26). Συγκεκριμένα, για την αρμονική 4 (H_4, DA), η ομάδα των 23°C εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη

ασυμμετρία σε σχέση με τις ομάδες των 17°C και 20°C. Στην αρμονική 2 (H_2, FA) οι 23°C είχαν σημαντικά μεγαλύτερη ασυμμετρία σχήματος σε σχέση με τους 20°C. Τέλος, για το μέγιστο μήκος (O_L, DA), η ομάδα των 17°C εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη ασυμμετρία από την ομάδα των 20°C.

Το Kruskal-Wallis test δεν έδειξε σημαντική διαφοροποίηση ($p>0,05$) μεταξύ των ομάδων των ιχθυδίων με διαφορετική θερμοκρασίας πρώιμης ανάπτυξης ως προς τις κανονικοποιημένες τιμές των μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους των ωτολίθων (O_S^*, O_P^*, O_L^*, O_D^*) (Πίνακας $Π_{3.2}$, Παράρτημα 3).



Εικόνα 3.23. Επίδραση της θερμοκρασίας πρώιμης ανάπτυξης (17, 20, 23°C) στο σχήμα των ωτόλιθων τσιπούρας στο στάδιο του ιχθυδίου (93-95 μέρες μετά την εκκόλαψη). Δίνεται η μέση τιμή (±2SE) για την κάθε κανονική μεταβλητή (CV1-CV2) ανά θερμοκρασία. Οι αριθμοί στις παρενθέσεις αντιστοιχούν στο ποσοστό της διακύμανσης του σχήματος που εξηγεί ο κάθε άξονας κανονικών μεταβλητών (CV).

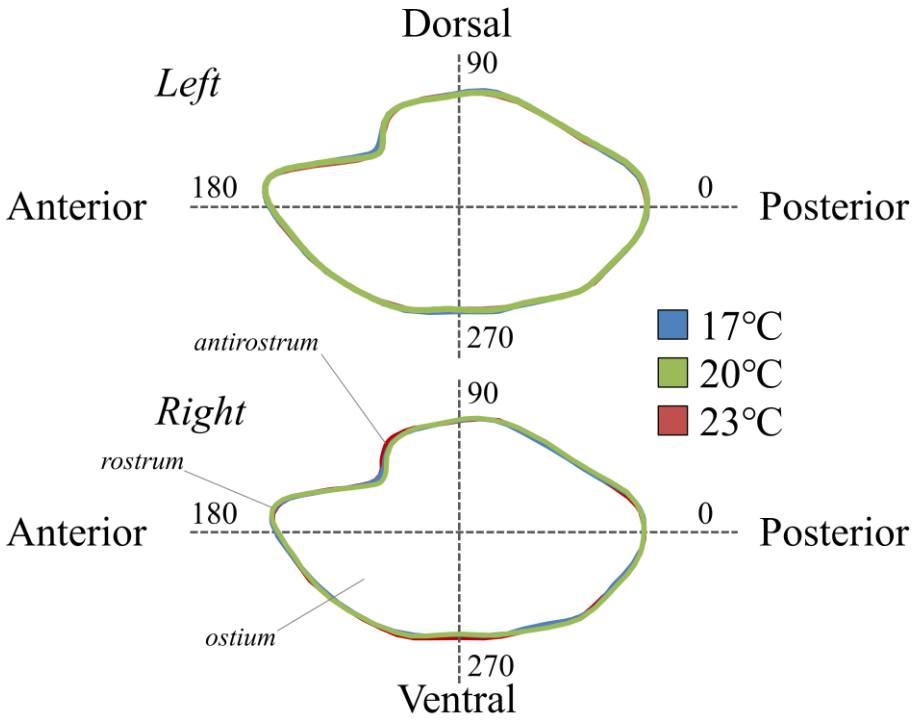
Πίνακας 3.23. Αποτελέσματα της ανάλυσης CVA για τη σημαντικότητα των διαφορών στο σχήμα των ωτολίθων μεταξύ των ομάδων διαφορετικής θερμοκρασίας πρώιμης ανάπτυξης (17, 20, 23°C) που συλλέχθηκαν στο στάδιο του ιχθυδίου (93-95 μέρες μετά την εκκόλαψη). Δίνονται οι βαθμοί σημαντικότητας (πάνω) και το τετράγωνο των αποστάσεων Mahalanobis (κάτω) για την κάθε πλευρά του σώματος. **: p<0,05, **: p<0,01, ns: p>0,05*

Αριστερά

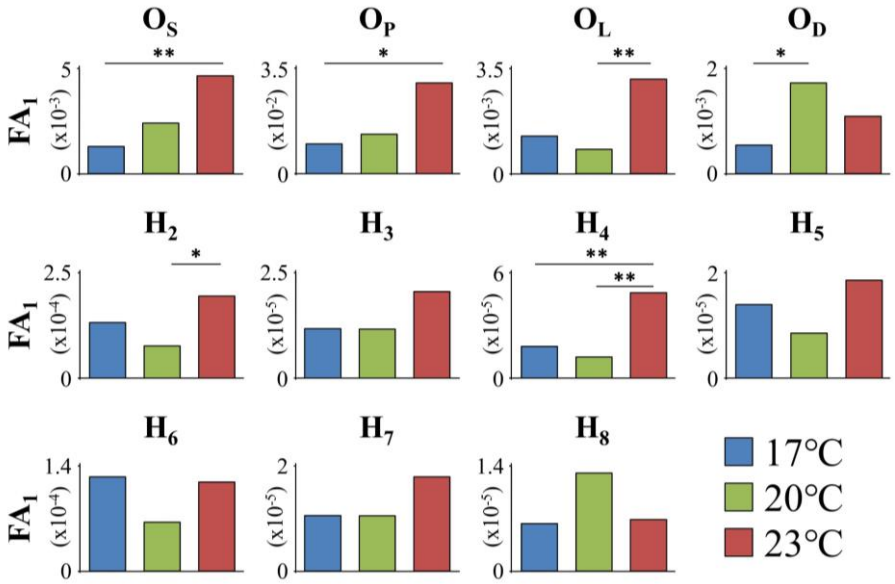
DT°C	17	20	23
17		ns	ns
20	3,4219		ns
23	4,6739	4,7971	

Δεξιά

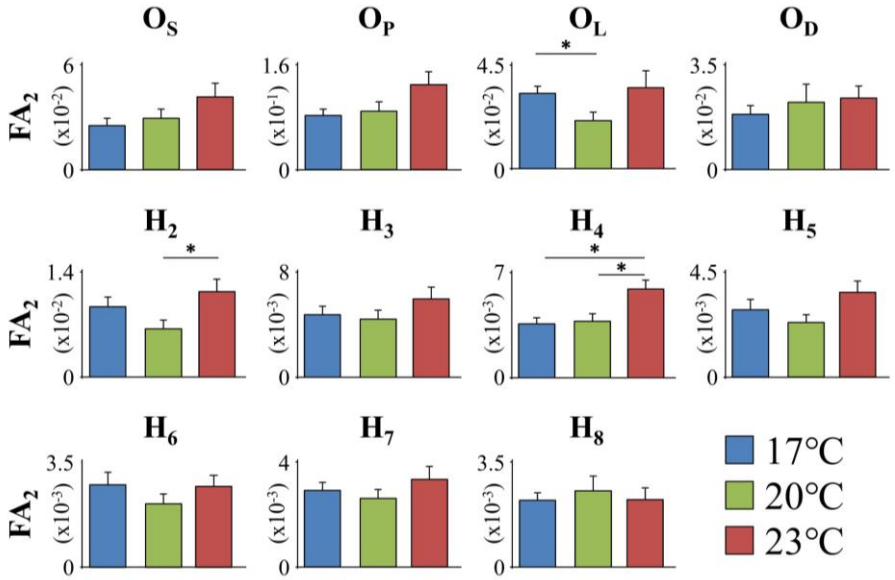
DT°C	17	20	23
17		**	*
20	12,4194		ns
23	9,8279	6,9628	



Εικόνα 3.24. Μέση διαμόρφωση του σχήματος των αριστερών (πάνω) και δεξιών (κάτω) ωτολίθων τσιπούρας από τις διαφορετικές θερμοκρασιακές συνθήκες (17, 20, 23°C) κατά το στάδιο του ιχθυδίου (93-95 μέρες μετά την εκκόλαψη), όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση Fourier.



Εικόνα 3.25. Δείκτης ασυμμετρίας (FA_1) των ωτολίθων των 3 πειραματικών ομάδων ψαριών (17, 20, 23°C) κατά το στάδιο του ιχθυδιου (93-95 μέρες μετά την εκκόλαψη). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων συμβολίζεται με *($p<0,05$), **($p<0,01$).

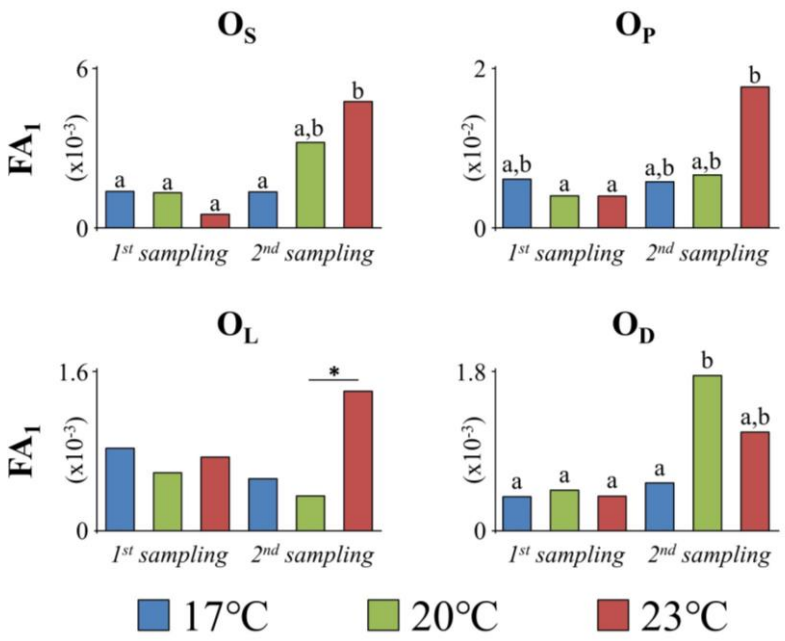


Εικόνα 3.26. Δείκτης ασυμμετρίας (FA_2,+SE) των ωτολίθων των 3 πειραματικών ομάδων ψαριών (17, 20, 23°C) κατά το στάδιο του ιχθυδιου (93-95 μέρες μετά την εκκόλαψη).. O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων συμβολίζεται με *($p<0,05$), **($p<0,01$).

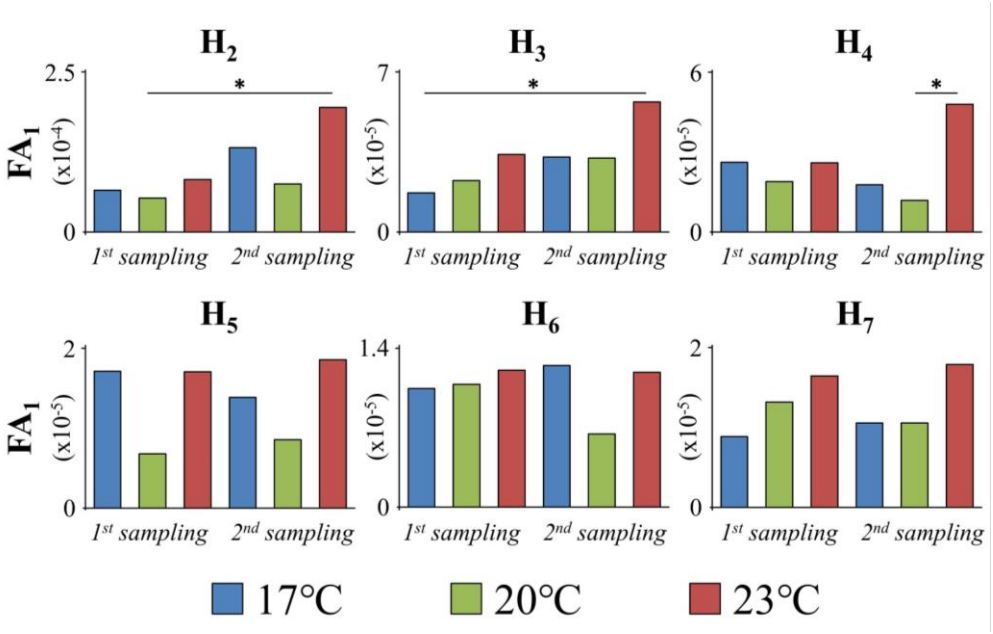
3.3.1.3 Εξέλιξη της ασυμμετρίας των ωτολίθων από το τέλος του σταδίου της μεταμόρφωσης έως το στάδιο του ιχθυδίου

Ο έλεγχος της εξέλιξης της ασυμμετρίας για το δείκτη FA_1 από το τέλος της μεταμόρφωσης (2,0 cm μέσο τυπικό μήκος, SL) έως το στάδιο του ιχθυδίου (3,1 cm μέσο SL), αποκάλυψε σημαντική επίδραση της θερμοκρασίας πρώιμης ανάπτυξης στους μορφολογικούς χαρακτήρες μεγέθους των ωτολίθων ($p<0,01$, Εικόνα 3.27). Συγκεκριμένα, η ομάδα των 23°C εμφάνισε αναστροφή των επιπέδων ασυμμετρίας των ωτολίθων της, με σημαντική αύξηση των επιπέδων μεταξύ των σταδίων της μεταμόρφωσης και του ιχθυδίου (Εικόνα 3.27). Η επιφάνεια (O_S) και η περίμετρος (O_P) εμφάνισαν αντισυμμετρία (Ant) ενώ το μέγιστο μήκος (O_L) κατευθυνόμενη ασυμμετρία (DA). Το μέγιστο πλάτος (O_D) εμφάνισε κυμαινόμενη ασυμμετρία (FA), τα επίπεδα της οποίας αυξήθηκαν σημαντικά στην ομάδα των 20°C κατά το στάδιο του ιχθυδίου. Επιπλέον, η θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης επέδρασε σημαντικά στην εξέλιξη της ασυμμετρίας τριών μορφολογικών χαρακτήρων σχήματος για τον δείκτη FA_1 ($p<0,05$, Εικόνα 3.28). Συγκεκριμένα, για τις αρμονικές 2 (FA), 3 (DA) και 4 (DA) τα επίπεδα ασυμμετρίας της ομάδας των 23°C αυξήθηκαν σημαντικά από το στάδιο της μεταμόρφωσης έως το στάδιο του ιχθυδίου, σε σχέση με τις άλλες δύο θερμοκρασιακές ομάδες (Εικόνα 3.28).

Ο έλεγχος της οντογενετικής πορείας της ασυμμετρίας για το δείκτη FA_2 δεν έδειξε σημαντική διαφοροποίηση στην εξέλιξη της, μεταξύ των ομάδων με διαφορετική θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης ($p>0,05$, Kruskal-Wallis test) ως προς τους υπό εξέταση μορφολογικούς χαρακτήρες μεγέθους και σχήματος (Εικόνα $Π_4$, Πίνακας $Π_4$, Παράρτημα 4).



Εικόνα 3.27. Εξέλιξη της ασσυμετρίας μεγέθους (δείκτης FA_1) των ωτολίθων τσιπούρας από το τέλος του σταδίου της μεταμόρφωσης (1st sampling) στο στάδιο του ιχθυδίου (2nd sampling) των 3 πειραματικών ομάδων με διαφορετική θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης (17°C, 20°C, 23°C). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος. Οι τιμές χωρίς κοινό γράμμα είναι στατιστικά διαφορετικές ($p < 0,05$). *$p<0,05$



Εικόνα 3.28. Εξέλιξη της ασσυμετρίας σχήματος (δείκτης FA_1) των ωτολίθων τσιπούρας από το τέλος του σταδίου της μεταμόρφωσης (1st sampling) στο στάδιο του ιχθυδίου (2nd sampling) των 3 πειραματικών ομάδων με διαφορετική θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης (17°C, 20°C, 23°C). H_2-H_7: αρμονικές 2-7. Οι τιμές χωρίς κοινό γράμμα είναι στατιστικά διαφορετικές ($p<0,05$). *:$p<0,05$

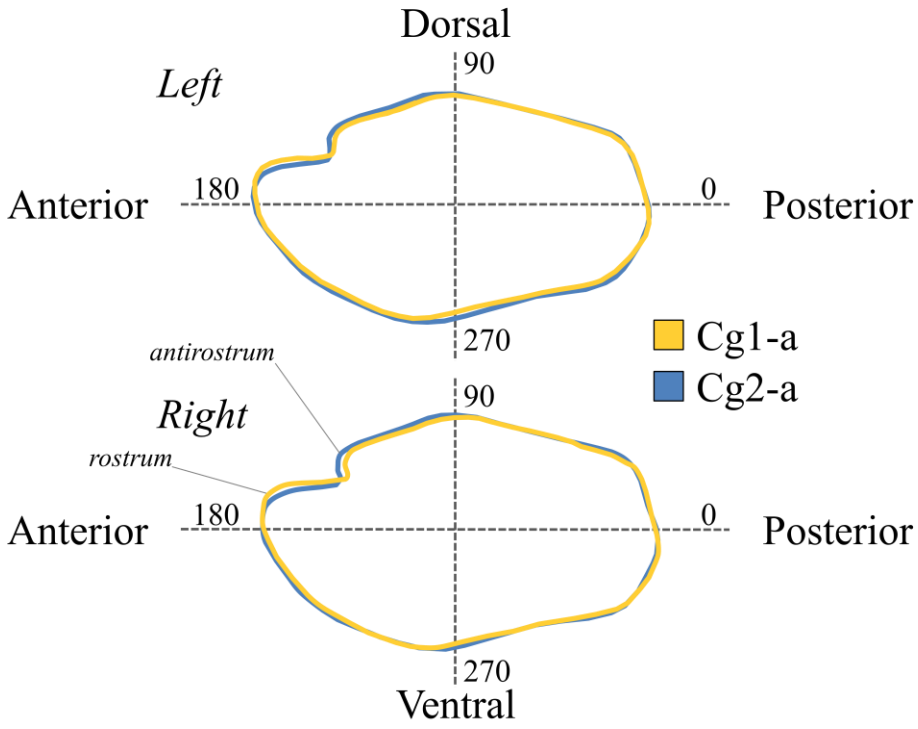
3.3.2 Επίδραση του περιβάλλοντος εκτροφής στη μορφολογία των ωτολίθων πληθυσμών τσιπούρας κατά την περίοδο της σωματικής τους αύξησης

3.3.2.1 Μέσο της περιόδου πάχυνσης (136-165 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph)

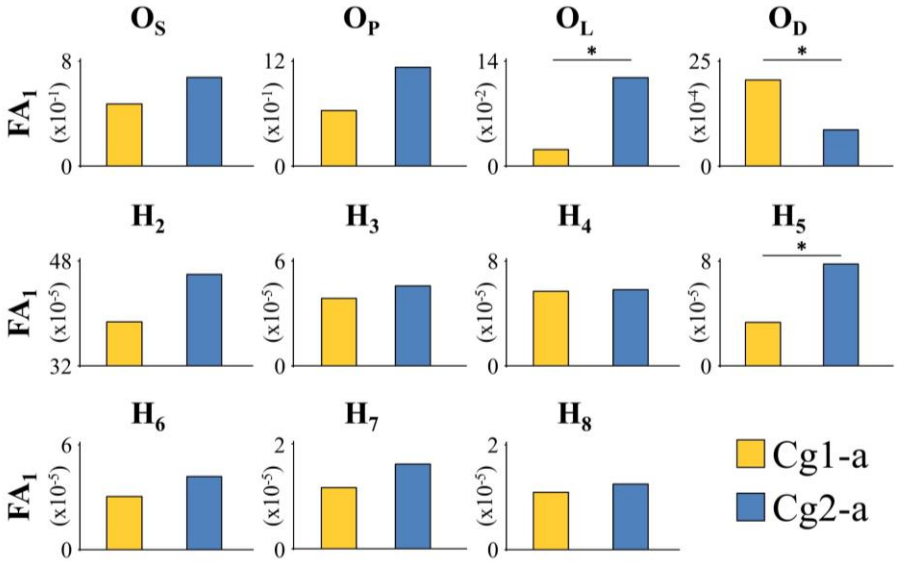
Κατά το μέσο της περιόδου πάχυνσης (136-165 dph), οι πληθυσμοί τσιπούρας από τα γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα ανάπτυξης διέφεραν σημαντικά ως προς το σχήμα των ωτολίθων τους μόνο για τη δεξιά πλευρά του σώματος (Wilks' λ: 0,0493, $p<0,001$). Η οπτική απεικόνιση του μέσου σχήματος των ωτολίθων αποκάλυψε διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών κυρίως στη προσθιο-ραχιαία περιοχή (*rostrum & antirostrum*) και για τις δύο πλευρές του σώματος (Εικόνα 3.29).

Ο έλεγχος της ασυμμετρίας των ωτολίθων έδειξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών τσιπούρας (Cg1, Cg2) σε τρεις μορφολογικούς χαρακτήρες και για τους δύο δείκτες (FA_1 & FA_2) ασυμμετρίας ($p<0,05$, Εικόνα 3.30, Εικόνα 3.31). Συγκεκριμένα το μέγιστο μήκος (O_L) εμφάνισε αντισυμμετρία (Ant), με το Cg2 να έχει σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα σε σχέση με το Cg1. Αντίθετα, το μέγιστο πλάτος (O_D) εμφάνισε κυμαινόμενη ασυμμετρία (FA), με το Cg1 να έχει σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα σε σχέση με το Cg2. Τέλος η αρμονική (H_5) εμφάνισε FA, με το Cg2 να παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα από το Cg1.

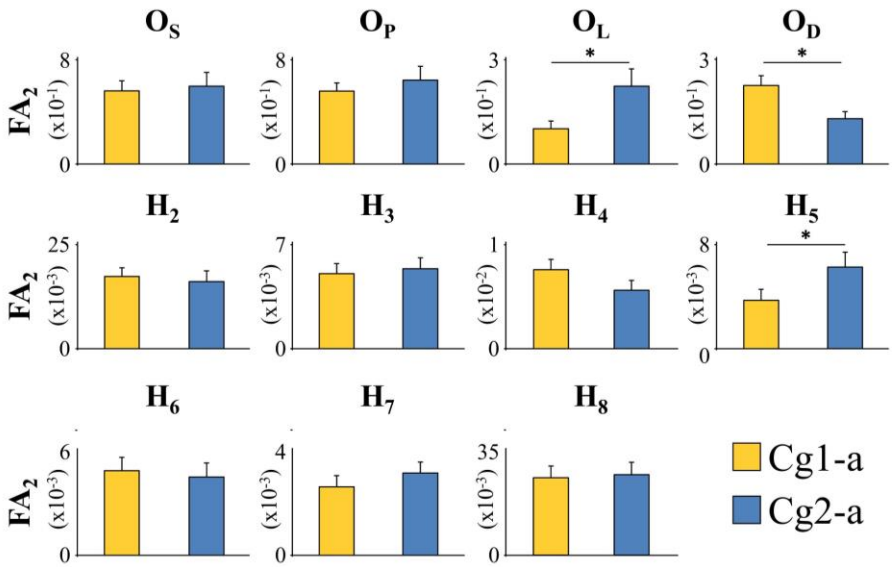
Ο έλεγχος των κανονικοποιημένων τιμών των μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους έδειξε σημαντικά μεγαλύτερο μέγιστο μήκος (O_L^*) ωτολίθων στο Cg1 συγκριτικά με το Cg2 και για τις δύο πλευρές του σώματος ($p<0,05$, Εικόνα 3.32).



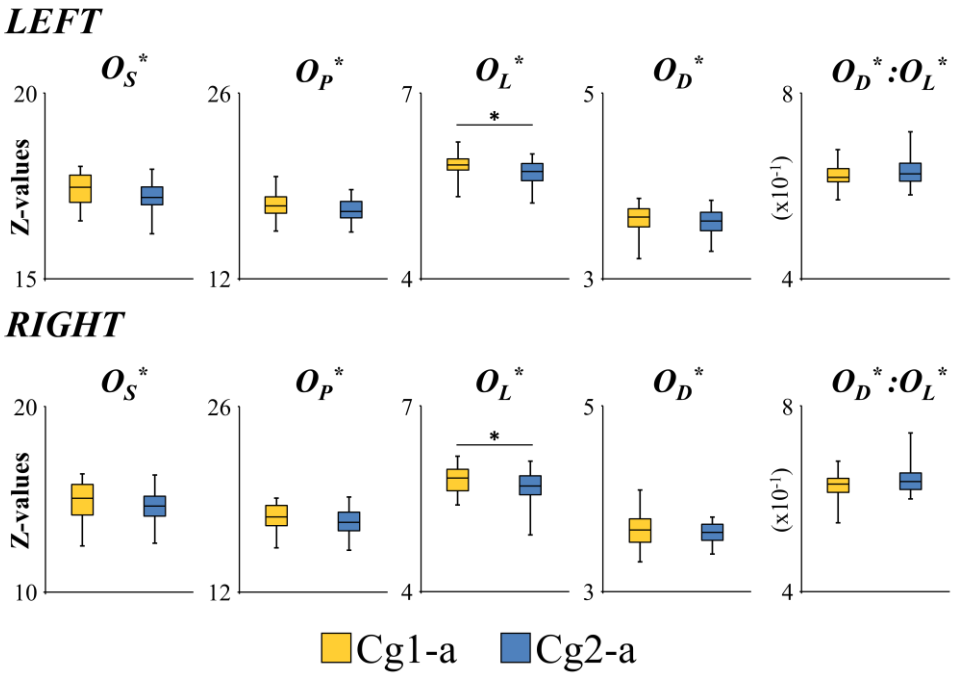
Εικόνα 3.29. Μέση διαμόρφωση του σχήματος των αριστερών (πάνω) και δεξιών (κάτω) ωτόλιθων τσιπούρας (Cg1-a, Cg2-a) κατά το μέσο της περιόδου πάχυνσης (136-165 μέρες μετά την εκκόλαψη) από δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2), όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση Fourier.



Εικόνα 3.30. Δείκτης ασυμμετρίας των ωτολίθων (FA_1) δειγμάτων τσιπούρας (Cg1-a, Cg2-a) που πάρθηκαν κατά το μέσο της περιόδου πάχυνσης (136-165 μέρες μετά την εκκόλαψη) από δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων συμβολίζεται με *($p<0,05$).



Εικόνα 3.31. Δείκτης ασυμμετρίας των ωτολίθων (FA_2, +SE) δειγμάτων τσιπούρας (Cg1-a, Cg2-a) που πάρθηκαν κατά το μέσο της περιόδου πάχυνσης (136-165 μέρες μετά την εκκόλαψη) από δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων συμβολίζεται με *($p<0,05$).



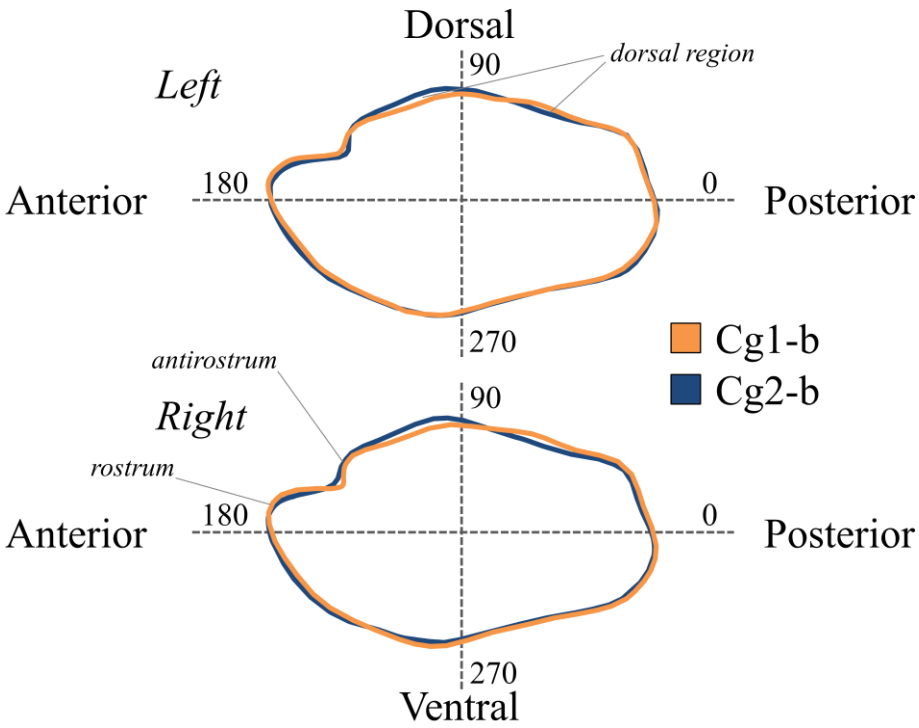
Εικόνα 3.32. Box plots (—, διάμεσος; □, 25 and 75% εκατοστημόρια; I, υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές) των κανονικοποιημένων τιμών μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους ωτολίθου (Z-values) για τα δείγματα τσιπούρας (Cg1-a, Cg2-a) που πάρθηκαν κατά το μέσο της περιόδου πάχυνσης (136-165 dph) από δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων συμβολίζεται με *($p<0,05$).

3.3.2.2 Τέλος της παραγωγής (314-393 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph)

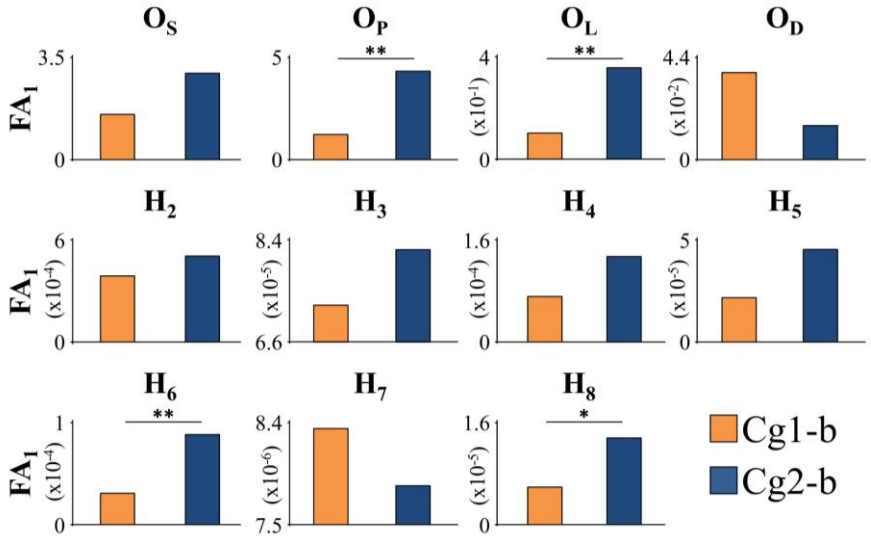
Κατά το τέλος της παραγωγής των εκτρεφόμενων ιχθύων (314-393 dph), οι πληθυσμοί τσιπούρας από τα δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα ανάπτυξης διέφεραν σημαντικά ως προς το σχήμα των ωτολίθων τους τόσο για τη αριστερή (Wilks' λ: 0,0483, $p<0,01$) όσο και για τη δεξιά (Wilks' λ: 0,0575, $p<0,05$) πλευρά του σώματος. Η οπτική απεικόνιση του μέσου σχήματος των ωτολίθων για κάθε πληθυσμό, έδειξε διαφοροποίηση κατά μήκος της ραχιαίας περιοχής της επιφάνειας των ωτολίθου και για τις δύο πλευρές του σώματος (Εικόνα 3.33).

Ο έλεγχος της ασυμμετρίας των ωτολίθων για το δείκτη FA_1 αποκάλυψε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών τσιπούρας (Cg1, Cg2) για τέσσερις μορφολογικούς χαρακτήρες (O_P, O_L, H_6, H_8). Συγκεκριμένα, το Cg2 εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη κυμαινόμενη ασυμμετρία (FA) μεγέθους και σχήματος από το Cg1 ($p<0,05$, Εικόνα 3.34). Για τους υπό εξέταση μορφολογικούς χαρακτήρες, ο έλεγχος της ασυμμετρίας των ωτολίθων μέσω του δείκτη FA_2 δεν έδειξε κάποια σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών ($p>0,05$, Εικόνα 3.35).

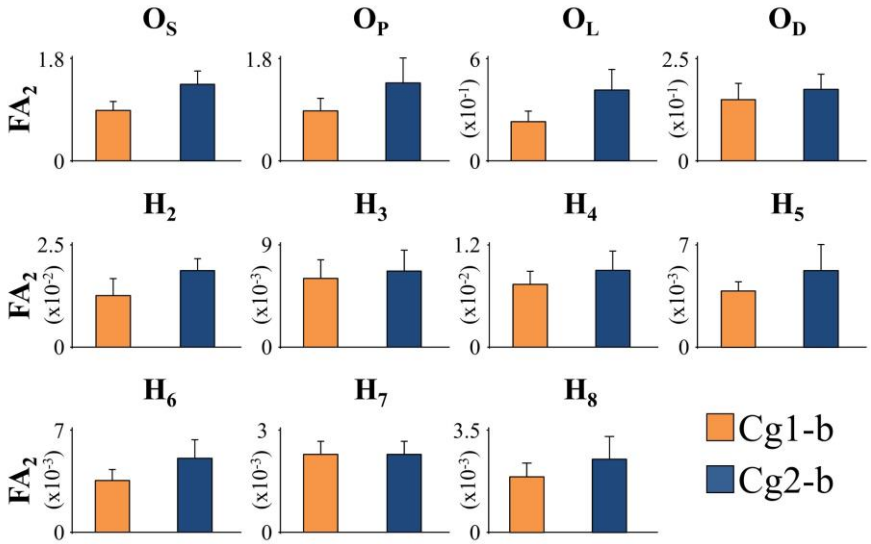
Ο έλεγχος των κανονικοποιημένων τιμών των μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους έδειξε σημαντικά μεγαλύτερη επιφάνεια (O_S^*) ωτολίθων στο Cg1 συγκριτικά με το Cg2 για τη δεξιά πλευρά του σώματος ($p<0,05$, Εικόνα 3.36).



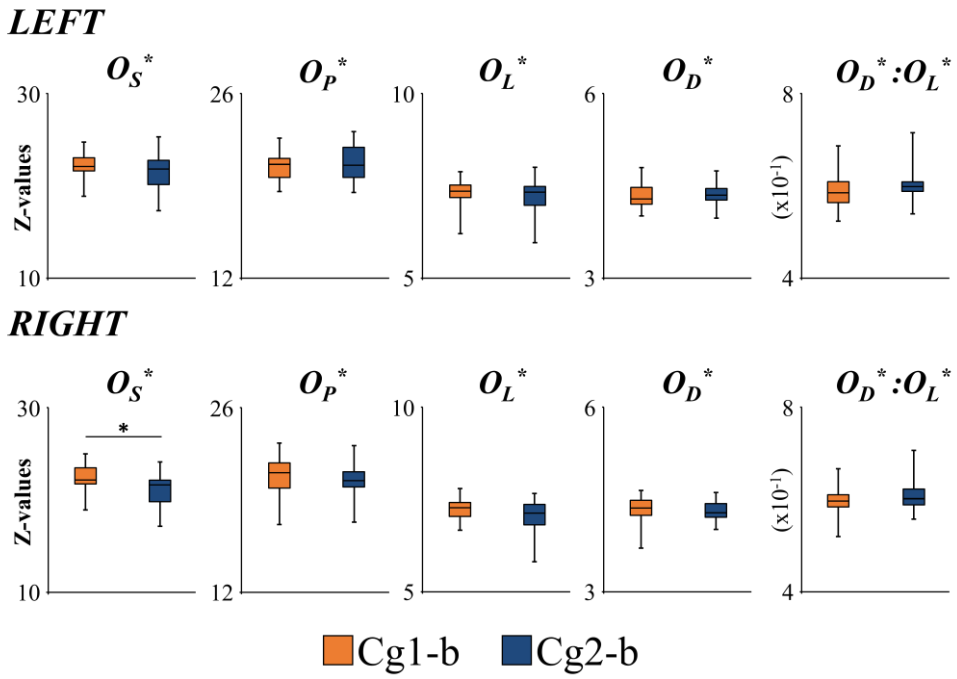
Εικόνα 3.33. Μέση διαμόρφωση του σχήματος των αριστερών (πάνω) και δεξιών (κάτω) ωτόλιθων τσιπούρας κατά το τέλος της παραγωγής (314-393 μέρες μετά την εκκόλαψη) από δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2), όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση Fourier.



Εικόνα 3.34. Δείκτης ασυμμετρίας (FA_1) των ωτολίθων δειγμάτων τσιπούρας (Cg1-b, Cg2-b) που πάρθηκαν κατά το τέλος της παραγωγής (314-393 μέρες μετά την εκκόλαψη) από δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων συμβολίζεται με *($p<0,5$), **($p<0,01$).



Εικόνα 3.35. Δείκτης ασυμμετρίας (FA_2, +SE) των ωτολίθων δειγμάτων τσιπούρας (Cg1-b, Cg2-b) που πάρθηκαν κατά το τέλος της παραγωγής (314-393 μέρες μετά την εκκόλαψη) από δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8.



Εικόνα 3.36. Box plots (—, διάμεσος; □, 25 and 75% εκατοστημόρια; I, υψηλότερες και χαμηλότερες τιμές) των κανονικοποιημένων τιμών των μορφολογικών χαρακτήρων μεγέθους ωτολίθου (Z-values) για τα δείγματα τσιπούρας (Cg1-b, Cg2-b) που πάρθηκαν κατά το τέλος της παραγωγής (314-393 μέρες μετά την εκκόλαψη) από δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος. Η σημαντικότητα των διαφορών μεταξύ των ομάδων συμβολίζεται με *($p<0,05$).

3.3.2.3 Εξέλιξη του σχήματος των ωτολίθων από το στάδιο του ιχθυδίου μέχρι το ενήλικο

Ο έλεγχος της εξέλιξης του σχήματος των ωτολίθων με την αύξηση των ατόμων, από το στάδιο του ιχθυδίου (Ht-c) μέχρι το ενήλικο στάδιο (εμπορικό μέγεθος: Cg1-b, Cg2-b), έδειξε σημαντική διαφοροποίηση ανάλογα με το περιβάλλον ανάπτυξης των ιχθυδίων (Cg1, Cg2), για την αριστερή πλευρά του σώματος ($p<0,05$, ANCOVA, Πίνακας 3.24). Συγκεκριμένα για τους αριστερούς ωτόλιθους, παρατηρήθηκε διαφορετικό οντογενετικό τροχιακό ανάπτυξης μεταξύ των δύο πληθυσμών με βάση την κατεύθυνση της εξέλιξης του σχήματος σε συνάρτηση με το μέγεθος (τυπικό μήκος, SL). Με άλλα λόγια, υπήρξε διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών στο οντογενετικό πρότυπο εξέλιξης του σχήματος των αριστερών ωτολίθων. Για τους δεξιούς ωτόλιθους, υπήρξε κοινό οντογενετικό τροχιακό ανάπτυξης των ωτολίθων και μη σημαντική διαφοροποίηση σχήματος (ωτολίθου) μεταξύ των πληθυσμών. Οι μέσες Προκρούστειες αποστάσεις από το δείγμα αναφοράς (Ht-c) του κοινού πληθυσμού ιχθύδιων, για το κάθε δείγμα που πάρθηκε από τους γεωγραφικά διακριτούς πληθυσμούς κατά τη περίοδο της σωματικής αύξησης (πάχυνσης) των ψαριών, αναπαρίσταται γραφικά στην Εικόνα 3.37.

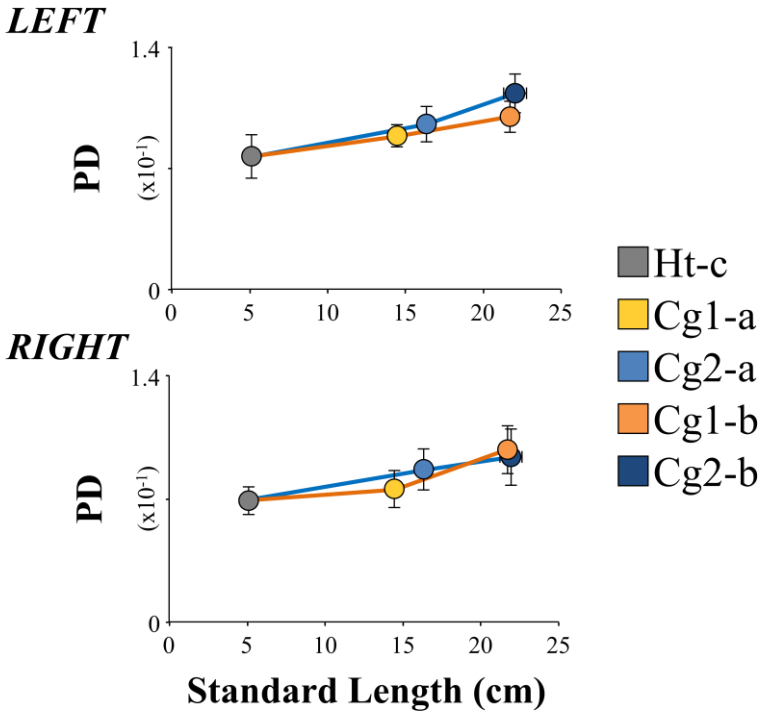
Πίνακας 3.24. Αποτελέσματα της ανάλυσης συνδιακύμανσης (ANCOVA) για τον έλεγχο της εξέλιξη του σχήματος των ωτολίθων κοινού πληθυσμού τσιπούρας από το στάδιο του ιχθυδίου (122 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph) έως το εμπορικό μέγεθος (314-393 dph) σε δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής. SL: τυπικό μήκος (cm), Cage: κλουβί πάχυνσης (Cg1, Cg2). Πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστές δοκιμές για την κάθε πλευρά του σώματος (Αριστερά-Δεξιά).

Αριστερά

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Sqares	F	P-value
SL	0,01937	1	0,01937	72,257	<0,001
Cage	0,00054	1	0,00054	0,764	>0,05
SL:Cage	0,00363	1	0,00363	5,103	<0,05
Residuals	0,10093	142	0,00071		

Δεξιά

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Sqares	F	P-value
SL	0,01245	1	0,01245	11,738	<0,001
Cage	0,00031	1	0,00031	0,296	>0,05
SL:Cage	0,00187	1	0,00187	1,759	>0,05
Residuals	0,15059	142	0,00106		

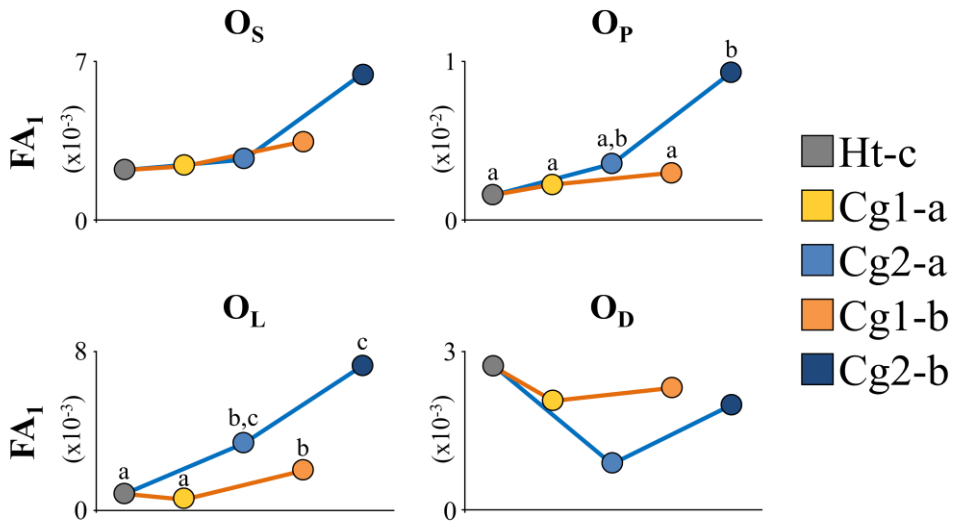


Εικόνα 3.37. Μέσες Προκρούστειες αποστάσεις (Mean, ±SE) από το δείγμα αναφοράς (Ht-c), του σχήματος των ωτολίθων των δειγμάτων κοινού πληθυσμού τσιπούρας, κατά την περίοδο της σωματικής αύξησης των ατόμων σε δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2). Ht-c: δείγμα που πάρθηκε από τον εμπορικό σταθμό στις 122 μέρες μετά την εκκόλαψη (dph). Cg1-a, Cg1-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg1 στις 136 και 314 dph αντίστοιχα. Cg2-a, Cg2-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg2 στις 165 και 393 dph αντίστοιχα. Τα ψάρια των κλωβών Cg1 και Cg2 προέρχονται από τον πληθυσμό του εμπορικού σταθμού (Ht).

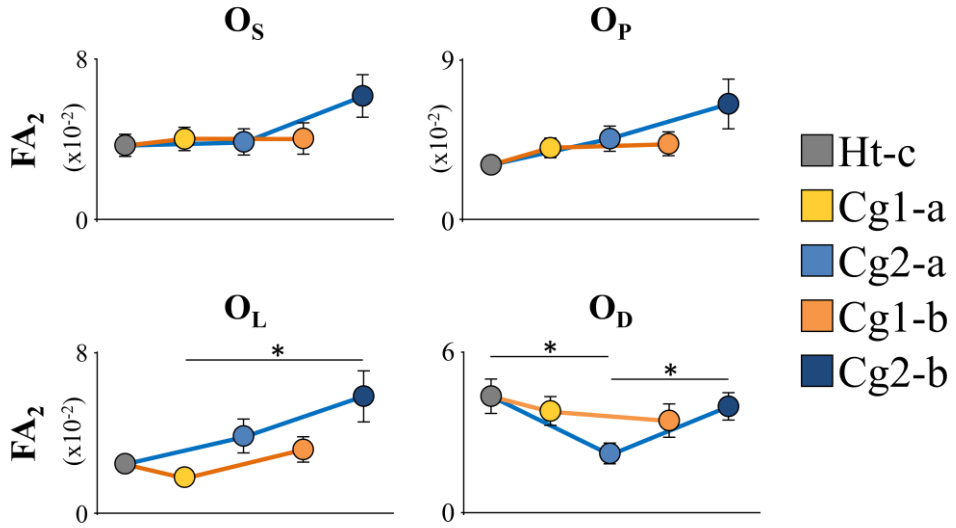
3.3.2.4 Εξέλιξη της ασυμμετρίας των ωτολίθων από το στάδιο του ιχθυδίου μέχρι το ενήλικο

Ο έλεγχος της εξέλιξης της ασυμμετρίας για το FA_1, από το στάδιο του ιχθυδίου (Ht-c) μέχρι το ενήλικο στάδιο (εμπορικό μέγεθος: Cg1-b, Cg2-b), αποκάλυψε σημαντική διαφοροποίηση της αμφίπλευρης συμμετρίας των ωτολίθων ανάλογα με το περιβάλλον ανάπτυξης των ιχθυδίων (Cg1, Cg2), για δύο μορφολογικούς χαρακτήρες μεγέθους (O_P, O_L) του ωτολίθου ($p<0,01$, Kruskal wallis test). Εντούτοις δεν υπήρξε διαφοροποίηση στην εξέλιξη της ασυμμετρίας των μορφολογικών χαρακτήρων σχήματος ($p>0,05$, Bartllet test, Πίνακας $Π_{5.1}$, Παράρτημα 5). Συγκεκριμένα η περίμετρος (O_P) εμφάνισε αντισυμμετρία (Ant) η οποία αυξήθηκε σημαντικά στα άτομα του πληθυσμού Cg2 έως το τέλος της παραγωγής (Cg2-b), ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση των επιπέδων στο Cg1 (Εικόνα 3.38). Το μέγιστο μήκος (O_L) εμφάνισε κατευθυνόμενη ασυμμετρία (DA), η οποία αυξήθηκε σημαντικά από τα ιχθύδια (Ht-c) στα ενήλικα άτομα. Εντούτοις ο ρυθμός αύξησης της ασυμμετρίας του μήκους (O_L) διέφερε μεταξύ των δύο πληθυσμών, με το Cg2 να παρουσιάζει σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα από το Cg1, καθ' όλη τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης.

Ο έλεγχος της εξέλιξης της ασυμμετρίας για το δείκτη FA_2 έδειξε αύξηση της ασυμμετρίας του μέγιστου μήκους (O_L, DA) των ωτολίθων κατά την περίοδο της αύξησης των ατόμων, με τις υψηλότερες τιμές να παρατηρούνται στο Cg2 κατά το τέλος της παραγωγής (Εικόνα 3.39). Τα επίπεδα της ασυμμετρίας του μέγιστου πλάτους (O_D, FA) των ωτολίθων για το Cg2, έδειξαν μια αυξομείωση κατά την περίοδο της αύξησης των ατόμων, με σημαντική μείωση των επιπέδων από το στάδιο του ιχθυδίου έως το μέσο της περιόδου πάχυνσης ($p<0,05$) και μετέπειτα σημαντική αύξηση των επιπέδων έως το τέλος της παραγωγής ($p<0,05$). Τέλος, η ασυμμετρία των μορφολογικών χαρακτήρων του σχήματος δεν διέφερε μεταξύ των πληθυσμών για το δείκτη FA_2 ($p>0,05$, Bartllet test, Πίνακας $Π_{5.2}$, Παράρτημα 5).



Εικόνα 3.38. Εξέλιξη της ασυμμετρίας μεγέθους (δείκτης FA_1) των ωτολίθων κοινού πληθυσμού τσιπούρας, κατά την περίοδο της σωματικής αύξησης των ατόμων σε δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2). Ht-c: δείγμα που πάρθηκε από τον ιδιωτικό σταθμό στις 122 μέρες μετά την εκκόλαψη (dph). Cg1-a, Cg1-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg1 στις 136 και 314 dph αντίστοιχα. Cg2-a, Cg2-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg2 στις 165 και 393 dph αντίστοιχα. Τα ψάρια των κλωβών Cg1 και Cg2 προέρχονται από τον πληθυσμό του εμπορικού σταθμού (Ht). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος. Οι τιμές χωρίς κοινό γράμμα είναι στατιστικά διαφορετικές ($p<0,05$).



Εικόνα 3.39. Εξέλιξη της ασυμμετρίας μεγέθους (δείκτης FA_2, ±SE) των ωτολίθων κοινού πληθυσμού τσιπούρας, κατά την περίοδο της σωματικής αύξησης των ατόμων σε δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2). Ht-c: δείγμα που πάρθηκε από τον εμπορικό σταθμό στις 122 μέρες μετά την εκκόλαψη (dph). Cg1-a, Cg1-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg1 στις 136 και 314 dph αντίστοιχα. Cg2-a, Cg2-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg2 στις 165 και 393 dph αντίστοιχα. Τα ψάρια των κλωβών Cg1 και Cg2 προέρχονται από τον πληθυσμό του εμπορικού σταθμού (Ht). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος. *: $p<0,05$.

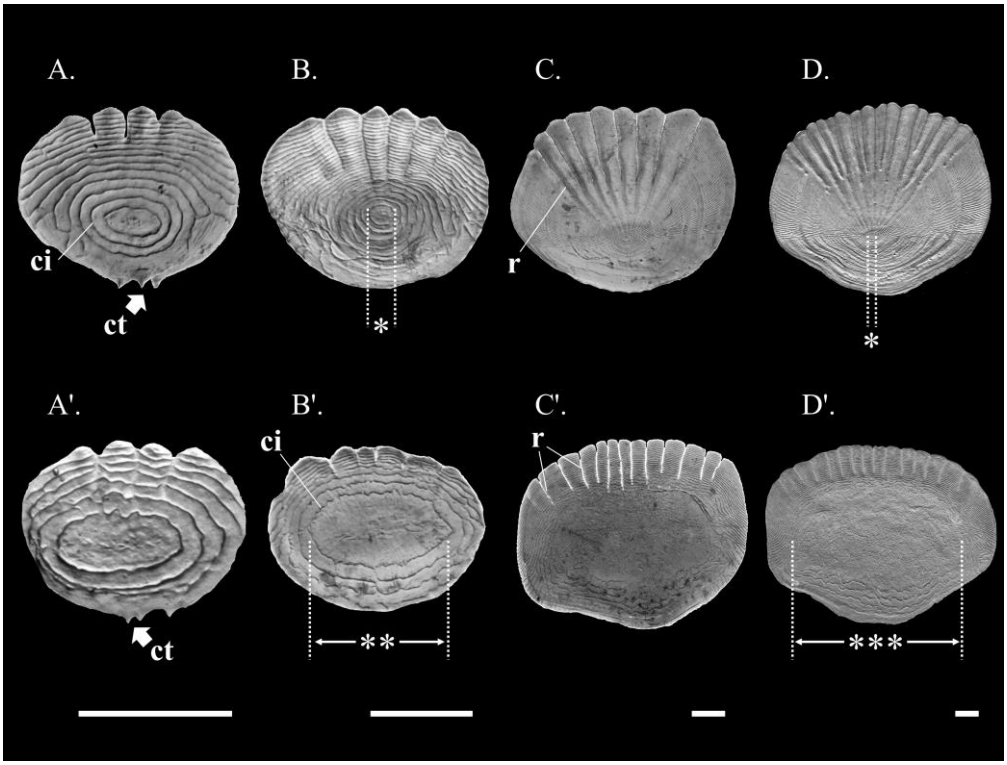
3.3.3 Σχέση του βαθμού αναγέννησης των λεπιών με την ηλικία και το περιβάλλον ανάπτυξης της εκτρεφόμενης τσιπούρας

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της τσιπούρας, νέοι, μεγαλύτερου μεγέθους δακτύλιοι αύξησης (circuli) εμφανίζονται ομόκεντρα του πυρήνα αναγέννησης των λεπιών. Ταυτόχρονα αυξάνεται ο αριθμός και το μέγεθος των κεντρικών αυλακώσεων (radii) (Εικόνα 3.40). Κατά το τέλος της μεταμόρφωσης, τα λέπια χαρακτηρίζονται από την εμφανή παρουσία λεπτών ξεχωριστών οστεοποιήσεων (ctenii) (Εικόνα 3.40A, 3.40A'), οι οποίες χάνονται (μακροσκοπικά) στα επόμενα στάδια ανάπτυξης (Εικόνα 3.39B-3.39D). Τα αναγεννημένα λέπια παρουσιάζουν τα ίδια κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά και παρόμοιο πρότυπο ανάπτυξης σε σχέση με τα φυσιολογικά. Η διαφορά τους έγκειται στη παρουσία ενός ευδιάκριτου αναγεννημένου πυρήνα, ο οποίος στερείται δακτυλίων αύξησης (Εικόνα 3.40A'-3.40D').

Κατά την περίοδο εκτροφής των νυμφών και ιχθυδίων στον ιχθυογεννητικό σταθμό, από το στάδιο της μεταμόρφωσης (δημιουργία των λεπιών) έως το τέλος της περιόδου παραγωγής του γόνου, ο βαθμός αναγέννησης των λεπιών (SRD) αυξήθηκε με την αύξηση της ηλικίας των ατόμων (Εικόνα 3.41). Ο μέσες τιμές του SRD κυμάνθηκαν από 8,6 ± 6,8% (56 μέρες μετά την εκκόλαψη, dph) σε 56,8 ± 11,8% (95 dph) στον ερευνητικό σταθμό και από 34,5 ± 12,8% (62 dph) σε 63,8 ± 11,8% (122 dph) στον ιδιωτικό. Επιπλέον, τα επίπεδα του SRD δεν διαφοροποιήθηκαν μεταξύ των δειγμάτων του ερευνητικού σταθμού με διαφορετική θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης σε κάθε ηλικία δειγματοληψίας (Kruskal-Wallis test, $p>0,05$, Πίνακας 3.25).

Μετά τη μεταφορά των ψαριών στους κλωβούς πάχυνσης, τα επίπεδα του SRD συνέχισαν να αυξάνονται με την ηλικία των ατόμων (Εικόνα 3.41). Κατά το τέλος της παραγωγικής διαδικασίας (τέλος περιόδου πάχυνσης), η μέση τιμή του βαθμού αναγέννησης στο Cg1 και στο Cg2 ήταν 99,8 ± 0,9% και 98,7 ± 3,0% αντίστοιχα (Πίνακας 3.25). Ανεξάρτητα της κοινής καταγωγής των ψαριών στα κλουβιά, τα άτομα του κλωβού Cg2 παρουσίασαν μεγαλύτερο εύρος τιμών SRD σε σχέση με το Cg1 κατά τη διάρκεια της περιόδου πάχυνσης (Εικόνα 3.41D-3.41G).

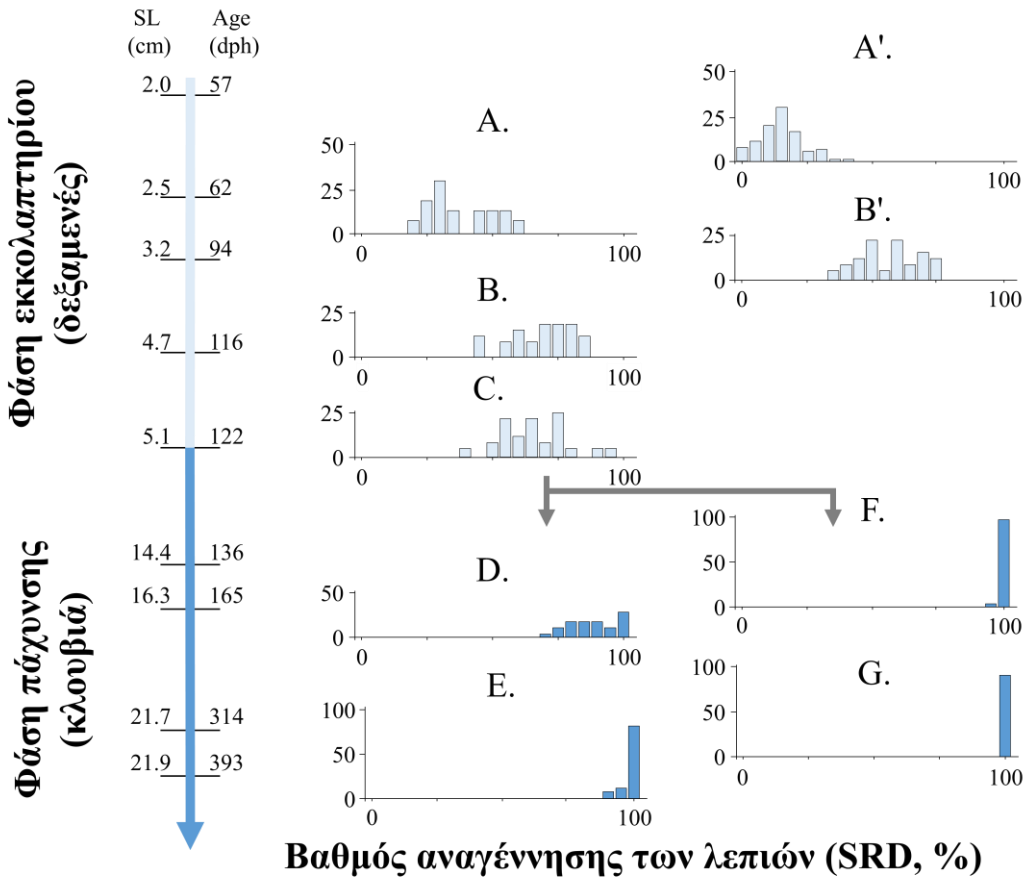
Για το σύνολο των δειγμάτων που πάρθηκαν σε διαφορετικές ηλικίες κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας και ανεξάρτητα της καταγωγής και του τόπου εκτροφής τους (Ht1, Ht2, Cg1, Cg2), η σχέση SRD-SL παρουσίασε κοινό πρότυπο (Εικόνα 3.42). Η κατά τμήματα γραμμική (piece-wise) παλινδρόμηση που εφαρμόστηκε στο σύνολο των δεδομένων [$Ln(SRD)=-3+2,6\times SL+(-2,6)\times(SL-2,7)\times(SL\geq 2,7)$, $r^2=0,99$, $p<0,001$] αποκάλυψε ένα σαφές σημείο μεταβολής της κλίσης (SL_i) στα 2,7 cm SL (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 2,6-2,9 cm), στο οποίο ο ρυθμός αύξησης του SRD άλλαξε σημαντικά (Εικόνα 3.42).



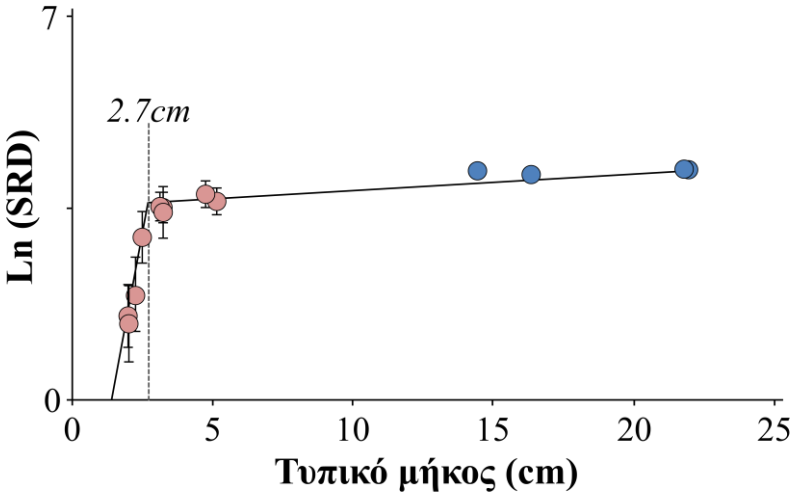
Εικόνα 3.40. Φυσιολογικά (A-D) και αναγεννημένα (A'-D') λέπια τσιπούρας σε τέσσερα διαφορετικά μήκη σώματος (SL, Τυπικό μήκος). A, A': 2,6 cm SL, B, B': 5,2 cm SL, C, C': 12,4 cm SL, D, D': 21,5 cm SL. Τα διαφορετικά μορφολογικά χαρακτηριστικά των λεπιών επισημαίνονται με γράμματα, βέλη και λεπτές γραμμές. ci, circulli r, radii, ct, ctenii. Οι διακεκομμένες γραμμές και τα αμφίδρομα βέλη απεικονίζουν το μήκος του πυρήνα δύο κανονικών και δύο αναγεννημένων λεπιών, *, 0,1 mm, **, 0,7 mm, ***, 1,9 mm. Οι μπάρες κλίμακας αντιστοιχούν σε 0,5 mm. Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν με διερχόμενο φως, μετά τη χρώση των λεπιών με ερυθρό της Αλιζαρίνης.

Πίνακας 3.25. Κύρια χαρακτηριστικά όλων των δειγμάτων που πάρθηκαν καθ΄ όλη την περίοδο εκτροφής της τσιπούρας (περίοδος παραγωγής γόνου & περίοδος πάχυνσης) από το τέλος του σταδίου της μεταμόρφωσης έως το τέλος της παραγωγής στα κλουβιά (εμπορικό μέγεθος). dph: μέρες μετά την εκκόλαψης, SL: μέσο σταθερό μήκος. Κάθε δείγμα περιλαμβάνει 30 άτομα εκτός του Ht-b (n=18) και του Cg2-b (n=26).

Rearing phase	dph	Sample code	SL(±SD, cm)	SRD(±SD, %)
Hatchery (indoor tanks)	56	17°C	2,0 (0,2)	8,6 (6,8)
	58	20°C	2,0 (0,2)	11,2 (5,7)
	58	23°C	2,2 (0,1)	16,9 (8,2)
	93	17°C	3,2 (0,3)	54,4 (17,3)
	95	20°C	3,2 (0,3)	56,5 (12,7)
	95	23°C	3,1 (0,3)	56,8 (11,8)
	62	Ht-a	2,5 (0,2)	34,5 (12,8)
	116	Ht-b	4,7 (0,4)	66,4 (12,5)
	122	Ht-c	5,1 (0,3)	63,8 (11,8)
On-growing (sea cages)	136	Cg1-a	14,4 (0,9)	99,5 (1,5)
	314	Cg1-b	21,7 (1,0)	99,8 (0,9)
	165	Cg2-a	16,3 (1,3)	88,5 (9,3)
	393	Cg2-b	21,9 (1,8)	98,7 (3,0)



Εικόνα 3.41. Κατανομή συχνοτήτων του βαθμού αναγέννησης των λεπιών στα δείγματα ψαριών που πάρθηκαν κατά τη διάρκεια εκτροφής της τσιπούρας. A, B, C, δείγματα που πάρθηκαν από τον ιδιωτικό σταθμό στις 62 (Ht-a), 116 (Ht-b) και 122 (Ht-c) μέρες μετά την εκκόλαψη (dph) αντίστοιχα. A', B', δείγματα που πάρθηκαν από τον ερευνητικό σταθμό στις 56-58 και στις 93-95 dph και από τις τρεις πειραματικές συνθήκες (μέση κατανομή συχνοτήτων των ομάδων 17, 20 και 23°C). D, E, δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg1 στις 136 (Cg1-a) και 314 (Cg1-b) dph. F, G, δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg2 στις 165 (Cg2-a) και 393 (Cg2-b) dph. Τα ψάρια των κλωβών Cg1 και Cg2 προέρχονται από κοινό πληθυσμό ιχθυδίων του ιδιωτικού σταθμού (Ht).



Εικόνα 3.42. Μεταβολή του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) κατά την εκτροφή και αύξηση του σωματικού μεγέθους της τσιπούρας. SRD: μέσος βαθμός αναγέννησης των λεπιών για κάθε δείγμα ψαριών. Οι γραμμές σφάλματος ισούνται με 1 SD. Στο διάγραμμα περιλαμβάνονται τα δεδομένα από όλα τα δείγματα, ανεξάρτητα από την προέλευση τους. Κόκκινοι δείκτες: φάση εκκολαπτηρίου. Μπλε δείκτες: φάση πάχυνσης.

4. Συζήτηση

4.1 Σύνοψη κύριων αποτελεσμάτων

Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής, από τις αναλύσεις της μορφολογίας των ωτολίθων και του σώματος των άγριων ατόμων (L30) τσιπούρας, προέκυψαν 3 ομάδες (αποθέματα): η ομάδα του Αιγαίου, η ομάδα του Ιονίου και η ομάδα της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου. Από τα αποτελέσματα των γενετικών αναλύσεων, οι γεωγραφικά διακριτές ομάδες δεν διέφεραν μεταξύ τους ως προς την ποικιλομορφία των μικροδορυφορικών τόπων του DNA, εμφανίζοντας ένα γενετικά ενιαίο απόθεμα τσιπούρας στον Ελλαδικό χώρο.

Ο έλεγχος των ορίων της φαινοτυπικής πλαστικότητας των ωτολίθων στην τσιπούρα, έδειξε ότι η θερμοκρασία κατά το εμβρυϊκό και λεκιθοφόρο στάδιο των ψαριών επηρεάζει σημαντικά τη μορφολογία (σχήμα και ασυμμετρία) των ωτολίθων σε μετέπειτα στάδια ανάπτυξης των ατόμων. Επιπλέον, η διαβίωση των ψαριών σε διαφορετικά περιβάλλοντα ανάπτυξης από το ιχθύδιο έως το ενήλικο στάδιο, αλλάζει σημαντικά τη μορφολογία (σχήμα, μέγεθος, ασυμμετρία) των ωτολίθων τους. Από τον έλεγχο της φαινοτυπικής διακύμανσης των λεπιών, δείχθηκε ότι η εκτρεφόμενη τσιπούρα, ανεξάρτητα από το περιβάλλον ανάπτυξης, χάνει λέπια συνεχώς με την ηλικία στη διάρκεια παραμονής της στις μονάδες καλλιέργειας. Το αποτέλεσμα αυτό, καθιστά τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD) ικανό δείκτη στη διάκριση δραπετών ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας μέσα στους φυσικούς πληθυσμούς, οι οποίοι έχουν διαφύγει νωρίτερα από το εμπορεύσιμο μέγεθος.

Η μελέτη της μορφολογικής διακύμανσης των ωτολίθων (σχήμα σώματος, ασυμμετρία, μέγεθος) και του σώματος στα άτομα φυσικής προέλευσης με πιθανότητα συμμετοχής δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας (M30-60, M60), έδειξε αύξηση της φαινοτυπικής ποικιλομορφίας στα δείγματα των διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών, επιβεβαιώνοντας το SRD ως ικανό δείκτη διάκρισης δραπετών ψαριών. Εντούτοις, η μελέτη της γενετικής ποικιλομορφίας δεν έδειξε σημαντική διαφοροποίηση στα άτομα φυσικής προέλευσης μεταξύ των ομάδων με διαφορετική πιθανότητα συμμετοχής δραπετών ψαριών (κατηγορίες SRD).

Τέλος, υπήρξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των εκτρεφόμενων και των ατόμων φυσικής προέλευσης τόσο με βάση τα φαινοτυπικά όσο και τα γενετικά χαρακτηριστικά τους.

4.2 Διάκριση γεωγραφικών ομάδων τσιπούρας

4.2.1 Φαινοτυπική διάκριση

Η παρούσα διδακτορική διατριβή είχε σκοπό τη διερεύνηση της πραγματικής φαινοτυπικής και γενετικής ποικιλομορφίας της άγριας τσιπούρας, χρησιμοποιώντας τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών ως κριτήριο διάκρισης δραπετών ψαριών εντός των φυσικών πληθυσμών. Η ανάλυση του σχήματος των ωτολίθων και του σώματος στα άγρια άτομα με χαμηλή πιθανότητα συμμετοχής δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας (≤30% SRD, L30), αποκάλυψε την ύπαρξη 3 αποθεμάτων με βάση τον φαινότυπο: του Αιγαίου, του Ιονίου και της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου. Σημαντικές διαφορές στο σχήμα των ωτολίθων και του σώματος έχουν επίσης εντοπιστεί μεταξύ άγριων πληθυσμών τσιπούρας της Ελλάδας και της Ισπανίας (Arechavala-Lopez *et al.* 2012a, Arechavala-Lopez *et al.* 2012b).

Το σχήμα των ωτολίθων αποτελεί πολύ αξιόπιστο μορφολογικό δείκτη προσδιορισμού αποθεμάτων, εξαιτίας του ότι εξαρτάται από το συνδυασμό γενετικών και περιβαλλοντικών παραγόντων (Cardinale *et al.* 2004) καθώς και από την ηλικία και το ρυθμό αύξησης των ψαριών (Hussy *et al.* 2016). Στους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επιδρούν στη διαφοροποίηση του σχήματος των ωτολίθων μεταξύ ατόμων διαφορετικής γεωγραφικής προέλευσης, ανήκουν η θερμοκρασία, το βάθος διαβίωσης, ο τύπος του υποστρώματος και η τροφή (Lombarte and Lleonart 1993, Gagliano and McCormick 2004, Hussy 2008). Προηγούμενες μελέτες που αφορούσαν την ταυτοποίηση αποθεμάτων ψαριών στον Ελλαδικό χώρο, έχουν δείξει διαφορές στις εποχικές διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και της διαθεσιμότητας της τροφής μεταξύ διαφορετικών περιοχών του Αιγαίου και του Ιονίου πελάγους (Geladakis *et al.* 2017). Επιπλέον, οι Vignon και Morat (2010), σε μελέτη που πραγματοποίησαν στο τροπικό είδος (*Lutjanus kasmira*), αποκάλυψαν ότι το σχήμα των ωτολίθων καθορίζεται από την αλληλεπίδραση του περιβάλλοντος και των γενετικών χαρακτηριστικών του κάθε ψαριού. Σύμφωνα με την ανάλυση τους, το συνολικό σχήμα των ωτολίθων διαφοροποιείται σύμφωνα με τις εναλλαγές του περιβάλλοντος, ενώ η διακύμανση συγκεκριμένων γενετικών περιοχών επηρεάζει το σχήμα σε τοπικό επίπεδο.

Το σχήμα του σώματος των ψαριών αποτελεί έναν ιδιαίτερα πλαστικό χαρακτήρα, που επηρεάζεται τόσο από το περιβάλλον διαβίωσης όπως είναι η θερμοκρασία, η αλατότητα και η δίαιτα (Gilbert 2001, Grigorakis *et al.* 2002, Loizides *et al.* 2014) καθώς και από γενετικούς παράγοντες που επιδρούν στη διαμόρφωση του (Loukovitis *et al.* 2013). Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, το σχήμα του σώματος επηρεάστηκε σημαντικά από τον δείκτη ευρωστίας των ψαριών (Εικόνα 3.9), ο οποίος διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικά δειγμάτων (Εικόνα 3.8). Η διαφοροποίηση στο δείκτη ευρωστίας μεταξύ των δειγμάτων, οφείλεται

πιθανώς στη διαθεσιμότητα της τροφής (Cardin *et al.* 2014) η οποία αλλάζει από περιοχή σε περιοχή. Παρόμοια συσχέτιση του συντελεστή ευρωστίας με το σχήμα του σώματος των ψαριών έχει εντοπιστεί και στη σαρδέλα (*Sardina pilchardus*), από δείγματα που πάρθηκαν σε διαφορετικές περιοχές του Ελλαδικού χώρου (Geladakis *et al.* 2017). Επιπρόσθετα, οι διαφορές στο συντελεστή ευρωστίας μπορούν να οφείλονται στη διαφορετική εποχή σύλληψης των δειγμάτων (π.χ. δείγμα Κέρκυρας 2015, Πίνακας 2.1). Τα ψάρια που συλλέχθηκαν την περίοδο της άνοιξης, η οποία ακολουθεί το τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου της τσιπούρας (Sola *et al.* 2006), έχουν χάσει μεγάλο μέρος του σωματικού τους λίπους το οποίο επενδύεται στην παραγωγή αυγών (Almansa *et al.* 1999).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το δείγμα της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου, το οποίο διαφοροποιήθηκε σημαντικά από τις υπόλοιπες ομάδες, τόσο ως προς το σχήμα των ωτολίθων όσο και του σώματος. Οι λιμνοθάλασσες αποτελούν παραγωγικά πλούσια, κλειστά συστήματα, με ιδιαίτερα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά (π.χ. υψηλότερες θερμοκρασίες) που μπορούν να τροποποιήσουν τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ψαριών. Η λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου είναι το μεγαλύτερο κλειστό θαλάσσιο σύστημα στην Ελλάδα, όπου στην αρχή της άνοιξης, άγριες τσιπούρες εισέρχονται στα νερά της για να τραφούν (Dimitriou *et al.* 2007). Στα ιδιαίτερα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά της λιμνοθάλασσας θα μπορούσε να αποδοθεί το μικρότερο μέγεθος καρδιάς και γονάδων που εμφάνισε το δείγμα του Μεσολογγίου, συγκριτικά με τα υπόλοιπα φυσικής προέλευσης (Εικόνα 3.10). Η φυσιολογία της καρδίας κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης στη τσιπούρα έχει δειχθεί ότι επηρεάζεται μορφολογικά ανάλογα με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (Kourkouta *et al.* 2021). Συγκεκριμένα, πειραματικά άτομα που υποβλήθηκαν σε χαμηλότερη θερμοκρασία (17°C) κατά το εμβρυικό και λεκιθοφόρο στάδιο παρουσίασαν μεγαλύτερο βάθος κοιλίας σε σχέση με τα άτομα που υποβλήθηκαν σε υψηλότερες θερμοκρασίες (20 και 23°C) (Kourkouta *et al.* 2021). Σημαντικές αποκρίσεις στη μορφολογία της καρδιάς εξαιτίας της θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης έχουν δειχθεί και κατά το ιχθύδιο και ενήλικο στάδιο στο zebrafish (*Danio rerio*) (Dimitriadi *et al.* 2018, 2020). Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να εστιαστούν σε περισσότερες περιοχές ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, όπως είναι οι λιμνοθάλασσες (π.χ. λιμνοθάλασσα Αμβρακικού), για τον εντοπισμό αποθεμάτων τσιπούρας με ιδιαίτερα φαινοτυπικά ή/και φυσιολογικά χαρακτηριστικά.

Η διαφορετική εποχή σύλληψης των δειγμάτων αύξησε τη μορφολογική διακύμανση του σχήματος του σώματος των ψαριών εξαιτίας διαφορετικών φυσιολογικών παραγόντων (πλήρωση του στομάχου, αναπαραγωγική ωρίμανση) που επηρεάζονται από την εποχικότητα. Πιθανώς, αυτό εξηγεί την οριακή διάκριση μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών ομάδων με βάση το σχήμα του

σώματος. Από την άλλη, το σχήμα των ωτολίθων δεν φάνηκε να επηρεάστηκε σημαντικά από την εποχή σύλληψης των δειγμάτων, καθώς διέκρινε σε ικανοποιητικό βαθμό τα διαφορετικά αποθέματα. Μελλοντικές εργασίες που θα αφορούν την ταυτοποίηση αποθεμάτων ψαριών (όπως η τσιπούρα) μέσω της χρήσης μορφολογικών χαρακτήρων, έχοντας συλλέξει δείγματα από διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές την ίδια εποχή, θα μπορέσουν να καταλήξουν σε ασφαλέστερα συμπεράσματα ως προς τη φαινοτυπική ποικιλομορφία των πληθυσμών.

4.2.2 Γενετική διάκριση

Ο έλεγχος της γενετικής ποικιλομορφίας των «θεωρούμενων» άγριων ατόμων (L30) δεν έδειξε σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των διαφορετικών γεωγραφικών ομάδων (Αιγαίου, Ιονίου και λιμνοθάλασσας Μεσολογγίου). Με βάση την υπάρχουσα βιβλιογραφία, παρόμοια έλλειψη γεωγραφικής διαφοροποίησης έχει βρεθεί μεταξύ άγριων πληθυσμών τσιπούρας από διαφορετικές περιοχές του Ελλαδικού χώρου. Συγκριμένα, τα αποτελέσματα των Karaiskou *et al.* (2009) έχουν δείξει έλλειψη γενετικής διαφοροποίησης με βάση τον έλεγχο 7 μικροδορυφορικών τόπων DNA, μεταξύ διακριτών γεωγραφικά ομάδων τσιπούρας. Από τη μελέτη των Gkagkavouzis *et al.* (2019), στην οποία ελέγχθηκαν δείγματα τσιπούρας από διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας ως προς τη ποικιλομορφία τόπων μικροδορυφορικού DNA, προέκυψε ασθενής γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των γεωγραφικών ομάδων, μη ανάλογη της γεωγραφικής τους κατανομής. Παρόμοια έλλειψη συσχέτισης της γενετικής διαφοροποίησης με τη γεωγραφική απόσταση έχει προκύψει και μεταξύ άλλων περιοχών κατανομής του είδους, όπως μεταξύ του Ατλαντικού και της Αδριατικής (De Innocentiis 2004), του Ατλαντικού και της Μεσογείου (Alarcon *et al.* 2004), καθώς και μεταξύ διαφορετικών περιοχών της κεντρικής Μεσογείου (Rossi *et al.* 2006, Franchini *et al.* 2012).

Διαφορετικοί παράγοντες θα μπορούσαν να συσχετιστούν με την έλλειψη γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ πληθυσμών τσιπούρας από διαφορετικές γεωγραφικά περιοχές. Η υψηλή ικανότητα διασποράς του είδους με την ταυτόχρονη έλλειψη φυσικών και οικολογικών φραγμών μπορούν να συμβάλουν στην ανταλλαγή ατόμων μεταξύ απομακρυσμένων γεωγραφικά πληθυσμών, με αποτέλεσμα τη γενετική τους ομογενοποίηση (Alarcón *et al.*, 2004). Επίσης, η δραπέτευση ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας, μπορεί να τροποποιήσει τη γενετική δομή των τοπικών φυσικών πληθυσμών. Συγκεκριμένα, η χρήση γεννητόρων στις καλλιέργειες, οι οποίοι προέρχονται από μακρινές γεωγραφικά περιοχές και έχουν διαφορετική γενετική σύσταση, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την εισροή νέων αλληλομόρφων στους τοπικούς φυσικούς πληθυσμούς, έπειτα από γεγονότα δραπετεύσεων (Gkagkavouzis *et al.* 2019). Από την άλλη μεριά, δειγματοληπτικά λάθη ή παραλείψεις (π.χ. δειγματοληψίες σε διατροφικά πεδία ή σε διόδους μετανάστευσης) μπορεί να

επισκιάσουν την ανίχνευση ασθενούς γενετικής δομής λόγω της ανάμειξης τόσο διαφορετικών πληθυσμών όσο και διαφορετικών ηλικιακών κλάσεων που μπορεί να συνδέονται με διαφορετικές αλληλικές συχνότητες (Waples 2015). Σε αυτή την περίπτωση, τα όρια των πληθυσμών γίνονται δυσδιάκριτα και δύσκολο να ανιχνευθούν. Στην παρούσα εργασία, εστιάζοντας στα άτομα με χαμηλή πιθανότητα να περιέχουν δραπέτες καλλιέργειας (L30), έγινε μια προσπάθεια προσδιορισμού της πραγματικής γενετικής ποικιλομορφίας της άγριας τσιπούρας στον Ελλαδικό χώρο. Εντούτοις, ψάρια τα οποία έχουν διαφύγει είτε ως αυγά (Somarakis *et al.* 2013), είτε νωρίς κατά την παραγωγική διαδικασία και δεν έχουν προλάβει να χάσουν μεγάλο ποσοστό των αρχικών τους λεπιών (αποτελέσματα παρούσας εργασίας), δεν μπορούν να διακριθούν με βάση τον δείκτη SRD. Εξαιτίας της ευρείας και μακροχρόνιας καλλιέργειας του είδους, οι δραπετεύσεις εκτρεφόμενων ψαριών και η πιθανή επακόλουθη αναπαραγωγική τους ανάμιξη με τα άγρια άτομα (εάν αυτή έχει συμβεί σε σημαντικό βαθμό), μπορεί με το πέρας των γενεών, να έχει τροποποιήσει σημαντικά τη γενετική σύσταση των άγριων πληθυσμών, διαμοιράζοντας κοινά γενετικά χαρακτηριστικά μεταξύ τους (βλέπε §4.3.3). Μελλοντικές εργασίες θα μπορούσαν να αυξήσουν τα διαθέσιμα γενετικά εργαλεία στη μελέτη της άγριας τσιπούρας, προσθέτοντας νέους δείκτες (νέοι μικροδορυφορικοί τόποι, SNPs) στην κατανόηση της γενετικής δομής των αποθεμάτων της.

4.3 Διάκριση δραπετών ψαριών εντός των φυσικών πληθυσμών

4.3.1 Χρήση του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD)

Η μελέτη της εξέλιξης του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) στα δείγματα εκτρεφόμενης τσιπούρας, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης της στις μονάδες καλλιέργειας, αποκάλυψε ότι τα επίπεδα SRD αυξάνονται συνεχώς με την ηλικία των ατόμων. Στην τσιπούρα, η δημιουργία των λεπιών (squamation) ξεκινά κατά το μέσο της μεταμόρφωσης (1,4-1,7 cm SL), και ολοκληρώνεται με την έναρξη του σταδίου του ιχθυδίου (Loizides *et al.* 2014). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, τα λέπια αρχίζουν να χάνονται και να αντικαθίστανται από νέα αναγεννημένα, πριν προλάβουν να καλύψουν ολόκληρο το σώμα των ατόμων (2.0 cm SL, Εικόνα 3.41 Α'). Η αφαίρεση ενός λεπιού προκαλεί επιφανειακό τραύμα, ενεργοποιώντας μια πολύπλοκη ανοσολογική απόκριση για την ταχεία επούλωση του (Vieira *et al.* 2011). Τέσσερις ημέρες μετά από την απώλεια ενός λεπιού στην τσιπούρα, έχουν ήδη αποκατασταθεί οι δερμικοί και επιδερμικοί ιστοί και ξεκινά η δημιουργία του νέου αναγεννημένου πυρήνα (Costa and Power 2018). Πρόσφατη μελέτη των Mateus *et al.* (2020) αποκάλυψε ότι οι επιφανειακές πληγές του δέρματος που προκαλούνται από την απώλεια λεπιών στην τσιπούρα, σε συνδυασμό με το χρόνιο

στρες που προκαλείται από την υψηλή ιχθυοφόρτιση στην ιχθυοκαλλιέργεια, είναι υπεύθυνα για την πρόκληση φλεγμονωδών διαταραχών στο εντερικό σύστημα των ψαριών.

Η αύξηση του SRD, από το τέλος του σταδίου της μεταμόρφωσης έως το τέλος της παραγωγής γόνου στα κλουβιά, έδειξε να ακολουθεί δύο διακριτές φάσεις σε σχέση με το μήκος των ατόμων (Εικόνα 3.42). Έως τα 2,7 cm τυπικό μήκος, το οποίο συμπίπτει με το τέλος του squamation (κάλυψη ολόκληρου του σώματος με λέπια) στην τσιπούρα (Loizides *et al.* 2014), το SRD αυξάνεται με υψηλό ρυθμό. Την περίοδο μετά το παρατηρούμενο σημείο μεταβολής και ανεξάρτητα των διαφορετικών συνθηκών εκτροφής (εκκολαπτήρια, κλουβιά πάχυνσης), το SRD αυξάνεται με χαμηλότερο ρυθμό. Ο εμπλουτισμός της σχέσης SRD:SL με περισσότερα δεδομένα, θα διευκρινίσει εάν το εν λόγω περιγραφικό μοντέλο μπορεί να θεωρηθεί κοινό για όλους τους εκτρεφόμενους πληθυσμούς τσιπούρας, με συνέπεια τη μελλοντική του χρήση για τον ανάδρομο υπολογισμό του μεγέθους των δραπετών ψαριών κατά τη στιγμή της απελευθέρωσής τους στη φύση.

Ως κριτήριο στη διάκριση δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας εντός των φυσικών πληθυσμών τσιπούρας μέσω της χρήσης των αναγεννημένων λεπιών, η υπάρχουσα βιβλιογραφία έχει χρησιμοποιήσει τα υψηλά SRD επίπεδα (>93%) που έχουν παρατηρηθεί στα εκτρεφόμενα, εμπορικού μεγέθους, ενήλικα άτομα (Izquierdo-Gomez *et al.* 2017). Στην παρούσα εργασία, όλα τα εκτρεφόμενα άτομα που βρίσκονταν κοντά στο εμπορικό μέγεθος (21,7-25,2 cm μέσο τυπικό μήκος) παρουσίασαν παρόμοια επίπεδα SRD (89-100%, Εικόνα 3.1, Εικόνα 3.41). Παρόλα αυτά, κατά την περίοδο της εισαγωγής του γόνου στα κλουβιά και την έναρξη της φάσης της πάχυνσης, τα επίπεδα SRD κυμάνθηκαν από 40 έως 92% (Εικόνα 3.40 C). Με βάση αυτό το αποτέλεσμα, τα ψάρια τα οποία διαφεύγουν στη φύση νωρίτερα (σε μικρότερα μεγέθη) κατά τη περίοδο της σωματικής τους αύξησης στα κλουβιά, μπορούν έχουν χαμηλότερα επίπεδα SRD, σε σύγκριση με το προηγουμένως χρησιμοποιούμενο κριτήριο του 93%.

Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, τα επίπεδα SRD στην τσιπούρα φυσικής προέλευσης εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση και διαφέρουν από περιοχή σε περιοχή. Ο Δημητρίου (2007), μετρώντας την αναγέννηση των λεπιών σε τσιπούρες φυσικής προέλευσης, υπολόγισε μέσο SRD ίσο με 16,5%, με το 88% των ατόμων να εμφανίζει επίπεδα SRD ≤40%. Οι Fragkoulis *et al.* (2017), εκτίμησαν μέγιστο SRD έως 60% σε δείγμα τσιπούρας που αλιεύτηκε στην περιοχή της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου. Οι Izquierdo-Gomez *et al.* (2017) σε δείγματα τσιπούρας προερχόμενα από περιοχές όπου η πιθανότητα παρουσίας δραπετών ψαριών είναι σπάνια (μακριά από μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας), μέτρησαν επίπεδα SRD έως 43%. Αντίστοιχα, σε περιοχές με πολύ υψηλή πιθανότητα παρουσίας δραπετών ψαριών (κοντά σε μονάδες καλλιέργειας) τα ποσοστά

του SRD έφτασαν το 100%. Στη παρούσα διατριβή, το ποσοστό των ατόμων στις διαφορετικές ομάδες με βάση το SRD (L30, M30-60, M60) διέφερε μεταξύ των περιοχών. Το αποτέλεσμα αυτό, δείχνει πιθανώς διαφορετικό ποσοστό συμμετοχής διαφυγόντων ατόμων στους φυσικούς πληθυσμούς των διαφορετικών περιοχών, με το υψηλότερο ποσοστό να παρουσιάζεται στο δείγμα του Β. Αιγαίου. Συγκεκριμένα το δείγμα του Β. Αιγαίου μπορεί αλιεύτηκε από περιοχή στην οποία εντοπίζονται αρκετές μονάδες καλλιέργειας (π.χ. στη Θάσο), αυξάνοντας την πιθανότητα ανάμειξής δραπετών με τα άγρια ψάρια.

4.3.2 Χρήση μορφολογικών χαρακτήρων (μορφολογία ωτολίθων, σχήμα σώματος)

Ο έλεγχος της μορφολογικής διακύμανσης των ωτολίθων (σχήμα σώματος, ασυμμετρία, μέγεθος) και του σώματος στις ομάδες των ατόμων φυσικής προέλευσης με πιθανότητα συμμετοχής δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας (M30-60, M60), παρουσίασε αύξηση της μορφολογικής διακύμανσης εντός των ομάδων και αδυναμία στη διάκριση μεταξύ των ατόμων των διαφορετικών γεωγραφικών περιοχών. Επιπλέον, εντός των γεωγραφικών δειγμάτων, όπου η αντιπροσώπευση των ατόμων σε κάθε ομάδα αναγέννησης (L30, M30-60, M60) ήταν επαρκής, τα άτομα με υψηλά επίπεδα SRD (M60) εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα ασυμμετρίας και μεγέθους ωτολίθων από τις ομάδες με χαμηλά (L30) και ενδιάμεσα (M30-60) επίπεδα SRD (π.χ. Βόρειο Αιγαίο). Στις αναλύσεις μεταξύ εκτρεφόμενων και ατόμων φυσικής προέλευσης (ανεξάρτητα από την περιοχή), τα M60 εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερους και ασύμμετρους ωτόλιθους από τα υπόλοιπα άτομα άγριας συλλογής, εμφανίζοντας συχνά, επίπεδα παρόμοια με αυτά των εκτρεφόμενων ψαριών.

Οι Izquierdo-Gomez *et al.* (2017), μετρώντας την αναλογία του πλάτους (D) προς το τυπικό μήκος του σώματος (SL) στην τσιπούρα, αποκάλυψαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών ομάδων με βάση την προέλευση των ατόμων και του βαθμού αναγέννησης των λεπιών. Συγκεκριμένα, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >93%, κατηγοριοποιήθηκαν ως δραπέτες ιχθυοκαλλιέργειας και παρουσίασαν παρόμοιες τιμές με τα εκτρεφόμενα ψάρια. Επιπλέον, εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερες τιμές D:SL σε σχέση με τα υπόλοιπα ψάρια φυσικής προέλευσης. Τέλος, σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν και μεταξύ των ατόμων που αλιεύτηκαν σε μακρινές (έως 43% SRD) και κοντινές (έως 93% SRD), από μονάδες καλλιέργειας, περιοχές.

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι το SRD αυξάνεται συνεχώς με την ηλικία, τα παραπάνω αποτελέσματα της φαινοτυπικής διακύμανσης των ωτολίθων και του σώματος στην τσιπούρα, καθιστούν το SRD αξιόπιστο δείκτη στη διάκριση δραπετών ψαριών εντός των φυσικών αποθεμάτων τσιπούρας. Με βάση αυτό, επιβεβαιώνεται η υπόθεση των Geladakis *et al.* (2021), περί της ύπαρξης μιας ενδιάμεσης ζώνης, όπου τα ψάρια με επίπεδα SRD μεταξύ 31-90%

εμφανίζουν ενδιάμεσους φαινότυπους μεταξύ των εκτρεφόμενων και των άγριων ατόμων με επίπεδα SRD έως και 30%. Συμπερασματικά, όσο νωρίτερα διαφεύγει στη φύση ένα ψάρι από τις μονάδες καλλιέργειας, μη έχοντας πιθανώς προλάβει να αντικαταστήσει όλα του τα λέπια με νέα, αναγεννημένα, τόσο περισσότερο χρόνο διαθέτει ο φαινότυπος του να ομοιάσει στο πρότυπο του άγριου ψαριού (εξαιτίας του κοινού περιβάλλοντος διαβίωσης). Μελλοντικές μελέτες θα μπορούσαν να αξιοποιήσουν τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών σε συνδυασμό με άλλους μορφολογικούς δείκτες, στη διάκριση δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας στα αποθέματα περισσότερων ειδών ψαριών μεγάλου εμπορικού ενδιαφέροντος (π.χ. λαβράκι).

4.3.3 Χρήση μικροδορυφορικού DNA

Η συνδυαστική χρήση του βαθμού αναγέννησης των λεπιών (SRD) και του ελέγχου της ποικιλομορφίας μικροδορυφορικών τόπων DNA, δεν έδειξε σημαντική διαφοροποίηση εντός των γεωγραφικών δειγμάτων, μεταξύ των ατόμων με διαφορετικά επίπεδα SRD. Ο SRD, ως κριτήριο διάκρισης πιθανών δραπετών από ιχθυοκαλλιέργειες ψαριών, είναι ικανός δείκτης στο να διακρίνει τα άτομα εκείνα που έχουν δραπετεύσει στο φυσικό περιβάλλον έχοντας χάσει μεγάλο μέρος των αρχικών τους λεπιών (ψάρια που ανήκουν στις κατηγορίες M30-60 και M60). Παρόλα αυτά, ο συγκεκριμένος μορφολογικός χαρακτήρας, αδυνατεί να διακρίνει τα άτομα εκείνα που έχουν δραπετεύσει είτε ως αυγά (Somarakis *et al.* 2013) είτε νωρίς κατά την περίοδο της σωματικής τους αύξησης, έχοντας διατηρήσει το μεγαλύτερο μέρος των αρχικών τους λεπιών (αποτελέσματα παρούσας εργασίας). Επιπρόσθετα, η διασταύρωση μεταξύ δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας και άγριων ατόμων, έχει ως αποτέλεσμα την εισροή στους φυσικούς πληθυσμούς γενετικών χαρακτηριστικών των παρακείμενων εκτρεφόμενων (Arechavala *et al.* 2013), κάτω από προϋποθέσεις (ύπαρξη πραγματικής γενετικής δομής των πληθυσμών τσιπούρας, διαφορετική γενετική σύνθεση εκτρεφόμενων και φυσικών πληθυσμών, μέγεθος επεισοδίων διαφυγής, διαφορετική επιβίωση και αναπαραγωγική επιτυχία διαφυγόντων, διασταύρωση και υβριδισμός μεταξύ φυσικών και διαφυγόντων πληθυσμών κ.λπ.) οι οποίες είναι αδιευκρίνιστες για την τσιπούρα. Για παράδειγμα, στο σολομό η σύγκριση ατόμων της F_1, σε φυσικό πληθυσμό, υποδηλώνει μειωμένη σχετική επιβίωση σε σύγκριση με τα άγρια άτομα κατά το πρώτο και το δεύτερο έτος της ζωής τους (Sylvester *et al.* 2019). Παρόλα αυτά, απόγονοι τέτοιων διασταυρώσεων, πιθανώς να βρίσκονταν εντός των δειγμάτων φυσικής προέλευσης, να συμπεριλήφθηκαν στη κατηγορία των άγριων ατόμων (L30) και εξαιτίας της επίδραση του κοινού περιβάλλοντος, να εμφάνισαν φαινότυπο παρόμοιο με αυτό των πραγματικά άγριων ψαριών. Μικρότερο πιθανώς ποσοστό αυτών των ατόμων μπορεί να περιλαμβάνεται στην κατηγορία των M30-60, καθώς τα άτομα με ενδιάμεσα επίπεδα (31-90% SRD) SRD μπορεί να περιλαμβάνουν

τόσο άγρια όσο και πρώην εκτρεφόμενα ψάρια (Geladakis *et al.* 2021). Συμπερασματικά, η γενετική ομοιογένεια μεταξύ των ατόμων με διαφορετικά επίπεδα SRD (L30, M30-60, M60) στο κάθε δείγμα, να είναι αποτέλεσμα διαφόρων γενετικών ή/και δημογραφικών παραγόντων που πρέπει να διευκρινιστούν.

Ως γνωστόν, η τσιπούρα είναι από τα πρώτα είδη που χρησιμοποιήθηκαν για εκτροφή στη Μεσόγειο. Για την καλύτερη κατανόηση της γενετικής δομής των φυσικών αποθεμάτων της, είναι αναγκαία η διερεύνηση της φυσικής της ποικιλομορφίας προτού την ευρεία εξάπλωση των καλλιεργούμενων πληθυσμών της. Συγκεκριμένα, συλλέγοντας δείγματα από περισσότερες περιοχές κατανομής του είδους και συγκρίνοντας τα με ιστορικά δείγματα DNA άγριων ατόμων, από περιόδους όπου η καλλιέργεια της τσιπούρας δεν είχε εξαπλωθεί και εντατικοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό (μειώνοντας σημαντικά την πιθανότητα ύπαρξης δραπετών στη φύση), θα ξεκαθαρίσει το "τοπίο" όσον αφορά το βαθμό που οι ιχθυοκαλλιέργειες έχουν επιδράσει στη γενετική σύσταση των άγριων πληθυσμών της.

4.4 Όρια φαινοτυπικής πλαστικότητας των ωτολίθων στη τσιπούρα

4.4.1 Σχήμα ωτολίθων

Ο έλεγχος των ορίων της φαινοτυπικής πλαστικότητας των ωτολίθων στην τσιπούρα, έδειξε ότι αλλαγές στη θερμοκρασία ανάπτυξης κατά τα πρώιμα στάδια (εμβρυϊκό και λεκιθοφόρο στάδιο) των ψαριών επηρεάζει σημαντικά το σχήμα των ωτολίθων τους σε επόμενα στάδια (στάδιο μεταμόρφωσης, στάδιο ιχθυδίου). Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες με έντονη διακύμανση στη φύση που δρουν άμεσα στη φυσιολογία των ψαριών από την αρχή της ζωής τους. Η αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνει τον ρυθμό ανάπτυξης των ψαριών και κατ' επέκταση τη μεταβολική τους δραστηριότητα (Clarke and Johnston 1999). Οι ωτολίθοι είναι δομές που σχηματίζονται νωρίς κατά την εμβρυογένεση των ψαριών και η ανάπτυξη τους επηρεάζεται από τις αλλαγές στο μεταβολισμό και τις διακυμάνσεις στο ρυθμό αύξησης των ατόμων (Pawson 1990, Campana and Casselman 1993). Η αύξηση του μεταβολισμού αυξάνει το ρυθμό εναπόθεσης ασβεστίου κατά την αύξηση των ωτολίθων, επηρεάζοντας το σχήμα τους (Mahe *et al.* 2019). Πρόσφατη εργαστηριακή μελέτη σε νύμφες τσιπούρας για μελλοντικά σενάρια αλλαγής του κλίματος αποκάλυψε ότι η αύξηση της θερμοκρασίας του νερού αυξάνει τη μεταβολική τους δραστηριότητα, αυξάνοντας την κατανάλωση οξυγόνου και τους καρδιακούς τους ρυθμούς (Pimentel *et al.* 2020). Παρόμοια μελέτη, έχει δείξει ότι η αύξηση της θερμοκρασίας, αυξάνει τον ρυθμό αύξησης, τη μεταβολική δραστηριότητα καθώς και το μέγεθος των ωτολίθων σε πειραματικές νύμφες του είδους *Solea senegalensis* (Pimentel *et al.* 2014). Στη παρούσα εργασία, κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης, η ομάδα των 23°C εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερο μήκος σώματος από τις υπόλοιπες θερμοκρασιακές ομάδες. Παρόμοιες αλλαγές μεγέθους κατά τη περίοδο της μεταμόρφωσης, μπορεί να υποδηλώνουν διαφοροποίηση ως προς το στάδιο ανάπτυξης των ατόμων, εξαιτίας της επίδρασης της θερμοκρασίας κατά την πρώιμη ηλικία (Loizides *et al.* 2014). Η μελέτη των Kourkouta *et al.* (2021), έδειξε ότι η θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης στην τσιπούρα, επηρεάζει τη κολυμβητική ικανότητα του είδους κατά τη μεταμόρφωση, τροποποιώντας χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των ατόμων όπως είναι το σχήμα του σώματος, η μορφολογία της καρδιάς (βλέπε §4.2.1), η κολυμβητική ικανότητα και η συχνότητα εμφάνισης σκελετικών δυσπλασιών. Οι διαφοροποιήσεις στο σχήμα των ωτολίθων παρέμειναν και στο στάδιο του ιχθυδίου (κυρίως στους δεξιούς ωτόλιθους), όπου τα άτομα των διαφορετικών θερμοκρασιακών ομάδων δεν διέφεραν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος. Μελέτη που αφορούσε βραχυπρόθεσμες αυξομειώσεις της θερμοκρασίας κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης στο σολομό, έδειξε αλλαγές στο

αναπτυξιακό πρότυπο των ωτολίθων του, διαφοροποιώντας το σχήμα τους στη μετέπειτα ζωή των ατόμων (Vignon 2018).

Σε συνέχεια του ελέγχου της φαινοτυπικής διακύμανσης των ωτολίθων στην τσιπούρα, δείχθηκε ότι το σχήμα των ωτολίθων διαφοροποιείται ανάλογα με το περιβάλλον ανάπτυξης των ιχθυδίων και ενήλικων ατόμων. Οι διαφορετικές περιβαλλοντικές επιδράσεις (όπως π.χ. η θερμοκρασία) επιδρούν στο ρυθμό αύξησης των ατόμων και κατ' επέκταση στον ρυθμό αύξησης των ωτολίθων τους, διαφοροποιώντας το σχήμα τους (Campana and Casselman 1993). Οι πληθυσμοί που εξετάστηκαν (Cg1, Cg2), διέφεραν ως προς τον σωματικό ρυθμό αύξησης και το μέγεθος των ωτολίθων τους, πιθανώς εξαιτίας της διαφορετικής θερμοκρασίας του περιβάλλοντος κατά την ανάπτυξη τους (Εικόνα 2.3). Οι Cardinale *et al.* (2004), παίρνοντας μπακαλιάρους από το ίδιο γενετικό απόθεμα και αναπτύσσοντας τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα, διαπίστωσαν διαφορές στο σχήμα ωτολίθων μεταξύ των ομάδων, οι οποίες αποδόθηκαν κυρίως στους διαφορετικούς ρυθμούς αύξησης των ατόμων.

Μελλοντικές μελέτες θα πρέπει να εστιάσουν στους παράγοντες που εμφανίζουν έντονη διακύμανση στη φύση (π.χ. θερμοκρασία, υποξία) και επιδρούν σημαντικά σε χαρακτηριστικά της φυσιολογίας των ψαριών από τα πρώτα στάδια της ζωής τους, καθορίζοντας την ανάπτυξη και κατ' επέκταση την επιβίωση τους.

4.4.2 Ασυμμετρία ωτολίθων

Ο έλεγχος της φαινοτυπικής διακύμανσης των ωτολίθων στη τσιπούρα, έδειξε ότι η αύξηση της θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης αυξάνει τα επίπεδα ασυμμετρίας των ωτολίθων κατά το στάδιο του ιχθυδίου. Ο υψηλός μεταβολικός ρυθμός κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, θέτει σε κίνδυνο το αναπτυξιακό πρόγραμμα ορισμένων ψαριών, προκαλώντας αύξηση της ασυμμετρίας των ωτολίθων τους (Gagliano *et al.* 2008). Η εμφάνιση ασύμμετρων ωτόλιθων από τα πρώτα στάδια της ζωής των ιχθύων (π.χ. εμβρυϊκό στάδιο, Lychakov *et al.* 2006), μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπλοκές στη λειτουργία της ακοής, μειώνοντας την ικανότητα επιβίωσης σε κρίσιμες περιόδους της μετέπειτα ζωής τους. Οι Gagliano *et al.* (2008), υποστήριξαν ότι οι νύμφες του είδους *Pomacentrus amboinensis* με ασύμμετρους ωτόλιθους έχουν μεγαλύτερη δυσκολία στην εύρεση κατάλληλων οικοτόπων (υφάλων) και στην αποφυγή θηρευτών (υψηλή θνησιμότητα) κατά τη μετάβαση τους από την πελαγική φάση στα βενθικά περιβάλλοντα (*settlement phase*).

Από τον έλεγχο της ασυμμετρίας των ωτολίθων από το ιχθύδιο στο ενήλικο άτομο, υπήρξε διαφοροποίηση στα επίπεδα ανάλογα με το περιβάλλον ανάπτυξης. Όπως αναφέρθηκε και στο §4.5.1, η διαφοροποίηση στην αμφίπλευρή συμμετρία των ωτολίθων μεταξύ των πληθυσμών (Cg1, Cg2) μπορεί να οφείλεται στο διαφορετικό ρυθμό σωματικής τους αύξησης, ο οποίος επηρεάζεται

σημαντικά από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος. Εντούτοις, ο πληθυσμός με τον μικρότερο ρυθμό αύξησης, μέγεθος ωτολίθων και θερμοκρασία περιβάλλοντος (Cg2), εμφάνισε σημαντικά μεγαλύτερη αύξηση στην ασυμμετρία των ωτολίθων του κατά την περίοδο της σωματικής αύξησης των ατόμων (συγκριτικά με το Cg1). Πιθανώς, η εμφάνιση ασυμμετρίας στους ωτόλιθους να εγκαθιδρύεται από τα πρώτα στάδια της ζωής των ψαριών, διαφοροποιώντας το τροχιακό ανάπτυξης μεταξύ των δύο σωματικών πλευρών (Lombarte and Cruz 2007). Εντούτοις, η ικανότητα διόρθωσης των αποκλίσεων μεταξύ της αριστερής και της δεξιάς πλευράς από τους ομοιοστατικούς μηχανισμούς των ψαριών, να διαφέρει μεταξύ των ατόμων και να περιορίζεται σε συγκριμένα αναπτυξιακά στάδια (Gagliano *et al.* 2008).

Στους διαφορετικούς ελέγχους της φαινοτυπικής διακύμανσης των ωτολίθων, ο τύπος της ασυμμετρίας που εμφανίστηκε ήταν είτε κυμαινόμενη (FA), είτε κατευθυνόμενη (DA), είτε αντισυμμετρία (Ant). Η εμφάνιση της κυμαινόμενης ασυμμετρίας (FA) στα ψάρια, έχει συνδεθεί άμεσα με διαφορετικούς στρεσογόνους παράγοντες που επιδρούν στο αναπτυξιακό πρότυπο και τη φυσιολογική κατάσταση των ψαριών, συμπεριλαμβανομένης της θερμοκρασίας, του pH, της αλατότητας και πλήθους ρυπογόνων παραγόντων (Parsons 1990, Somarakis *et al.* 1997a, Somarakis *et al.* 1997b, Panfili *et al.* 2005, Allenbach 2011). Αντίστοιχα, η ύπαρξη κατευθυνόμενης ασυμμετρίας (DA) έχει παρατηρηθεί μεταξύ διαφορετικών γεωγραφικών ομάδων ψαριών και έχει ερμηνευτεί είτε ως πλαστική απόκριση στην επίδραση διαφορετικών περιβαλλοντικών παραγόντων, όπως είναι η θερμοκρασία ή η διαθεσιμότητα της τροφής, είτε οφείλεται στη γενετική σύσταση των ατόμων είτε στην αλληλεπίδραση των γενετικών και περιβαλλοντικών τους χαρακτηριστικών (Mahe *et al.* 2019b). Συγκεκριμένα οι Mahe *et al.* (2019a), σε μελέτη που αφορούσε το σχήμα και την ασυμμετρία των ωτολίθων σε ιχθύδια και ενήλικα άτομα λαβρακιού, αποκάλυψε ότι η θερμοκρασία επιδρά στην εμφάνιση κατευθυνόμενης ασυμμετρίας (DA) ως αποτέλεσμα του διαφορετικού ρυθμού αύξησης μεταξύ αριστερών και δεξιών ωτολίθων. Η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο σωματικών πλευρών ως προς τον βαθμό διάκρισης του σχήματος στις διαφορετικές αναλύσεις των ορίων φαινοτυπικής πλαστικότητας των ωτολίθων (§4.5.1), θα μπορούσε να ερμηνευτεί από την εμφάνιση κατευθυνόμενης ασυμμετρίας (DA) μεταξύ του κάθε ζεύγους. Θεωρώντας ένα παρόμοιο οντογενετικό πρότυπο μεταξύ των δύο σωματικών πλευρών, οι (Mahe 2019a) πρότειναν ότι η εμφάνιση της DA στο λαβράκι, οφείλεται στο διαφορετικό ρυθμό αύξησης μεταξύ των αριστερών και δεξιών ωτολίθων του κάθε ψαριού, η οποία θα μπορούσε να προκύψει ως μια λειτουργική προσαρμογή του συστήματος της ακοής τους. Τέλος, η εμφάνιση μη κανονικής κατανομής στα δεδομένα της ασυμμετρίας διαφορετικών μορφολογικών χαρακτήρων

δεν υποδηλώνει κατ' ανάγκη την ύπαρξη αντισυμμετρίας (bimodal distribution), αλλά μπορεί να οφείλεται στο μικρό μέγεθος του δείγματος.

4.5 Διαφορές μεταξύ άγριας και εκτρεφόμενης τσιπούρας

4.5.1 Μορφολογικές διαφορές

Ο έλεγχος της φαινοτυπικής διακύμανσης των ωτολίθων έδειξε σαφή διάκριση μεταξύ εκτρεφόμενης και άγριας τσιπούρας. Παρόμοια αποτελέσματα προέκυψαν και από τους Geladakis *et al.* (2021), συγκρίνοντας άγρια και εκτρεφόμενα άτομα τσιπούρας ως προς το σχήμα, το μέγεθος και την ασυμμετρία των ωτολίθων τους. Διαφορές ως προς το σχήμα των ωτολίθων μεταξύ εκτρεφόμενης και άγριας τσιπούρας έχουν εντοπιστεί στο παρελθόν σε πληθυσμούς της Ισπανίας (Arechavala *et al.* 2012a). Το περιβάλλον εκτροφής και τα ιδιαίτερα γενετικά χαρακτηριστικά των εκτρεφόμενων ατόμων επιδρούν στη διαμόρφωση του σχήματος των ωτολίθων τους (Cardinale *et al.* 2004, Galley *et al.* 2006). Από τα αποτελέσματα της μέσης σχηματικής διαμόρφωσης των ωτολίθων και για τις δύο πλευρές του σώματος, τα εκτρεφόμενα άτομα παρουσίασαν μια χαρακτηριστική εγκόλπωση στην προσθιο-ραχιαία περιοχή (*rostrum* & *antirostrum*) (Εικόνα 3.12, Εικόνα 3.13). Η περιοχή στην οποία εμφανίζεται αυτή η εγκόλπωση χαρακτηρίζεται ως "*excisura ostii*" και αποτελεί τμήμα του *sulcus acusticus* των ωτολίθων. Το *sulcus acusticus* είναι μια σημαντική δομή των *sagittae* ωτολίθων με λειτουργική σημασία στην ακοή των ψαριών (Popper and Coombs 1980, Popper and Lu 2000, Popper *et al.* 2005, Teimori *et al.* 2019). Ως εκ τούτου είναι ενδιαφέρουσα η διερεύνηση της πιθανής επίδρασης αυτής της εγκόλπωσης στην ακουστική ικανότητα της εκτρεφόμενης τσιπούρας.

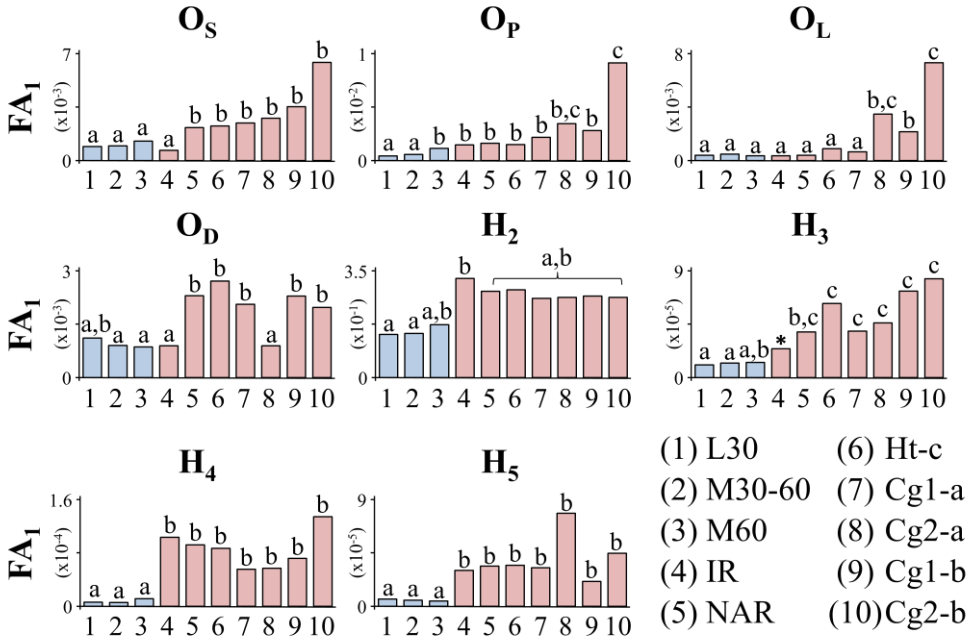
Το δείγμα εκτροφής του Ιονίου εμφάνισε ωτόλιθους με σημαντικά μεγαλύτερη περίμετρο σε σχέση με τα άτομα φυσικής προέλευσης. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.11, οι διαφορές στη περίμετρο μεταξύ των άγριων και των εκτρεφόμενων ατόμων τσιπούρας, οφείλονται κυρίως σε διαφορές σχήματος (δαντελωτή επιφάνεια ωτολίθου στα εκτροφής). Εντούτοις, η τακτική παροχή τροφής σε συνθήκες καλλιέργειας αυξάνει τον ρυθμό αύξησης των ψαριών και κατ' επέκταση τον ρυθμό αύξησης των ωτολίθων τους (Barnett-Johnson *et al.* 2007). Προηγούμενες μελέτες που αφορούσαν σε διαφορές στη μορφολογία των ωτολίθων μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων ατόμων, έχουν δείξει ότι οι συνθήκες εκτροφής αυξάνουν το μέγεθος των ωτολίθων μέσω της εναπόθεσης ασβεστίτη ή βατερίτη (εναλλακτικές μορφές ανθρακικού ασβεστίου) αντί για αραγωνίτη (π.χ. Tomas and Geffen 2003, Reimer *et al.* 2016, Reimer *et al.* 2017). Οι Coll-Llado *et al.* (2018) έδειξαν ότι η επίδραση του χαμηλού pH, κατά το εμβρυικό και το νεανικό στάδιο στην τσιπούρα, αυξάνει το μέγεθος των ωτολίθων στις νύμφες, αλλάζοντας τη μορφολογία τους. Σύμφωνα με τους

Reveillac *et al.* (2015), ο υψηλός ρυθμός αύξησης στους ωτολίθους ιχθυδίων τσιπούρας εξαιτίας του μειωμένου pH στο νερό, σχετίζεται άμεσα με την ταυτόχρονη αύξηση του ρυθμού εναπόθεσης ασβεστίου (υπερασβεστοποίηση). Μέχρι το στάδιο του γόνου (1-10g), το περιβάλλον εκτροφής στα εκκολαπτήρια μπορεί να επιδρά σημαντικά στις κρίσιμες αναπτυξιακές περιόδους των ατόμων, όπου καθορίζεται το οντογενετικό πρότυπο των ωτολίθων τους (Vignon 2018).

Όλα τα δείγματα εκτρεφόμενης τσιπούρας που πάρθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, από το στάδιο του ιχθυδίου έως το ενήλικο, εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερα επίπεδα ασυμμετρίας σε σχέση με τα άτομα φυσικής προέλευσης, ανεξάρτητα της ηλικίας και της προέλευσης τους (Εικόνα 4.1). Αύξηση στην ασυμμετρία αμφίπλευρων δομών εκτρεφόμενων ψαριών, όπως είναι οι βραγχιακές άκανθες και τα ζεύγη πτερυγίων, έχει παρατηρηθεί στο παρελθόν λόγω της επίδρασης του περιβάλλοντος εκτροφής (Waldman *et al.* 1996, Vollestad and Hindar 1997, Almeida *et al.* 2008). Συγκεκριμένα στην τσιπούρα, οι Palma *et al.* (2001) εντόπισαν μεγαλύτερη κυμαινόμενη ασυμμετρία ως προς τον αριθμό των θωρακικών ακτίνων και των βραγχιακών ακάνθων σε άτομα εκτροφής σε σύγκριση με άγρια. Η αύξηση της ασυμμετρίας σε αμφίπλευρες δομές εκτρεφόμενων πληθυσμών ψαριών, έχει προταθεί ότι οφείλεται στο υψηλό ποσοστό επιβίωσης των ασύμμετρων ατόμων που αναπτύσσονται στο προστατευμένο περιβάλλον των μονάδων ή/και στο υψηλότερο περιβαλλοντικό στρες που υφίστανται τα εκτρεφόμενα ψάρια κατά τη διάρκεια της ζωής τους (π.χ. ποιότητα του νερού, ιχθυοφόρτιση) (Leary *et al.* 1991, Waldman *et al.* 1996, Eriksen *et al.* 2007, Almeida *et al.* 2008, Eriksen *et al.* 2008, Allenbach 2011)

Τέλος, σημαντική διάκριση μεταξύ εκτρεφόμενων και ατόμων φυσικής προέλευσης προέκυψε ως προς το σχήμα του σώματος, με τα εκτροφής να παρουσιάζουν μεγαλύτερη διακύμανση σχήματος ανάλογα με την προέλευση τους. Παρόμοιες διαφοροποιήσεις ως προς σχήμα του σώματος, έχουν βρεθεί μεταξύ άγριων και εκτρεφόμενων ατόμων τσιπούρας στην Ελλάδα και την Ισπανία (Arechavala-Lopez *et al.* 2012), καθώς και σε πολλές περιοχές του Ελλαδικού χώρου (Rogdakis *et al.* 2011, Fragkoulis *et al.* 2017). Οι μορφολογικές διαφορές μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων ατόμων τσιπούρας, μπορεί να οφείλονται είτε στη διαφορετική γενετική σύσταση των εκτρεφόμενων πληθυσμών (Loukovitis *et al.* 2011a, Loukovitis *et al.* 2013, Segvic-Bubic *et al.* 2014) ή/και στο διαφορετικό περιβάλλον διαβίωσης τους (θερμοκρασία, αλατότητα, δίαιτα) (Corti *et al.* 1996, Grigorakis *et al.* 2002, Loizides, *et al.* 2014). Με βάση τα διαγράμματα ανυσμάτων, τα εκτρεφόμενα άτομα παρουσίασαν αυξημένη ευρωστία σε σύγκριση με τα άτομα φυσικής προέλευσης (Εικόνα 3.15). Εξαιτίας των σταθερών περιβαλλοντικών συνθηκών και τη συνεχή παροχή τροφής, οι εκτρεφόμενοι πληθυσμοί παρουσιάζουν μεγαλύτερους ρυθμούς αύξησης (Eaton 1996). Λόγω των μεγάλων ποσοτήτων τροφής που προσλαμβάνουν, τα εκτρεφόμενα ψάρια

εμφανίζουν μεγαλύτερα ποσοστά λίπους στο σώμα τους (περισπλαγχνικό και περιτοναϊκό λίπος) με αποτέλεσμα την αύξηση της ευρωστίας τους (Grigorakis *et al.* 2002, Abaad *et al.* 2016).



Εικόνα 4.1. Δείκτης ασυμμετρίας (FA_1) των ωτολίθων του συνόλου των εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης δειγμάτων από το στάδιο του ιχθυδίου έως το ενήλικο. L30, άτομα φυσικής προέλευσης με βαθμό αναγέννησης λεπιών (SRD) ≤30%. M30-60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD 31-60%. M60, άτομα φυσικής προέλευσης με SRD >60%. IR, δείγμα (ελέγχου) εκτροφής Ιονίου. NAR, δείγμα (ελέγχου) εκτροφής Βόρειου Αιγαίου. Ht-c: δείγμα που πάρθηκε από τον εμπορικό σταθμό στις 122 μέρες μετά την εκκόλαψη (dph). Cg1-a, Cg1-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg1 στις 136 και 314 dph αντίστοιχα. Cg2-a, Cg2-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg2 στις 165 και 393 dph αντίστοιχα. Τα ψάρια των κλωβών Cg1 και Cg2 προέρχονται από τον πληθυσμό του ιδιωτικού σταθμού (Ht).O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_5: αρμονικές 2-5. Οι τιμές χωρίς κοινό γράμμα είναι στατιστικά διαφορετικές ($p < 0,05$). *(a,b,c)

4.5.2 Γενετικές διαφορές

Ο έλεγχος της ποικιλομορφίας των μικροδορυφορικών τόπων DNA, αποκάλυψε ασθενή αλλά σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ εκτρεφόμενων και φυσικής προέλευσης ατόμων, με τα ψάρια εκτροφής να εμφανίζουν μικρότερη γενετική ποικιλομορφία. Προηγούμενες μελέτες, έχουν εντοπίσει ισχυρές γενετικές διαφοροποιήσεις μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων πληθυσμών τσιπούρας στον Ελλαδικό χώρο (Karaiskou *et al.* 2009, Loukovitis *et al.* 2011, Polovina *et al.* 2020). Παρόμοιες γενετικές διαφορές μεταξύ εκτρεφόμενων και άγριων ατόμων τσιπούρας έχουν εντοπιστεί και σε άλλες περιοχές κατανομής του είδους, όπως είναι η Αδριατική (Segvic-Bubic *et al.* 2014, Zuzul *et al.* 2019) και η Ισπανία (Alarcon *et al.* 2004, Castro *et al.* 2007). Σε κάθε περίπτωση, ο βαθμός διαφοροποίησης μεταξύ εκτρεφόμενης και άγριας τσιπούρας εξαρτάται από τον τρόπο διαχείρισης των πληθυσμών στις μονάδες παραγωγής. Οι γεννήτορες των νέων εκτρεφόμενων πληθυσμών διαθέτουν ένα μικρό μόνο ποσοστό της γενετικής ποικιλομορφίας του αρχικού τους φυσικού πληθυσμού (Polovina *et al.* 2020). Αυτό, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της

γενετικής ποικιλομορφίας στα εκτρεφόμενα άτομα του είδους (Karaiskou *et al.* 2019, Loukovitis 2011a). Η διαφοροποίηση μεταξύ εκτρεφόμενων και γειτονικών άγριων πληθυσμών, γίνεται εντονότερη έπειτα από την εφαρμογή συγκεκριμένων προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης και την εισαγωγή γόνου από μακρινές γεωγραφικά περιοχές (Arechavala *et al.* 2013, Polovina *et al.* 2020).

4.6 Γενική συζήτηση - Συμπεράσματα

Από την μελέτη για την ταυτοποίηση των αποθεμάτων τσιπούρας στον Ελλαδικό χώρο, προέκυψαν 3 αποθέματα με βάση τον φαινότυπο, με όμοια γενετικά χαρακτηριστικά. Επομένως, γίνεται σαφές, πως η χρήση διαφορετικών μεθόδων είναι αναγκαία στη ταυτοποίηση αποθεμάτων ψαριών. Οι διαφορετικοί δείκτες δίνουν πληροφορίες τόσο για τις γενετικές και αναπαραγωγικές σχέσεις μεταξύ των αποθεμάτων (γενετικοί δείκτες), όσο και για την επίδραση του περιβάλλοντος στη δομή και τη σύσταση τους (φαινοτυπικοί δείκτες). Το σύνολο των μεθόδων ταυτοποίησης σε συνδυασμό με πληροφορίες που αφορούν στα χαρακτηριστικά της ιστορίας ζωής του κάθε αποθέματος, είναι μείζονος σημασίας για τη σύγχρονη αλιευτική επιστήμη, καθώς αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της σύγχρονης αλιευτικής διαχείρισης (Begg *et al.* 1999a, 1999b).

Παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, εμφανίζουν μεγάλη διακύμανση στη φύση και παίζουν καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και τη φυσιολογία των ψαριών, ιδιαίτερα κατά τα πρώτα στάδια της ζωής τους. Εξαιτίας των φαινομένων που συνδέονται με την παγκόσμια κλιματική αλλαγή, είναι αναγκαία η μελέτη της επίδρασης τέτοιων παραγόντων στους φυσικούς πληθυσμούς των ψαριών, καθώς και η πρόβλεψη πιθανών μελλοντικών επιπτώσεων στη επιβίωση των αποθεμάτων. Ως εκ τούτου, φαινοτυπικοί χαρακτήρες (όπως οι ωτόλιθοι) που είναι ευαίσθητοι στη διακύμανση αβιοτικών παραγόντων, είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στον προσδιορισμό διαφορών που οφείλονται στο περιβάλλον ανάπτυξης.

Η συνεχώς αυξανόμενη καλλιέργεια ειδών ψαριών στη Μεσόγειο, αυξάνει τον κίνδυνο των πιθανών επιπτώσεων των ιχθυοκαλλιεργειών στα φυσικά αποθέματα. Η χρήση «φτηνών», αποτελεσματικών και εύκολα εφαρμόσιμων εργαλείων που σχετίζονται με τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά των ψαριών (π.χ. βαθμός αναγέννησης των λεπιών, σχήμα σώματος, σχήμα, μέγεθος και ασυμμετρία ωτολίθων) σε συνδυασμό με άλλες πιο ακριβείς μεθόδους (π.χ. γενετική, μαρκάρισμα), μπορεί να βοηθήσει στην εκτίμηση της συμβολής των δραπετών ιχθυοκαλλιέργειας στη σύσταση των φυσικών πληθυσμών. Μελλοντικές μελέτες που θα αφορούν την επίδραση των ιχθυοκαλλιεργειών στα φυσικά αποθέματα (συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας), μπορούν να σχεδιάσουν την οργάνωση μεθοδευμένων δειγματοληψιών ψαριών γύρω από περιοχές όπου εντοπίζονται μονάδες καλλιέργειας. Ανάλογα με τον αριθμό και την κατανομή των καλλιεργητικών μονάδων σε κάθε περιοχή, στοιχεία που αφορούν την συνολική παραγωγή γόνου καθώς και

δεδομένων που σχετίζονται με τις εκτιμήσεις των δραπετεύσεων εκτρεφόμενων ατόμων τα τελευταία έτη μπορούν να αξιοποιηθούν. Τα δεδομένα αυτά, σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των διαφορετικών μορφολογικών και γενετικών δεικτών στα δείγματα άγριας συλλογής, μπορούν να στοχεύσουν σε μια ολιστική προσέγγιση ως προς εκτίμηση των δραπετεύσεων στη δομή των τοπικών άγριων πληθυσμών.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abaad, M., V. M. Tuset, D. Montero, A. Lombarte, J. L. Otero-Ferrer and R. Haroun (2016). "Phenotypic plasticity in wild marine fishes associated with fish-cage aquaculture." Hydrobiologia **765**(1): 343-358.

Alarcon, J. A., A. Magoulas, T. Georgakopoulos, E. Zouros and M. C. Alvarez (2004). "Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*)." Aquaculture **230**(1-4): 65-80.

Allenbach, D. M. (2011). "Fluctuating asymmetry and exogenous stress in fishes: a review." Reviews in Fish Biology and Fisheries **21**(3): 355-376.

Allendorf, F. W. and G. Luikart (2007). "Conservation and the genetics of populations." Blackwell Publishing: 663 pp.

Almansa, E., M. J. Perez, J. R. Cejas, P. Badia, J. E. Villamandos and A. Lorenzo (1999). "Influence of broodstock gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) dietary fatty acids on egg quality and egg fatty acid composition throughout the spawning season." Aquaculture **170**(3-4): 323-336.

Almeida, D., A. Almodovar, G. G. Nicola and B. Elvira (2008). "Fluctuating asymmetry, abnormalities and parasitism as indicators of environmental stress in cultured stocks of goldfish and carp." Aquaculture **279**(1-4): 120-125.

Anderson, M. J. and C. J. F. T. Braak (2003). "Permutation tests for multi-factorial analysis of variance." Journal of Statistical Computation and Simulation **73**(2): 85-113.

Anderson, M. J. and T. J. Willis (2003). "Canonical analysis of principal coordinates: A useful method of constrained ordination for ecology." Ecology **84**(2): 511-525.

Arechavala-Lopez, P., D. Fernandez-Jover, K. D. Black, E. Ladoukakis, J. T. Bayle-Sempere, P. Sanchez-Jerez and T. Dempster (2013). "Differentiating the wild or farmed origin of Mediterranean fish: a review of tools for sea bream and sea bass." Reviews in Aquaculture **5**(3): 137-157.

Arechavala-Lopez, P., M. Milosevic-Gonzalez and P. Sanchez-Jerez (2016). "Using trace elements in otoliths to discriminate between wild and farmed European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and Gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.)." International Aquatic Research **8**.

Arechavala-Lopez, P., P. Sanchez-Jerez, J. T. Bayle-Sempere, D. G. Sfakianakis and S. Somarakis (2012a). "Discriminating farmed gilthead sea bream *Sparus aurata* and European sea bass *Dicentrarchus labrax* from wild stocks through scales and otoliths." Journal of Fish Biology **80**(6): 2159-2175.

Arechavala-Lopez, P., P. Sanchez-Jerez, J. T. Bayle-Sempere, D. G. Sfakianakis and S. Somarakis (2012b). "Morphological differences between wild and farmed Mediterranean fish." Hydrobiologia **679**(1): 217-231.

Arechavala-Lopez, P., P. Sanchez-Jerez, J. T. Bayle-Sempere, I. Uglem and I. Mladineo (2013). "AS WE SEE IT Reared fish, farmed escapees and wild fish stocks-a triangle of pathogen transmission of concern to Mediterranean aquaculture management." Aquaculture Environment Interactions **3**(2): 153-161.

Arechavala-Lopez, P., K. Toledo-Guedes, D. Izquierdo-Gomez, T. Segvic-Bubic and P. Sanchez-Jerez (2018). "Implications of Sea Bream and Sea Bass Escapes for Sustainable Aquaculture Management: A Review of Interactions, Risks and Consequences." Reviews in Fisheries Science & Aquaculture **26**(2): 214-234.

Arechavala-Lopez, P., I. Uglem, D. Fernandez-Jover, J. T. Bayle-Sempere and P. Sanchez-Jerez (2012c). "Post-escape dispersion of farmed seabream (*Sparus aurata* L.) and recaptures by local." Fisheries Research **121**: 126-135.

Bali, J. M. (1959). "Scale analyses of steelhead trout, *Salmo gairdnerii gairdnerii* Richardson, from various coastal watersheds of Oregon." Master's thesis. Oregon State University, Corvallis.

Balloux, F. and N. Lugon-Moulin (2002). "The estimation of population differentiation with microsatellite markers." Molecular Ecology **11**(2): 155-165.

Barnett-Johnson, R., C. B. Grimes, C. F. Royer and C. J. Donohoe (2007). "Identifying the contribution of wild and hatchery Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) to the ocean fishery using otolith microstructure as natural tags." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **64**(12): 1683-1692.

Batargias, C., E. Dermitzakis, A. Magoulas and E. Zouros (1999). "Characterization of six polymorphic microsatellite markers in gilthead seabream, *Sparus aurata* (Linnaeus 1758)." Molecular Ecology **8**(5): 897-898.

Beaumont, A. R. P. Boudry and K. Hoare (2010). "Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture, 2nd edn": 212 pp.

Begg, G. A., K. D. Friedland and J. B. Pearce (1999a). "Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview." Fisheries Research **43**(1-3): 1-8.

Begg, G. A., J. A. Hare and D. D. Sheehan (1999b). "The role of life history parameters as indicators of stock structure." Fisheries Research **43**(1-3): 141-163.

Begg, G. A. and J. R. Waldman (1999). "An holistic approach to fish stock identification." Fisheries Research **43**(1-3): 35-44.

Begg, G. A. (2005). "Life hystory parameters." In: S. X. Cadrin, L. A. Kerr, and S. Mariani (Eds.), "*Stock Identification Methods, 1nd edn*." Elsevier Academic Press, San Diego: 119-150

Ben Slimen, H., H. Guerbej, A. Ben Othmen, I. O. Brahim, H. Blel, N. Chatti, A. El Abed and K. Said (2004). "Genetic differentiation between populations of gilthead seabream (*Sparus aurata*) along the Tunisian coast." Cybium **28**(1): 45-50.

Bereiterhahn, J. and L. Zylberberg (1993). "Regeneration of Teleost Fish Scale." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **105**(4): 625-641.

Berntssen, M. H. G., R. Waagbo, H. Toften and A. K. Lundebye (2003). "Effects of dietary cadmium on calcium homeostasis, Ca mobilization and bone deformities in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr." Aquaculture Nutrition **9**(3): 175-183.

Bigler, B. (1988a). "Focal scale damage among chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) of Hokkaido, Japan." Can. J. Fish. Aquat. Sci **45**: 698-784.

Bigler, B. (1988b). "Focal scale damage among chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) of Bering Sea and Gulf of Anadyr, 1966: I. Distribution among physical parameters." Bull. Fac. Fish. Hokkaido University **39**(2): 71-79.

Bigler, B. (1988c). "Focal scale damage among chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) of Bering Sea and Gulf of Anadyr, 1966: II. Geographic distribution and stock identification." Bull. Fac. Fish. Hokkaido University **39**(2): 80-85.

Blair, A. A. (1942). "Regeneration of the Scales of Atlantic Salmon." Journal of the Fisheries Research Board of Canada. **5c**: 440-447.

Bolles, K. L. and G. A. Begg (2000). "Distinction between silver hake (*Merluccius bilinearis*) stocks in US waters of the northwest Atlantic based on whole otolith morphometrics." Fishery Bulletin **98**(3): 451-462.

Booke, H. E. (1981). "The Conundrum of the Stock Concept - Are Nature and Nurture Definable in Fishery Science." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **38**(12): 1479-1480.

Bowen, C. A., C. R. Bronte, R. L. Argyle, J. V. Adams and J. E. Johnson (1999). "Vateritic sagitta in wild and stocked lake trout: Applicability to stock origin." Transactions of the American Fisheries Society **128**(5): 929-938.

Brager, Z. and T. Moritz (2016). "A scale atlas for common Mediterranean teleost fishes." Vertebrate Zoology **66**(3): 275-386.

Browning, A., C. Ortiz and M. C. Boyce (2013). "Mechanics of composite elasmoid fish scale assemblies and their bioinspired analogues." Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials **19**: 75-86.

Burggren, W. W. (2020). "Phenotypic Switching Resulting From Developmental Plasticity: Fixed or Reversible?" Frontiers in Physiology **10**.

Campana, S. E. (1983). "Calcium Deposition and Otolith Check Formation during Periods of Stress in Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*." Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology **75**(2): 215-220.

Campana, S. E. and J. M. Casselman (1993). "Stock Discrimination Using Otolith Shape-Analysis." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **50**(5): 1062-1083.

Campana, S. E., J. A. Gagne and J. W. Mclaren (1995). "Elemental Fingerprinting of Fish Otoliths Using Id-Icpms." Marine Ecology Progress Series **122**(1-3): 115-120.

Campana, S. E. and J. D. Neilson (1985). "Microstructure of Fish Otoliths." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **42**(5): 1014-1032.

Campana, S. E. and S. R. Thorrold (2001). "Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations?" Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **58**(1): 30-38.

Cardin, S. X. (2005). "Morphometric landmarks." In: S. X. Cadrin, L. A. Kerr, and S. Mariani (Eds.), "*Stock Identification Methods, 1nd edn*." Elsevier Academic Press, San Diego: 153-172.

Cadrin, S. X., L. A. Kerr and S. Mariani (2014). "Stock identification methods: an overview." In: S. X. Cadrin, L. A. Kerr, and S. Mariani (Eds.) "*Stock Identification Methods, 2nd edn.*" Elsevier Academic Press, San Diego: 1-5.

Cardinale, M., P. Doering-Arjes, M. Kastowsky and H. Mosegaard (2004). "Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **61**(2): 158-167.

Castro, J., A. Pino, M. Hermida, C. Bouza, D. Chavarrias, P. Merino, L. Sanchez and P. Martinez (2007). "A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead seabream (*Sparus aurata*)." Aquaculture **272**: S210-S216.

Cervelli, M., A. Comparini, G. Fava and E. Rodino (1985). "Prime ricerche di genetica biochimica applicate all'acquacoltura di orata (*Sparus auratus* L.)." Oebalia **6**: 49–58.

Chapuis, M. P. and A. Estoup (2007). "Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation." Molecular Biology and Evolution **24**(3): 621-631.

Chilton, D. E. and H. T. Bilton (1986). "New Method for Aging Chinook Salmon (*Onchorhynchus tshawytscha*) Using Dorsal Fin Rays, and Evidence of Its Validity." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **43**(8): 1588-1594.

Clarke, A. and N. M. Johnston (1999). "Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish." Journal of Animal Ecology **68**(5): 893-905.

Clarke, K. R. & R. N. Gorley (2006). "Primer V6: User Manual/Tutorial." Primer-E Ltd, Plymouth, United Kingdom.

Coll-Llado, C., J. Giebichenstein, P. B. Webb, C. R. Bridges and D. G. de la Serrana (2018). "Ocean acidification promotes otolith growth and calcite deposition in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) larvae." Scientific Reports **8**.

Corti, M., A. Loy and S. Cataudella (1996). "Form changes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Moronidae: Teleostei), after acclimation to freshwater: An analysis using shape coordinates." Environmental Biology of Fishes **47**(2): 165-175.

Costa, R. A. and D. M. Power (2018). "Skin and scale regeneration after mechanical damage in a teleost." Molecular Immunology **95**: 73-82.

Cushing, D., H., (1968). "Fisheries Biology: A Study in Population Dynamics". The University of Wisconsin Press, Madison, WI: 200 pp.

De Innocentiis, S., A. Lesti, S. Livi, A. R. Rossi, D. Crosetti and L. Sola (2004). "Microsatellite markers reveal population structure in gilthead sea bream *Sparus auratus* from the Atlantic Ocean and Mediterranean Sea." Fisheries Science **70**(5): 852-859.

Dempster, T., H. Moe Føre, A. Fredheim, Ø. Jensen and P. Sanchez-Jerez (2007). "Escapes of marine fish from sea-cage aquaculture in the Mediterranean Sea: status and prevention." CIESM Workshop Monogr. **32**: 55-60.

Denton, E. J. (1970). "Review lecture: On the organization of reflecting surfaces in some marine animals. Philosophical Transactions of the Royal Society of London." B, Biological Sciences (**258**): 285-313.

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

Dimitriadi, A., G. Geladakis and G. Koumoundouros (2021). "3Dheart morphological changes in response to developmental temperature in zebrafish: More than ventricle roundness." Journal of Morphology **282**(1): 80-87.

Dimitriou, E., G. Katselis, D. K. Moutopoulos, C. Akovitiotis and C. Koutsikopoulos (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**(4): 398-408.

Eaton, D. R. (1996). "The identification and separation of wild-caught and cultivated sea bass (*Dicentrarchus labrax*)." Fisheries Research Technical Report **103**: 12pp.

Eriksen, M. S., A. Espmark, B. O. Braastad, R. Salte and M. Bakken (2007). "Long-term effects of maternal cortisol exposure and mild hyperthermia during embryogeny on survival, growth and morphological anomalies in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* offspring." Journal of Fish Biology **70**(2): 462-473.

Eriksen, M. S., A. M. Espmark, T. Poppe, B. O. Braastad, R. Salte and M. Bakken (2008). "Fluctuating asymmetry in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) juveniles: also a maternal matter?" Environmental Biology of Fishes **81**(1): 87-99.

Esteban, M. (2012). "An Overview of the Immunological Defenses in Fish Skin." ISRN Immunology **2012**.

Excoffier, L. & H. E Lischer (2010). "Arlequin suite, version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows." Mol. Ecol. Resour **10**: 564–567.

FAO (1999). "Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream. The State of World Fisheries and Aquaculture." Rome, Italy. www.fao.org/docrep/w9950e/w9950e00.htm.

FAO (2016). " Contributing to food security and nutrition for all. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. " Rome, Italy: 200 pp.

FEAP (2017). "Federation of European Aquaculture Producers." Annual report 2017. Available at: http: //feap.info/

Fey, D. P. and J. A. Hare (2008). "Fluctuating asymmetry in the otoliths of larval Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus* (Latrobe) - a condition indicator?" Journal of Fish Biology **72**(1): 121-130.

Fiske, P., R. A. Lund and L. P. Hansen (2005). "Identifying Fish Farm Escapees." In: S. X. Cardin, L. A. Kerr and S. Mariani (Eds.), "*Stock Identification Methods, 1nd edn*." Elsevier Academic Press, San Diego: 659-680.

Fleming, W. R. (1974). "Electrolyte metabolism of teleosts—including calcified tissues." In: M. Florkin and B. T. Scheer (Eds.), "*Chemical Zoology, Vol. 8*" Academic Press, New York: 471–508.

Fragkoulis, S., M. Christou, R. Karo, C. Ritas, C. Tzokas, C. Batargias and G. Koumoundouros (2017). "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**(5): 2402-2410.

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

Franchini, P., L. Sola, D. Crosetti, V. Milana and A. R. Rossi (2012). "Low levels of population genetic structure in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*, along the coast of Italy." Ices Journal of Marine Science **69**(1): 41-50.

Franch, R., B. Louro, M. Tsalavouta, D. Chatziplis, C. S. Tsigenopoulos, E. Sarropoulou, J. Antonello, A. Magoulas, C. C. Mylonas, M. Babbucci, T. Patarnello, D. M. Power, G. Kotoulas and L. Bargelloni (2006). "A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L." Genetics **174**(2): 851-861.

Fuiman, L. A., K. R. Poling and D. M. Higgs (1998). "Quantifying developmental progress for comparative studies of larval fishes." Copeia(3): 602-611.

Funkenstein, B., B. Cavari, T. Stadie and E. Davidovitch (1990). "Restriction Site Polymorphism of Mitochondrial-DNA of the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) Broodstock in Eilat, Israel." Aquaculture **89**(3-4): 217-223.

Gagliano, M., M. Depczynski, S. D. Simpson and J. A. Y. Moore (2008). "Dispersal without errors: symmetrical ears tune into the right frequency for survival." Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences **275**(1634): 527-534.

Gagliano, M. and M. I. McCormick (2004). "Feeding history influences otolith shape in tropical fish." Marine Ecology Progress Series **278**: 291-296.

Galley, E. A., P. J. Wright and F. M. Gibb (2006). "Combined methods of otolith shape analysis improve identification of spawning areas of Atlantic cod." Ices Journal of Marine Science **63**(9): 1710-1717.

Garcia-Celdran, M., G. Ramis, E. Maria-Dolores, J. Penalver, Y. J. Borrell, M. Manchado, A. Estevez, J. M. Afonso and E. Armero (2016). "Genetic assessment of three gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) populations along the Spanish coast and of three broodstocks managements." Aquaculture International **24**(5): 1409-1420.

Geladakis, G., N. Nikolioudakis, G. Koumoundouros and S. Somarakis (2017). "Morphometric discrimination of pelagic fish stocks challenged by variation in body condition." Ices Journal of Marine Science **75**(2): 711-718.

Geladakis, G., S. Somarakis and G. Koumoundouros (2021). "Differences in otolith shape and fluctuating-asymmetry between reared and wild gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758)." Journal of Fish Biology **98**(1): 277-286.

Georga, I. and G. Koumoundouros (2010). "Thermally Induced Plasticity of Body Shape in Adult Zebrafish Danio rerio (Hamilton, 1822)." Journal of Morphology **271**(11): 1319-1327.

Georgakopoulou, E., P. Katharios, P. Divanach and G. Koumoundouros (2010). "Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758)." Aquaculture **308**(1-2): 13-19.

Georgakopoulou, E., D. G. Sfakianakis, S. Kouttouki, P. Divanach, M. Kentouri and G. Koumoundouros (2007). "The influence of temperature during early life on phenotypic expression at later ontogenetic stages in sea bass." Journal of Fish Biology **70**(1): 278-291.

Gilbert, S. F. (2001). "Ecological developmental biology: Developmental biology meets the real world." Developmental Biology **233**(1): 1-12.

Gkagkavouzis, K., N. Karaiskou, T. Katopodi, I. Leonardos, T. J. Abatzopoulos and A. Triantafyllidis (2019). "The genetic population structure and temporal genetic stability of gilthead sea bream *Sparus aurata* populations in the Aegean and Ionian Seas, using microsatellite DNA markers." Journal of Fish Biology **94**(4): 606-613.

Glaropoulos, A., V. M. Papadakis, I. E. Papadakis and M. Kentouri (2012). "Escape-related behavior and coping ability of sea bream due to food supply." Aquaculture International **20**(5): 965-979.

Govind, C. K. and J. Pearce (1986). "Differential reflex activity determines claw and closer muscle asymmetry in developing lobsters." Science **233**(4761): 354-356.

Grigorakis, K., M. N. Alexis, K. D. A. Taylor and M. Hole (2002). "Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*) composition, appearance and seasonal variations." International Journal of Food Science and Technology **37**(5): 477-484.

Goudet, J. (2002). "FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.4)." https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm

Heidarsson, T., T. Antonsson and S. S. Snorrason (2006). "The relationship between body and scale growth proportions and validation of two back-calculation methods using individually tagged and recaptured wild Atlantic salmon." Transactions of the American Fisheries Society **135**(5): 1156-1164.

Hussy, K. (2008). "Otolith shape in juvenile cod (*Gadus morhua*): Ontogenetic and environmental effects." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **364**(1): 35-41.

Hussy, K., H. Mosegaard, C. M. Albertsen, E. E. Nielsen, J. Hemmer-Hansen and M. Eero (2016). "Evaluation of otolith shape as a tool for stock discrimination in marine fishes using Baltic Sea cod as a case study." Fisheries Research **174**: 210-218.

Ibanez, A. L., K. Hernandez-Fraga and S. Alvarez-Hernandez (2017). "Discrimination analysis of phenotypic stocks comparing fish otolith and scale shapes." Fisheries Research **185**: 6-13.

Ichikawa, R. (1953). "Absorbtion of fish scale caused by starvation." Rec. Oceanorg. Works Jpn. N.S. **1**(2): 101-104.

Ikeda, Y., H. Ozaki and H. Yasuda (1974). "The effect of starvation and reduced diet on the growth of scales in goldfish." Bdl. Jpn. Sm. Sci. Fish. **40**(9): 859-868. (Japanese with English summary)

Izquierdo-Gomez, D., P. Arechavala-Lopez, J. T. Bayle-Sempere and P. Sanchez-Jerez (2017). "Assessing the influence of gilthead sea bream escapees in landings of Mediterranean fisheries through a scale-based methodology." Fisheries Management and Ecology **24**(1): 62-72.

Jackson, D., A. Drumm, S. McEvoy, O. Jensen, D. Mendiola, G. Gabina, J. A. Borg, N. Papageorgiou, I. Karakassis and K. D. Black (2015). "A pan-European valuation of the extent, causes and cost of escape events from sea cage fish farming." Aquaculture **436**: 21-26.

Jonsson, B. and N. Jonsson (2014). "Early environment influences later performance in fishes." Journal of Fish Biology **85**(2): 151-188.

Karaiskou, N., A. Triantafyllidis, V. Katsares, T. J. Abatzopoulos and C. Triantaphyllidis (2009). "Microsatellite variability of wild and farmed populations of *Sparus aurata*." Journal of Fish Biology **74**(8): 1816-1825.

Katayama, S. and I. Isshiki (2007). "Variation in otolith macrostructure of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): A method to discriminate between wild and released fish." Journal of Sea Research **57**(2-3): 180-186.

Kavan, D. and P. Man (2011). "MSTools-Web based application for visualization and presentation of HXMS data." International Journal of Mass Spectrometry **302**(1-3): 53-58.

Klingenberg, C. P. (2011). "MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics." Molecular Ecology Resources **11**(2): 353-357.

Klingenberg, C. P. (2013). "Visualizations in geometric morphometrics: how to read and how to make graphs showing shape changes." Hystrix-Italian Journal of Mammalogy **24**(1): 15-24.

Klingenberg, C. P. (2016). "Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics." Development Genes and Evolution **226**(3): 113-137.

Klingenberg, C. P. and G. S. McIntyre (1998). "Geometric morphometrics of developmental instability: Analyzing patterns of fluctuating asymmetry with procrustes methods." Evolution **52**(5): 1363-1375.

Klingenberg, C. P. and L. R. Monteiro (2005). "Distances and directions in multidimensional shape spaces: Implications for morphometric applications." Systematic Biology **54**(4): 678-688.

Koumoundouros, G., C. Ashton, D. G. Sfakianakis, P. Divanach, M. Kentouri, N. Anthwal and N. C. Stickland (2009). "Thermally induced phenotypic plasticity of swimming performance in European sea bass *Dicentrarchus labrax* juveniles." Journal of Fish Biology **74**(6): 1309-1322.

Koumoundouros, G., P. Divanach, L. Anezaki and M. Kentouri (2001). "Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*)." Marine Biology **139**(5): 817-830.

Koumoundouros, G., M. Pavlidis, L. Anezaki, C. Kokkari, K. Sterioti, P. Divanach and M. Kentouri (2002). "Temperature sex determination in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) (Teleostei, Perciformes, Moronidae): Critical sensitive ontogenetic phase." Journal of Experimental Zoology **292**(6): 573-579.

Kourkouta, C., A. Printzi, G. Geladakis, N. Mitrizakis, N. Papandroulakis and G. Koumoundouros (2021) "Long lasting effects of early temperature exposure on the swimming performance and skeleton development of metamorphosing Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae." Scientific reports **11**, 8787.

Leary, R. F., F. W. Allendorf and K. L. Knudsen (1991). "Effects of Rearing Density on Meristics and Developmental Stability of Rainbow-Trout." Copeia (**1**): 44-49.

Lee-Montero, I., A. Navarro, Y. Borrell, M. Garcia-Celdran, N. Martin, D. Negrin-Baez, G. Blanco, E. Armero, C. Berbel, M. J. Zamorano, J. J. Sanchez, A. Estevez, G. Ramis, M. Manchado and J. M. Afonso (2013). "Development of the first standardised panel of two new microsatellite multiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)." Animal Genetics **44**(5): 533-546.

Lens, L. and S. V. Dongen (2001). "Fluctuating asymmetry as an indicator of stress: paradigm or conservation tool?" Ostrich: 44-47.

Libungan, L. A. and S. Palsson (2015). "ShapeR: An R Package to Study Otolith Shape Variation among Fish Populations." Plos One **10**(3).

Lindsey, C. C. (1988). "3 Factors Controlling Meristic Variation." In: W. S. Hoar and D. J. Randall (Eds.), "*Fish Physiology, Vol. 11: The Physiology of Developing Fish, Part A: Eggs and Larvae.*": 197-274

Lleonart, J., J. Salat and G. J. Torres (2000). "Removing allometric effects of body size in morphological analysis." Journal of Theoretical Biology **205**(1): 85-93.

Loizides, M., E. Georgakopoulou, M. Christou, M. Iliopoulou, I. Papadakis, P. Katharios, P. Divanach and G. Koumoundouros (2014). "Thermally-induced phenotypic plasticity in gilthead seabream *Sparus aurata* L. (Perciformes, Sparidae)." Aquaculture **432**: 383-388.

Lombarte, A. and A. Cruz (2007). "Otolith size trends in marine fish communities from different depth strata." Journal of Fish Biology **71**(1): 53-76.

Lombarte, A. and J. Lleonart (1993). "Otolith Size Changes Related with Body Growth, Habitat Depth and Temperature." Environmental Biology of Fishes **37**(3): 297-306.

Loukovitis, D., C. Batargias, E. Sarropoulou, A. P. Apostolidis, G. Kotoulas, A. Magoulas, C. S. Tsigenopoulos and D. Chatziplis (2013). "Quantitative trait loci affecting morphology traits in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)." Animal Genetics **44**(4): 480-483.

Loukovitis, D., E. Sarropoulou, E. Vogiatzi, C. S. Tsigenopoulos, G. Kotoulas, A. Magoulas and D. Chatziplis (2011a). "Genetic variation in farmed populations of the gilthead sea bream *Sparus aurata* in Greece using microsatellite DNA markers." Aquaculture Research **43**(2): 239-246.

Loukovitis, D., E. Sarropoulou, C. S. Tsigenopoulos, C. Batargias, A. Magoulas, A. P. Apostolidis, D. Chatziplis and G. Kotoulas (2011b). "Quantitative Trait Loci Involved in Sex Determination and Body Growth in the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.) through Targeted Genome Scan." Plos One **6**(1).

Lowe, W., T. Martin, D. Skelly and H. Woods (2021). "Metamorphosis in an Era of Increasing Climate Variability." Trends in Ecology & Evolution **36**.

Lund, R. A. and L. P. Hansel, (1991). "Identification of wild and reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using scale characters." Aquaculture Research (**22**): 499-508.

Lychakov, D. V., Y. T. Rebane, A. Lombarte, L. A. Fuiman and A. Takabayashi (2006). "Fish otolith asymmetry: Morphometry and modeling." Hearing Research **219**(1-2): 1-11.

Mahe, K., C. Gourtay, G. B. Defruit, C. Chantre, H. de Pontual, R. Amara, G. Claireaux, C. Audet, J. L. Zarnbonino-Infante and B. Ernande (2019). "Do environmental conditions (temperature and food composition) affect otolith shape during fish early juvenile phase? An experimental approach applied to European Seabass (*Dicentrarchus labrax*)." Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **521**.

Mahe, K., D. Ider, A. Massaro, O. Hamed, A. Jurado-Ruzafa, P. Goncalves, A. Anastasopoulou, A. Jadaud, C. Mytilineou, R. Elleboode, Z. Ramdane, M. Bacha, R. Amara, H. de Pontual and B. Ernande (2019). "Directional bilateral asymmetry in otolith morphology may affect fish stock discrimination based on otolith shape analysis." Ices Journal of Marine Science **76**(1): 232-243.

Maroso, F., K. Gkagkavouzis, S. De Innocentiis, J. Hillen, F. do Prado, N. Karaiskou, J. B. Taggart, A. Carr, E. Nielsen, A. Triantafyllidis, L. Bargelloni and C. the Aquatrace (2021). "Genome-wide analysis clarifies the population genetic structure of wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*)." PLOS ONE **16**(1): e0236230.

Marr, J. C. (1957). "The problem of defining and recognizing subpopulations of fishes." US Fish Wildlife Serv Spec Sci Rep **208**:1–6.

Mateus, A., M. Mourad and D. Power (2020). "Skin damage caused by scale loss modifies the intestine of chronically stressed gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.)." Developmental & Comparative Immunology **118**: 103989.

Meyer, A. (1987). "Phenotypic Plasticity and Heterochrony in Cichlasoma-Managuense (Pisces, Cichlidae) and Their Implications for Speciation in Cichlid Fishes." Evolution **41**(6): 1357-1369.

Miggiano, E., S. De Innocentiis, A. Ungaro, L. Sola and D. Crosetti (2005). "AFLP and microsatellites as genetic tags to identify cultured gilthead seabream escapees: data from a simulated floating cage breaking event." Aquaculture International **13**(1-2): 137-146.

Mille, T., K. Mahe, M. C. Villanueva, H. De Pontual and B. Ernande (2015). "Sagittal otolith morphogenesis asymmetry in marine fishes." Journal of Fish Biology **87**(3): 646-663.

Milton, D. A. and J. B. Shaklee (1987). "Biochemical Genetics and Population-Structure of Blue Grenadier, Macruronus-Novaezelandiae (Hector) (Pisces, Merluccidae), from Australian Waters." Australian Journal of Marine and Freshwater Research **38**(6): 727-742.

Nikolioudakis, N., G. Koumoundouros, S. Kiparissis and S. Somarakis (2010). "Defining length-at-metamorphosis in fishes: a multi-character approach." Marine Biology **157**(5): 991-1001.

Oosterhout, V. C., W. F.Hutchinson, D. P. M. Wilis and P. Shipley (2004). "MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data." Molecular Ecology **4**: 535–538.

Ozturk, R. C. and I. Altinok (2017). "Analysis of Microsatellite Data for Population Genetics of Aquatic Organisms." Genetics of Aquatic Organisms **1**: 71-79.

Paetkau, D. and C. Strobeck (1995). "The Molecular-Basis and Evolutionary History of a Microsatellite Null Allele in Bears." Molecular Ecology **4**(4): 519-520.

Paetkau, D., L. P. Waits, P. L. Clarkson, L. Craighead and C. Strobeck (1997). "An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (Ursidae) populations." Genetics **147**(4): 1943-1957.

Palma, J., J. A. Alarcon, C. Alvarez, E. Zouros, A. Magoulas and J. P. Andrade (2001). "Developmental stability and genetic heterozygosity in wild and cultured stocks of gilthead sea bream (*Sparus aurata*)." Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom **81**(2): 283-288.

Palmer, A. R. and C. Strobeck (1986). "Fluctuating Asymmetry - Measurement, Analysis, Patterns." Annual Review of Ecology and Systematics **17**: 391-421.

Palmer A.R. (1994) "Fluctuating asymmetry analyses: a primer". In: T.A. Markow (Eds) "*Developmental Instability: Its Origins and Evolutionary Implications.*" Contemporary Issues in Genetics and Evolution, vol 2. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0830-0_26

Palmer, M., M. Linde and B. Morales-Nin (2010). "Disentangling fluctuating asymmetry from otolith shape." Marine Ecology Progress Series **399**: 261-272.

Panfili, J., J. D. Durand, K. Diop, B. Gourene and M. Simier (2005). "Fluctuating asymmetry in fish otoliths and heterozygosity in stressful estuarine environments (West Africa)." Marine and Freshwater Research **56**(5): 505-516.

Parsons, P. A. (1990). "Fluctuating Asymmetry - an Epigenetic Measure of Stress." Biological Reviews **65**(2): 131-145.

Pawson, M. G. (1990). "Using Otolith Weight to Age Fish." Journal of Fish Biology **36**(4): 521-531.

Pawson, M. G. and S. Jennings (1996). "A critique of methods for stock identification in marine capture fisheries." Fisheries Research **25**(3-4): 203-217.

Persson, P., J. M. Shrimpton, S. D. McCormick and B. T. Bjornsson (2000). "The presence of high-affinity, low-capacity estradiol-17 beta binding in rainbow trout scale indicates a possible endocrine route for the regulation of scale resorption." General and Comparative Endocrinology **120**(1): 35-43.

Persson, P., K. Sundell, B. T. Bjornsson and H. Lundqvist (1998). "Calcium metabolism and osmoregulation during sexual maturation of river running Atlantic salmon." Journal of Fish Biology **52**(2): 334-349.

Petursdottir, G., G. A. Begg and G. Marteinsdottir (2006). "Discrimination between Icelandic cod (*Gadus morhua* L.) populations from adjacent spawning areas based on otolith growth and shape." Fisheries Research **80**(2): 182-189.

Pierce, C. L., J. B. Rasmussen and W. C. Leggett (1996). "Back-calculation of fish length from scales: Empirical comparison of proportional methods." Transactions of the American Fisheries Society **125**(6): 889-898.

Pigliucci, M., C. J. Murren and C. D. Schlichting (2006). "Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation." Journal of Experimental Biology **209**(12): 2362-2367.

Pimentel, M. S., F. Faleiro, G. Dionisio, T. Repolho, P. Pousao-Ferreira, J. Machado and R. Rosa (2014). "Defective skeletogenesis and oversized otoliths in fish early stages in a changing ocean." Journal of Experimental Biology **217**(12): 2062-2070.

Pimentel, M. S., F. Faleiro, J. Machado, P. Pousao-Ferreira and R. Rosa (2020). "Seabream Larval Physiology under Ocean Warming and Acidification." Fishes **5**(1).

Pollock, B. R. (2015). "Saddleback syndrome in yellowfin bream [Acanthopagrus australis (Gunther, 1859)] in Moreton Bay, Australia: its form, occurrence, association with other abnormalities and cause." Journal of Applied Ichthyology **31**(3): 487-493.

Polovina, E. S., E. Kourkouni, C. S. Tsigenopoulos, P. Sanchez-Jerez and E. D. Ladoukakis (2020). "Genetic structuring in farmed and wild Gilthead seabream and European seabass in the Mediterranean Sea: implementations for detection of escapees." Aquatic Living Resources **33**.

Popper, A. N. and S. Coombs (1980). "Auditory Mechanisms in Teleost Fishes." American Scientist **68**(4): 429-440.

Popper, A. N. and Z. M. Lu (2000). "Structure-function relationships in fish otolith organs." Fisheries Research **46**(1-3): 15-25.

Popper, A. N., J. Ramcharitar and S. E. Campana (2005). "Why otoliths? Insights from inner ear physiology and fisheries biology." Marine and Freshwater Research **56**(5): 497-504.

Poulet, N., Y. Reyjol, H. Collier and S. Lek (2005). "Does fish scale morphology allow the identification of populations at a local scale? A case study for rostrum dace Leuciscus leuciscus burdigalensis in River Viaur (SW France)." Aquatic Sciences **67**(1): 122-127.

Reimer, T., T. Dempster, A. Wargelius, P. G. Fjelldal, T. Hansen, K. A. Glover, M. F. Solberg and S. E. Swearer (2017). "Rapid growth causes abnormal vaterite formation in farmed fish otoliths." Journal of Experimental Biology **220**(16): 2965-2969.

Reimer, T., T. Dempster, F. Warren-Myers, A. J. Jensen and S. E. Swearer (2016). "High prevalence of vaterite in sagittal otoliths causes hearing impairment in farmed fish." Scientific Reports **6**.

Reist, J. (2011). "An empirical evaluation of several univariate methods that adjust for size variation in morphometric data." Canadian Journal of Zoology **63**: 1429-1439.

Rice, W. R. (1989). "Analyzing Tables of Statistical Tests." Evolution **43**(1): 223-225.

Roff, D. (1999). "Phenotypic Evolution — A Reaction Norm Perspective." Heredity **82**: 344-344.

Rogdakis, Y., K. Koukou, A. Ramfos, E. Dimitriou and G. Katselis (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. (2010). "TpsDig, Digitize Landmarks and Outlines, Version 2.12." Department of Ecology and Evolution, State University of New York, Stony Brook, NY.

Rohlf, F. J. and J. W. Archie (1984). "A Comparison of Fourier Methods for the Description of Wing Shape in Mosquitos (Diptera, Culicidae)." Systematic Zoology **33**(3): 302-317.

Rohlf, F. J., A. Loy and M. Corti (1996). "Morphometric analysis of old world talpidae (Mammalia, Insectivora) using partial-warp scores." Systematic Biology **45**(3): 344-362.

Rossi, A. R., E. Perrone and L. Sola (2006). "Genetic structure of gilthead seabream, *Sparus aurata*, in the central Mediterranean sea." Central European Journal of Biology **1**(4): 636-647.

Rousset, F. (2008). "Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. v. 4.7.5" Mol. Ecol. Resources **8**: 103-106.

Russo, T., C. Costa and S. Cataudella (2007). "Correspondence between shape and feeding habit changes throughout ontogeny of gilthead sea bream *Sparus aurata* L., 1758." Journal of Fish Biology **71**(3): 629-656.

Sarropoulou, E., R. Franch, B. Louro, D. M. Power, L. Bargelloni, A. Magoulas, F. Senger, M. Tsalavouta, T. Patarnello, F. Galibert, G. Kotoulas and R. Geisler (2007). "A gene-based radiation hybrid map of the gilthead sea bream *Sparus aurata* refines and exploits conserved synteny with Tetraodon nigroviridis." Bmc Genomics **8**.

Sawayama, E., H. Nakao, W. Kobayashi, T. Minami and M. Takagi (2019). "Identification and quantification of farmed red sea bream escapees from a large aquaculture area in Japan using microsatellite DNA markers." Aquatic Living Resources **32**.

Schneider, C. A., W. S. Rasband and K. W. Eliceiri (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis." Nature Methods **9**(7): 671-675.

Segvic-Bubic, T., I. Lepen, Z. Trumbic, J. Ljubkovic, D. Sutlovic, S. Matic-Skoko, L. Grubisic, B. Glamuzina and I. Mladineo (2011). "Population genetic structure of reared and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) in the Adriatic Sea inferred with microsatellite loci." Aquaculture **318**(3-4): 309-315.

Segvic-Bubic, T., I. Talijancic, L. Grubisic, D. Izquierdo-Gomez and I. Katavic (2014). "Morphological and molecular differentiation of wild and farmed gilthead sea bream *Sparus aurata*: implications for management." Aquaculture Environment Interactions **6**(1): 43-54.

Segvic-Bubic, T., I. Talijancic, L. Vulic, B. Segvic, I. Zuzul, I. Radonic and L. Grubisic (2020). "Assignment of Gilthead Seabream *Sparus aurata* to Its Origin through Scale Shape and Microchemistry Composition: Management Implications for Aquaculture Escapees." Water **12**(11).

Sfakianakis, D. G., I. Leris, A. Laggis and M. Kentouri (2011). "The effect of rearing temperature on body shape and meristic characters in zebrafish (*Danio rerio*) juveniles." Environmental Biology of Fishes **92**(2): 197-205.

Slatkin, M. (1995). "A Measure of Population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencies." Genetics **139**(1): 457-462.

Sola, L., A. Moretti, D. Crosetti, N. Karaiskou, A. Magoulas, A. R. Rossi, M. Rye, A. Triantafyllidis and C. S. Tsigenopoulos (2006). "Gilthead seabream - *Sparus aurata*". Genimpact final scientific report: 47-54.

Somarakis, S., I. Kostikas, N. Peristeraki and N. Tsimenides (1997a). "Fluctuating asymmetry in the otoliths of larval anchovy Engraulis encrasicolus and the use of developmental instability as an indicator of condition in larval fish." Marine Ecology Progress Series **151**(1-3): 191-203.

Somarakis, S., I. Kostikas and N. Tsimenides (1997b). "Fluctuating asymmetry in the otoliths of larval fish as an indicator of condition: conceptual and methodological aspects." Journal of Fish Biology **51**: 30-38.

Somarakis, S., M. Pavlidis, C. Saapoglou, C. S. Tsigenopoulos and T. Dempster (2013). "Evidence for 'escape through spawning' in large gilthead sea bream *Sparus aurata* reared in commercial sea-cages." Aquaculture Environment Interactions **3**(2): 135-152.

Souza, A. T., K. Soukalova, V. Ded, M. Smejkal, K. Moraes, M. Riha, M. Muska, J. Frouzova and J. Kubecka (2020). "Otolith shape variations between artificially stocked and autochthonous pikeperch (*Sander lucioperca*)." Fisheries Research **231**.

Stephenson, R. L. (1999). "Stock complexity in fisheries management: a perspective of emerging issues related to population sub-units." Fisheries Research **43**(1-3): 247-249.

Swain, D. P., J. A. Hutchings and C. J. Foote (2005). "Environmental and Genetic Influences on Stock Identification Characters". In: S. X. Cardin, L. A. Kerr and S. Mariani (Eds.), "*Stock Identification Methods, 1nd edn*." Elsevier Academic Press, San Diego: 45-85.

Sylvester, E. V. A., B. F. Wringe, S. J. Duffy, L. C. Hamilton, I. A. Fleming, M. Castellani, P. Bentzen and I. R. Bradbury (2019). "Estimating the relative fitness of escaped farmed salmon offspring in the wild and modelling the consequences of invasion for wild populations." Evolutionary Applications **12**(4): 705-717.

Teimori, A., A. Khajooei, M. Motamedi and M. A. Hesni (2019). "Characteristics of sagittae morphology in sixteen marine fish species collected from the Persian Gulf: Demonstration of the phylogenetic influence on otolith shape." Regional Studies in Marine Science **29**.

Thorstad, E., I. Fleming, P. McGinnity, D. Soto, V. Wennevik and F. Whoriskey (2008). Incidence and Impacts of Escaped Farmed Atlantic Salmon *Salmo salar* in Nature. **36:** 1-108.

Tomas, J. and A. J. Geffen (2003). "Morphometry and composition of aragonite and vaterite otoliths of deformed laboratory reared juvenile herring from two populations." Journal of Fish Biology **63**(6): 1383-1401.

Tort, A. (2003). "Elliptical Fourier functions as a morphological descriptor of the genus Stenosarina (Brachiopoda, Terebratulida, New Caledonia)." Mathematical Geology **35**(7): 873-885.

Tuset, V. M., A. Lombarte, M. Bariche, F. Maynou and E. Azzurro (2020). "Otolith morphological divergences of successful Lessepsian fishes on the Mediterranean coastal waters." Estuarine Coastal and Shelf Science **236**.

Vagner, M., J. L. Zambonino-Infante and D. Mazurais (2019). "Fish facing global change: are early stages the lifeline?" Marine Environmental Research **147**: 159-178.

Vernerey, F. J. and F. Barthelat (2014). "Skin and scales of teleost fish: Simple structure but high performance and multiple functions." Journal of the Mechanics and Physics of Solids **68**: 66-76.

Vieira, F. A., S. F. Gregorio, S. Ferraresso, M. A. S. Thorne, R. Costa, M. Milan, L. Bargelloni, M. S. Clark, A. V. M. Canario and D. M. Power (2011). "Skin healing and scale regeneration in fed and unfed sea bream, *Sparus auratus*." Bmc Genomics **12**.

Vignon, M. (2015). "Disentangling and quantifying sources of otolith shape variation across multiple scales using a new hierarchical partitioning approach." Marine Ecology Progress Series **534**: 163-177.

Vignon, M. (2018). "Short-term stress for long-lasting otolith morphology-brief embryological stress disturbance can reorient otolith ontogenetic trajectory." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **75**(10): 1713-1722.

Vignon, M. and F. Morat (2010). "Environmental and genetic determinant of otolith shape revealed by a non-indigenous tropical fish." Marine Ecology Progress Series **411**: 231-241.

Vollestad, L. A. and K. Hindar (1997). "Developmental stability and environmental stress in *Salmo salar* (Atlantic salmon)." Heredity **78**: 215-222.

Vrdoljak, D., S. Matić-Skoko, M. Peharda, H. Uvanović, K. Markulin and R. Mertz-Kraus (2020). "Otolith fingerprints reveals potential pollution exposure of newly settled juvenile *Sparus aurata*." Marine Pollution Bulletin **160**: 111695.

Waldman, J. R. and J. V. Victor (1996). "Selected Biocharacteristics of Hatchery-Reared Striped Bass Captured in New York Ocean Waters." North American Journal of Fisheries Management **16**: 14-23.

Walsh, P. S., D. A. Metzger and R. Higuchi (1991). "Chelex-100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for Pcr-Based Typing from Forensic Material." Biotechniques **10**(4): 506-513.

Waples, R. S. (2015). "Testing for Hardy-Weinberg Proportions: Have We Lost the Plot?" Journal of Heredity **106**(1): 1-19.

Warner, R. R., S. E. Swearer, J. E. Caselle, M. Sheehy and G. Paradis (2005). "Natal trace-elemental signatures in the otoliths of an open-coast fish." Limnology and Oceanography **50**(5): 1529-1542.

Williams, T. and B. C. Bedford (1974). "The Use of Otoliths in Age Determination." In: T. B. Bagenal (Eds.), "*The Ageing of Fish.*" Unwin Brothers, Old Woking, SY: 114–123.

Yang, W., I. H. Chen, B. Gludovatz, E. A. Zimmermann, R. O. Ritchie and M. A. Meyers (2013). "Natural Flexible Dermal Armor." Advanced Materials **25**(1): 31-48.

Yeh, F., R. Young and T. Boyle (2000). "POPGENE, Version 1.32. A Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis." Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada.

Zelditch, M.A. (2012). "*Geometric morphometrics for biologists : a primer,* 2nd edition." Amsterdam, Boston: Elsevier Academic Press.

Zhu, D., F. Barthelat, F. Vernerey, (2013). "Intricate Multiscale Mechanical Behaviors of Natural Fish-Scale Composites." In: L. Shaofan and G. Xin-Li (Eds.), "*Handbook of Micromechanics and Nanomechanics*". Materials Science: 975-998.

Zuzul, I., T. Segvic-Bubic, I. Talijancic, T. Dzoic, I. L. Pleic, G. B. Paklar, S. Ivatek-Sahdan, I. Katavic and L. Grubisic (2019). "Spatial connectivity pattern of expanding gilthead seabream populations and its interactions with aquaculture sites: a combined population genetic and physical modelling approach." Scientific Reports **9**.

Γελαδάκης, Γ. (2016). "Συγκριτική μελέτη της διακύμανσης του σχήματος σώματος και ωτολίθων σε τσιπούρες (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758) από διαφορετικές περιοχές του Ελλαδικού χώρου." Μεταπτυχιακή εργασία, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Δημητρίου, Ε. (2007). "Συμβολή στη μελέτη της αύξησης και της ηθολογίας της τσιπούρας (*Sparus aurata*, L.) στο σύμπλεγμα των λιμνοθαλασσών Μεσολογγίου-Αιτωλικού." Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1

Πίνακας $Π_{1.1}$. Πίνακας τιμών για τον δείκτη ασυμμετρίας ωτολίθων FA_1 των δειγμάτων φυσικής προέλευσης. Οι υποδιαιρέσεις των δειγμάτων έχουν γίνει με βάση τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD, %). L30, άτομα με SRD ≤30%. M30-60, άτομα με SRD 31-60%. M60, άτομα με SRD >60%. O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8.

		Κ. Ιόνιο	**Κέρκυρα**	**Πατραϊκός**	**Μεσολόγγι**	**Κάλυμνος**	**Μαλιακός**	**Β. Αιγαίο**
O_S	L30	0,380286	0,251913	0,493204	0,216318	0,310326	0,302412	0,601240
	M30-60	0,420281	0,319734	0,390499	0,250723	0,485203	0,461214	0,366412
	M60	0,299196	0,524436	0,999282	0,232128	0,456967	0,351706	0,507077
O_P	L30	0,117712	0,157594	0,263183	0,125990	0,119608	0,254303	0,156104
	M30-60	0,455515	0,125165	0,126559	0,129066	0,127398	0,330615	0,489528
	M60	0,324609	0,150424	0,349583	0,076540	0,065769	0,405111	1,140257
O_L	L30	0,016141	0,018377	0,030249	0,010663	0,017644	0,009725	0,011301
	M30-60	0,030203	0,015186	0,028792	0,009723	0,025412	0,010928	0,040414
	M60	0,039520	0,022840	0,022199	0,015614	0,020427	0,030852	0,017136
O_D	L30	0,014298	0,011684	0,019130	0,017251	0,018791	0,012730	0,031595
	M30-60	0,021016	0,009645	0,014665	0,007408	0,023717	0,014318	0,012174
	M60	0,011796	0,014296	0,007125	0,018487	0,006496	0,011615	0,014769
H_2	L30	0,000022	0,000036	0,000014	0,000039	0,000016	0,000015	0,000009
	M30-60	0,000022	0,000021	0,000035	0,000014	0,000034	0,000007	0,000013
	M60	0,000011	0,000034	0,000246	0,000019	0,000017	0,000003	0,000146
H_3	L30	0,000013	0,000007	0,000008	0,000013	0,000012	0,000010	0,000010
	M30-60	0,000006	0,000017	0,000012	0,000006	0,000014	0,000023	0,000019
	M60	0,000010	0,000015	0,000017	0,000017	0,000009	0,000000	0,000013
H_4	L30	0,000008	0,000009	0,000004	0,000003	0,000007	0,000003	0,000006
	M30-60	0,000005	0,000007	0,000005	0,000008	0,000007	0,000004	0,000006
	M60	0,000018	0,000014	0,000012	0,000012	0,000006	0,000048	0,000011
H_5	L30	0,000006	0,000005	0,000005	0,000008	0,000006	0,000004	0,000016
	M30-60	0,000006	0,000009	0,000007	0,000003	0,000004	0,000007	0,000007
	M60	0,000003	0,000006	0,000009	0,000005	0,000006	0,000000	0,000006
H_6	L30	0,000005	0,000004	0,000004	0,000003	0,000005	0,000007	0,000003
	M30-60	0,000006	0,000008	0,000004	0,000005	0,000004	0,000010	0,000007
	M60	0,000007	0,000012	0,000009	0,000008	0,000007	0,000003	0,000008
H_7	L30	0,000003	0,000003	0,000003	0,000002	0,000002	0,000001	0,000003
	M30-60	0,000002	0,000004	0,000002	0,000001	0,000002	0,000001	0,000003
	M60	0,000005	0,000004	0,000004	0,000001	0,000001	0,000003	0,000003
H_8	L30	0,000002	0,000003	0,000003	0,000002	0,000003	0,000001	0,000002
	M30-60	0,000005	0,000002	0,000003	0,000001	0,000002	0,000006	0,000002
	M60	0,000002	0,000005	0,000007	0,000004	0,000004	0,000000	0,000004

Πίνακας $\Pi_{1.2}$. Πίνακας τιμών για τον δείκτη ασυμμετρίας ωτολίθων FA_2 των δειγμάτων φυσικής προέλευσης. Οι υποδιαιρέσεις των δειγμάτων έχουν γίνει με βάση τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD, %). L30, άτομα με SRD ≤30%. M30-60, άτομα με SRD 31-60%. M60, άτομα με SRD >60%. O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος, H_2-H_8: αρμονικές 2-8.

		Κ. Ιόνιο	**Κέρκυρα**	**Πατραϊκός**	**Μεσολόγγι**	**Κάλυμνος**	**Μαλιακός**	**Β. Αιγαίο**
O_S	L30	0,459718	0,369846	0,619130	0,371845	0,460585	0,389059	0,659266
	M30-60	0,556325	0,423613	0,510444	0,393076	0,551188	0,674320	0,415174
	M60	0,444647	0,510522	0,621357	0,356878	0,485760	0,419348	0,527917
O_P	L30	0,293223	0,296797	0,424556	0,276546	0,295483	0,413047	0,339318
	M30-60	0,409498	0,279049	0,296517	0,288688	0,288394	0,411681	0,510084
	M60	0,415857	0,250679	0,438123	0,227025	0,251440	0,450062	0,650422
O_L	L30	0,105935	0,126128	0,108805	0,087584	0,097765	0,078954	0,093483
	M30-60	0,134206	0,137099	0,114256	0,100191	0,132282	0,138830	0,147983
	M60	0,138192	0,135993	0,098871	0,122311	0,121863	0,124201	0,099758
O_D	L30	0,103791	0,091762	0,131203	0,106219	0,107659	0,086543	0,149363
	M30-60	0,116907	0,078515	0,094359	0,067587	0,113121	0,099651	0,080924
	M60	0,077404	0,081596	0,099200	0,092540	0,109445	0,076207	0,105832
H_2	L30	0,003727	0,004217	0,003288	0,004825	0,003425	0,002692	0,002281
	M30-60	0,003625	0,003602	0,004728	0,003251	0,004912	0,003421	0,002718
	M60	0,002476	0,004016	0,009497	0,003715	0,003212	0,001266	0,005582
H_3	L30	0,002631	0,001995	0,002345	0,002665	0,002705	0,002501	0,002517
	M30-60	0,001902	0,003115	0,002633	0,002079	0,002955	0,004144	0,003489
	M60	0,002832	0,002793	0,002722	0,002912	0,003105	0,001885	0,002728
H_4	L30	0,002130	0,002367	0,001717	0,001322	0,002257	0,001584	0,002187
	M30-60	0,002232	0,002092	0,002201	0,002315	0,002169	0,001772	0,001893
	M60	0,003048	0,002517	0,002521	0,003485	0,003166	0,005631	0,002485
H_5	L30	0,001745	0,001723	0,001738	0,002323	0,001997	0,001406	0,002807
	M30-60	0,001846	0,002439	0,001848	0,001283	0,001727	0,002845	0,002176
	M60	0,001352	0,002112	0,002334	0,001588	0,002066	0,000916	0,001877
H_6	L30	0,001835	0,001467	0,001553	0,001326	0,001910	0,002638	0,001519
	M30-60	0,002211	0,002144	0,001544	0,001769	0,001521	0,002460	0,002450
	M60	0,002057	0,002332	0,002244	0,002047	0,002023	0,002911	0,002065
H_7	L30	0,001463	0,001276	0,001403	0,001185	0,001201	0,000974	0,001366
	M30-60	0,001215	0,001388	0,001027	0,000848	0,001260	0,001282	0,001536
	M60	0,001629	0,001602	0,001509	0,001100	0,000993	0,001251	0,001427
H_8	L30	0,001138	0,001396	0,001447	0,001209	0,001470	0,000810	0,001095
	M30-60	0,001610	0,001185	0,001168	0,000893	0,000973	0,001839	0,001473
	M60	0,001339	0,001852	0,001937	0,001470	0,001658	0,001072	0,001494

Παράρτημα 2

Πίνακας Π_2. Πίνακας τιμών των κανονικοποιημένων μεταβλητών μεγέθους ωτολίθου των δειγμάτων φυσικής προέλευσης. Οι υποδιαιρέσεις των δειγμάτων έχουν γίνει με βάση τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD, %). L30, άτομα με SRD ≤30%. M30-60, άτομα με SRD 31-60%. M60, άτομα με SRD >60%. O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος.

		Κ. Ιόνιο	**Κέρκυρα**	**Πατραϊκός**	**Κάλυμνος**	**Μαλιακός**	**Β. Αιγαίο**	**Μεσολόγγι**
O_S^*-L	L30	20,322	19,546	21,146	20,700	20,954	19,726	20,299
	M30-60	20,283	19,887	21,095	20,334	20,370	20,172	20,101
	M60	20,346	19,841	21,393	20,536	20,595	21,193	20,565
O_P^*-L	L30	18,715	18,087	18,898	18,661	19,038	18,455	18,806
	M30-60	18,548	18,264	18,946	18,501	18,707	18,803	18,689
	M60	18,421	18,255	19,002	18,678	18,173	18,744	18,885
O_L^*-L	L30	7,026	6,865	7,098	7,005	6,859	6,781	7,107
	M30-60	7,057	6,898	7,212	7,056	6,663	6,931	7,065
	M60	7,081	7,004	7,267	7,102	6,799	7,059	7,069
O_D^*-L	L30	3,991	3,894	4,208	4,116	4,155	4,035	4,115
	M30-60	3,928	3,916	4,210	4,063	4,058	4,093	4,138
	M60	3,928	3,900	4,263	4,013	4,043	4,153	4,174
O_D^*:O_L^*-L	L30	0,569	0,568	0,594	0,588	0,607	0,595	0,580
	M30-60	0,557	0,568	0,584	0,577	0,611	0,591	0,586
	M60	0,556	0,557	0,586	0,567	0,597	0,589	0,591
O_S^*-R	L30	20,40	19,45	20,80	20,53	20,90	19,82	20,16
	M30-60	20,10	19,75	21,08	20,08	20,85	20,19	20,16
	M60	20,45	19,78	20,97	20,95	20,34	21,41	20,56
O_P^*-R	L30	18,677	18,073	18,639	18,597	19,115	18,599	18,580
	M30-60	18,417	18,173	19,023	18,361	18,859	18,669	18,682
	M60	18,513	18,256	19,117	18,821	18,301	19,028	18,901
O_L^*-R	L30	7,009	6,777	7,016	6,971	6,878	6,831	7,051
	M30-60	7,029	6,785	7,234	7,002	6,787	6,847	6,988
	M60	7,083	6,920	7,257	7,065	6,713	7,075	6,959
O_D^*-R	L30	4,025	3,852	4,141	4,099	4,177	4,045	4,070
	M30-60	3,931	3,882	4,187	4,028	4,128	4,145	4,144
	M60	3,930	3,945	4,175	4,119	4,046	4,191	4,184
O_D^*:O_L^*-R	L30	0,575	0,568	0,591	0,589	0,608	0,593	0,578
	M30-60	0,560	0,573	0,579	0,576	0,610	0,606	0,593
	M60	0,555	0,571	0,575	0,585	0,604	0,593	0,601

Παράρτημα 3

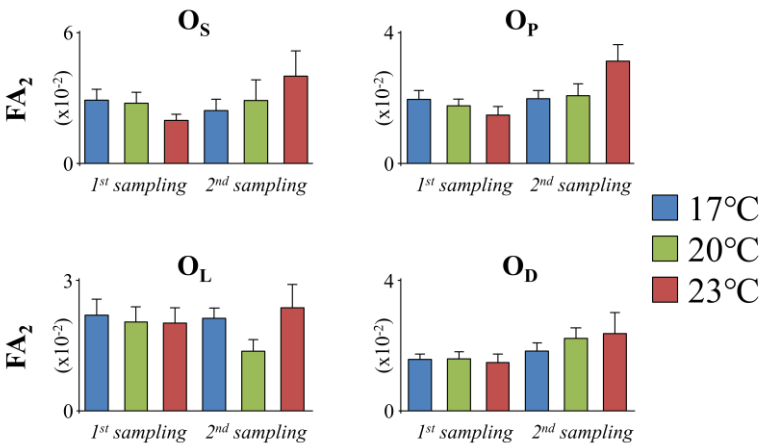
Πίνακας $Π_{3.2}$. Πίνακας τιμών των κανονικοποιημένων μεταβλητών μεγέθους των ωτολίθων των 3 πειραματικών ομάδων ψαριών (17, 20, 23°C) στο στάδιο της μεταμόρφωσης (56-58 ημέρες μετά την εκκόλαψη). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος.

	17ºC	**20ºC**	**23ºC**
O_S^*-L	0,372	0,375	0,379
O_P^*-L	2,419	2,429	2,459
O_L^*-L	0,902	0,905	0,913
O_D^*-L	0,620	0,616	0,622
O_D^*:O_L^*-L	0,688	0,681	0,681
O_S^*-R	0,374	0,374	0,382
O_P^*-R	2,427	2,415	2,471
O_L^*-R	0,897	0,894	0,908
O_D^*-R	0,620	0,616	0,625
O_D^*:O_L^*-R	0,692	0,690	0,689

Πίνακας $Π_{3.2}$. Πίνακας τιμών των κανονικοποιημένων μεταβλητών μεγέθους των ωτολίθων των 3 πειραματικών ομάδων ψαριών (17, 20, 23°C) στο στάδιο του ιχθυδίου (93-95 ημέρες μετά την εκκόλαψη). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος.

	17ºC	**20ºC**	**23ºC**
O_S^*-L	1,040	1,011	0,998
O_P^*-L	4,135	4,124	4,133
O_L^*-L	1,529	1,517	1,515
O_D^*-L	1,008	0,988	0,981
O_D^*:O_L^*-L	0,660	0,652	0,648
O_S^*-R	1,037	1,016	1,018
O_P^*-R	4,143	4,179	4,138
O_L^*-R	1,514	1,508	1,511
O_D^*-R	0,998	0,991	0,987
O_D^*:O_L^*-R	0,660	0,657	0,654

Παράρτημα 4



Εικόνα Π4. Εξέλιξη της ασυμμετρίας μεγέθους (δείκτης FA_2) των ωτολίθων τσιπούρας από το τέλος του σταδίου της μεταμόρφωσης (1st sampling) στο στάδιο του ιχθυδίου (2nd sampling) για τις ομάδες ψαριών με διαφορετική θερμοκρασία πρώιμης ανάπτυξης (17°C, 20°C, 23°C). O_S: επιφάνεια, O_P: περίμετρος, O_L: μέγιστο μήκος, O_D: μέγιστο πλάτος.

Πίνακας Π4. Πίνακας τιμών για τον δείκτη ασυμμετρίας FA_2 των ωτολίθων των 3 πειραματικών ομάδων ψαριών (17, 20, 23°C) στο στάδιο της μεταμόρφωσης (1st sampling) και στο στάδιο του ιχθυδίου (2nd sampling), H_2-H_8: αρμονικές 2-8.

	1st sampling			*2nd samling*		
	17°C	**20°C**	**23°C**	**17°C**	**20°C**	**23°C**
H_2	0,007	0,006	0,008	0,009	0,006	0,011
H_3	0,003	0,004	0,005	0,005	0,004	0,006
H_4	0,004	0,003	0,004	0,003	0,004	0,006
H_5	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,004
H_6	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,003
H_7	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
H_8	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002

Παράρτημα 5

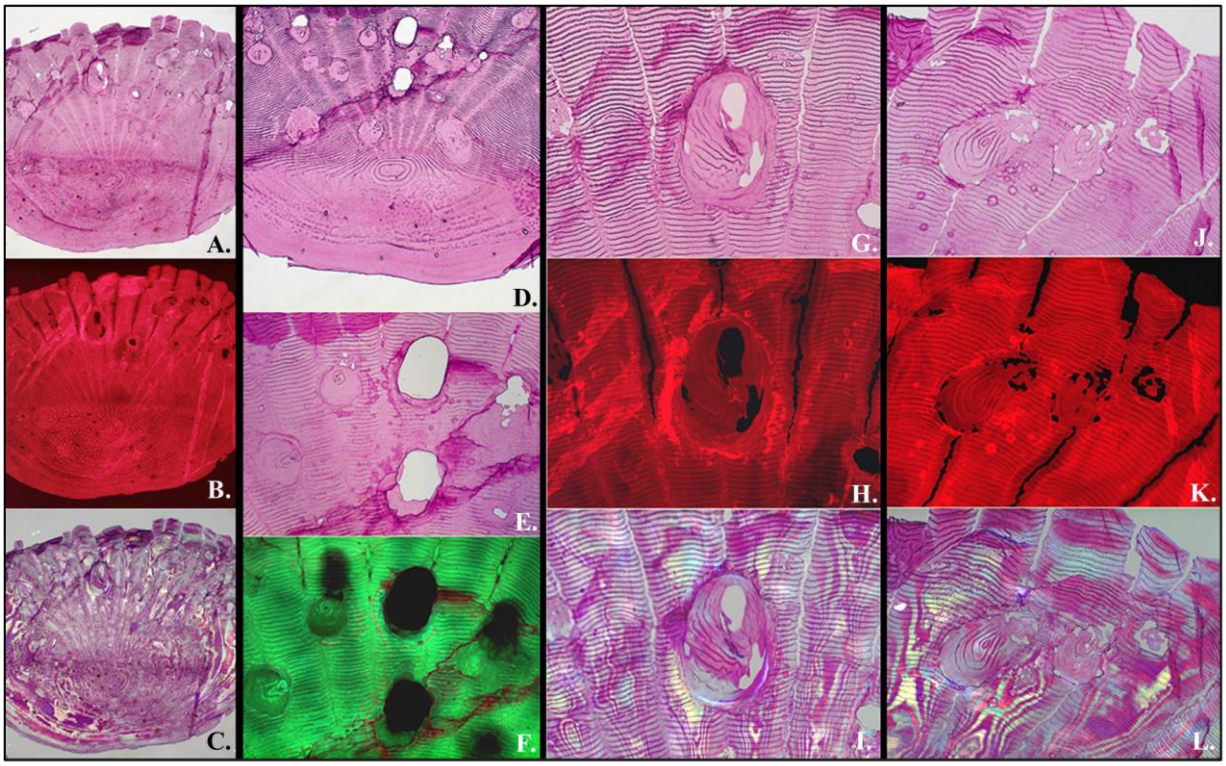
Πίνακας $Π_{5.1}$. Πίνακας τιμών για τον δείκτη ασυμμετρίας FA_1 των ωτολίθων κοινού πληθυσμού τσιπούρας, κατά την περίοδο της σωματικής αύξησης των ατόμων σε δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2). Ht-c: δείγμα που πάρθηκε από τον εμπορικό σταθμό στις 122 μέρες μετά την εκκόλαψη (dph). Cg1-a, Cg1-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg1 στις 136 και 314 dph αντίστοιχα. Cg2-a, Cg2-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg2 στις 165 και 393 dph αντίστοιχα. Τα ψάρια των κλωβών Cg1 και Cg2 προέρχονται από τον πληθυσμό του εμπορικού σταθμού (Ht). H_2-H_8: Αρμονικές 2-8.

	122 dph	**136-165 dph**		**14-393 dph**	
	Ht-c	**Cg1-a**	**Cg2-a**	**Cg1-b**	**Cg2-b**
H_2	0,000496	0,000388	0,000459	0,000387	0,000503
H_3	0,000063	0,000039	0,000046	0,000073	0,000082
H_4	0,000087	0,000056	0,000058	0,000072	0,000134
H_5	0,000035	0,000034	0,000078	0,000022	0,000046
H_6	0,000023	0,000030	0,000042	0,000016	0,000044
H_7	0,000016	0,000012	0,000016	0,000008	0,000008
H_8	0,000005	0,000011	0,000013	0,000006	0,000014

Πίνακας $Π_{5.2}$. Πίνακας τιμών για τον δείκτη ασυμμετρίας FA_2 των ωτολίθων κοινού πληθυσμού τσιπούρας, κατά την περίοδο της σωματικής αύξησης των ατόμων σε δύο γεωγραφικά διακριτά περιβάλλοντα εκτροφής (Cg1, Cg2). Ht-c: δείγμα που πάρθηκε από τον εμπορικό σταθμό στις 122 μέρες μετά την εκκόλαψη (dph). Cg1-a, Cg1-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg1 στις 136 και 314 dph αντίστοιχα. Cg2-a, Cg2-b: δείγματα που πάρθηκαν από το κλουβί Cg2 στις 165 και 393 dph αντίστοιχα. Τα ψάρια των κλωβών Cg1 και Cg2 προέρχονται από τον πληθυσμό του εμπορικού σταθμού (Ht). H_2-H_8: Αρμονικές 2-8.

	122 dph	**136-165 dph**		**14-393 dph**	
	Ht-c	**Cg1-a**	**Cg2-a**	**Cg1-b**	**Cg2-b**
H_2	0,017220	0,017566	0,016444	0,012739	0,016955
H_3	0,006386	0,005102	0,005452	0,006008	0,006646
H_4	0,006923	0,007711	0,005683	0,007294	0,008996
H_5	0,004655	0,003800	0,006371	0,003588	0,005688
H_6	0,003842	0,004914	0,004538	0,003516	0,005007
H_7	0,003214	0,002690	0,003194	0,002132	0,002138
H_8	0,001768	0,002634	0,002731	0,001905	0,002492

Παράρτημα 6



Εικόνα $Π_{6.1}$. Τρύπες σε λέπια ενήλικων ατόμων τσιπούρας φυσικής προέλευσης, Οι φωτογραφίες τραβήχτηκαν με οπτικό μικροσκόπιο έπειτα από τη χρώση των λεπιών με ερυθρό της Αλιζαρίνης, A: διερχόμενος φωτισμός (x25), B: διερχόμενος φθορίζων φωτισμός (x25), C: διερχόμενος πολωμένος φωτισμός (x25), D: διερχόμενος φωτισμός (x25), E: διερχόμενος φωτισμός (x100), F: διερχόμενος φθορίζων φωτισμός (x100), G: διερχόμενος φωτισμός (x250), H: διερχόμενος φθορίζων φωτισμός (x250), I: διερχόμενος πολωμένος φωτισμός (x250), J: διερχόμενος φωτισμός (x100), K: διερχόμενος φθορίζων φωτισμός (x100), L: διερχόμενος πολωμένος φωτισμός (x100).

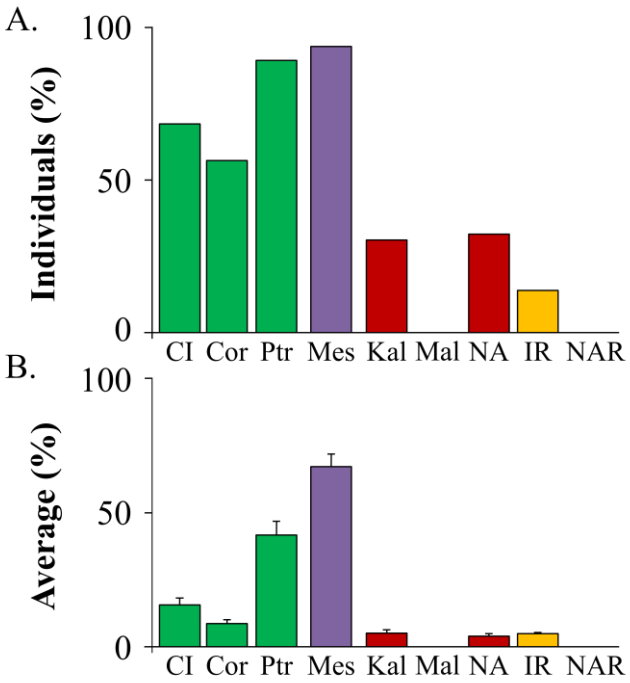
Τρύπες, διάσπαρτα κατανεμημένες, εντοπίστηκαν κυρίως στη περιφέρεια των λεπιών σε άτομα τσιπούρας των διαφορετικών γεωγραφικά περιοχών. Συγκεκριμένα, ψάρια με τρύπες στα λέπια τους, εντοπίστηκαν σε όλα τα δείγματα φυσικής προέλευσης εκτός του Μαλιακού. Το

ποσοστό των ατόμων από κάθε περιοχή που εμφάνισε τρύπες στα λέπια του, κυμάνθηκε από 30,8% στο δείγμα της Καλύμνου έως 94,0% στο δείγμα της λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου (Εικόνα $Π_{6.1}$). Το μέσο ποσοστό των λεπιών με τρύπες ανά περιοχή κυμάνθηκε από 3,8% στο δείγμα του Β. Αιγαίου (5%) έως 67,1% στο δείγμα του Μεσολογγίου (Εικόνα $Π_{6.2}$). Στο δείγμα εκτροφής του Ιονίου, το 4,3% των ατόμων εμφάνισε τρύπες στα λέπια, με το μέσο ποσοστό των λεπιών με τρύπες να ισούται με 5% (Εικόνα $Π_{6.1}$, Εικόνα $Π_{6.2}$). Τέλος το δείγμα των εκτρεφόμενων ψαριών του Β. Αιγαίου δεν εμφάνισε τρύπες στα λέπια του.

Η φθορά των λεπιών με αποτέλεσμα τη δημιουργία τρυπών, έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη ψαριών όπως ο σολομός του Ειρηνικού (*Oncorhynchus keta*). Η συχνότητα εμφάνισης τρυπών στα λέπια του σολομού, διέφερε μεταξύ εκτρεφόμενων (Ιαπωνία: Biggler 1988a) καθώς και μεταξύ άγριων (Β. Ειρηνικός: Biggler 1988b, 1988c) γειτονικών πληθυσμών. Προτάθηκε, ότι αυτοί οι μοναδικοί, εύκολα αναγνωρίσιμοι χαρακτήρες, μπορούν να αποτελέσουν ένα πολύτιμο εργαλείο για την ταυτοποίηση των αποθεμάτων του σολομού (Biggler 1988a, 1988b, 1988c). Εντούτοις, δεν βρέθηκε συσχέτιση της εμφάνισης της συγκεκριμένες φθοράς στα λέπια, με παράγοντες όπως η ηλικία, το μέγεθος και η αύξηση των ατόμων (Biggler 1988a). Παρόμοια έλλειψη συσχέτισης στην συχνότητα εμφάνισης της συγκεκριμένης φθοράς στα λέπια, προέκυψε και στη παρούσα εργασία, όσον αφορά το μέγεθος (SL, r^2= 0,0118), τον συντελεστή ευρωστίας (W_{obs}/W_{exp}, r^2= 0,0249) και τον βαθμό αναγέννησης των λεπιών (SRD, r^2= 0,0678) στο σύνολο των ατόμων των διαφορετικών γεωγραφικά δειγμάτων.

Παρόμοιες φθορές στα λέπια έχουν αποδοθεί στο παρελθόν στο φαινόμενο της απορρόφησης που προκαλείται από το ίδιο το ψάρι (scale resorption). Η απορρόφηση είναι η απώλεια υλικού από την περιφέρεια των λεπιών και αποτελεί απόκριση στις αυξημένες μεταβολικές ανάγκες που σχετίζονται με νηστεία ή την υψηλότερη ενεργειακή απόδοση (Bali 1959). Παλαιές έρευνες σε πειραματικούς πληθυσμούς ειδών, όπως είναι ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) (Ichkawa 1953) και το χρυσόψαρο *(Carassius aurstus)* (Ikeda *et al.* 1974), έχουν δείξει ότι παρόμοιες βλάβες στα λέπια μπορούν να προκληθούν ως αποτέλεσμα της απορρόφησης, ύστερα από πειραματικά επαγόμενες περιόδους ασιτείας. Η απορρόφηση του υλικού των λεπιών στα σολομοειδή, εμφανίζεται φυσιολογικά κατά τη διάρκεια του χειμώνα ή κατά την έναρξη της μετανάστευσης τους για λόγους αναπαραγωγής (Chilton and Bilton 1986, Persson *et al.* 2000). Σύμφωνα με τον Bali (1959), τα ποσοστά απορρόφησης μπορεί να ποικίλλουν μεταξύ των μεμονωμένων ψαριών, λόγω των μεταξύ τους διαφορών στη μεταναστευτική ικανότητα και στις ενεργειακές απαιτήσεις. Τα λέπια, μπορούν να περιέχουν έως το 20% του ασβεστίου του σώματος των ψαριών (Fleming 1974). Επομένως, η απορρόφηση των λεπιών κατά τη σεξουαλική ωρίμανση, σχετίζεται άμεσα με τις αυξημένες

ανάγκες των ψαριών για ασβέστιο, το οποίο αποτελεί σημαντικό ιχνοστοιχείο για την φυσιολογική ανάπτυξη του εμβρύου (Persson *et al.* 1998).



Εικόνα Π6.2. (A): ποσοστό (%) των ατόμων που εμφάνισαν τρύπες στα λέπια ανά περιοχή δειγματοληψίας, (B): ποσοστό (%) λεπιών (Mean, +SD) με τρύπες ανά περιοχή δειγματοληψίας. CI, K. Ιόνιο, Cor, Κέρκυρα, Ptr, Πατραϊκός, Mes, Μεσολόγγι Klm, Κάλυμνος, Mal, Μαλιακός, NA, B. Αιγαίο, IR, Ιόνιο εκτροφής, AR, B. Αιγαίο εκτροφής. Πράσινο χρώμα: δείγματα του Ιονίου, μωβ χρώμα: δείγμα λιμνοθάλασσας του Μεσολογγίου, κόκκινο χρώμα: δείγματα Αιγαίου, κίτρινο χρώμα: δείγμα εκτροφής Ιονίου.

Παράρτημα 7

Check for updates

Received: 15 March 2021 | Revised: 26 March 2021 | Accepted: 28 March 2021

DOI: 10.1111/are.15264

ORIGINAL ARTICLE

Aquaculture Research WILEY

Scale regeneration in reared Gilthead seabream: Revisiting the use of scales in identifying aquaculture escapees

George Geladakis[1] | Stylianos Somarakis[2] | Giorgos Koumoundouros[1]

[1]Biology Department, University of Crete, Heraklion, Greece

[2]Institute of Marine Biological Resources and Inland Waters (IMBRIW), Hellenic Centre for Marine Research (HCMR), Heraklion, Greece

Correspondence
Giorgos Koumoundouros, Biology Department, University of Crete, 70013 Heraklion, Crete, Greece.
Email: gkoumound@uoc.gr

Abstract

The high frequency of regenerated scales (degree of scale regeneration, SRD) in reared fish has been used in the past for the identification of aquaculture escapees in the wild stocks. In the present study, we examined the evolution of the SRD in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) throughout the entire rearing process (hatchery and on-growing, 2.0–21.9 cm standard length, SL). For this purpose, nine fish samples were randomly taken from different populations and farm sites, at different time points (58–393 days post-hatching, dph). Results demonstrated that scales are lost continuously, from the onset of squamation (11.2 ± 5.7% mean SRD, 58 dph, 2.0 cm SL) to the end of the on-growing period (98.7 ± 3%–99.8 ± 0.9% mean SRD, 314–393 dph, 21.7–21.9 cm SL). At the transition between the hatchery period and the on-growing in sea cages, fish presented a wide distribution of SRD, ranging from 40% to 92% (122 dph, 5.1 cm SL). Despite the different sample origins, a uniform relationship between SRD and SL was observed, with a clear inflection point (2.7 cm SL) and two periods with different rates of scale loss. Our findings are discussed in relation to the use of regenerated scales for the identification of aquaculture escapees in wild stocks and the need to revisit the different suggested critical SRD thresholds.

KEYWORDS
hatchery, on-growing phase, rearing conditions, scale growth

1 | INTRODUCTION

Scales are thin hard plates that cover the fish body and provide mechanical protection against predators and parasites, freedom of motion and swimming efficiency, maintain internal homeostasis and serve for camouflage purposes (e.g. Berntssen et al., 2003; Browning et al., 2013; Denton, 1970; Esteban, 2012; Vernerey & Barthelat, 2014; Yang et al., 2013; Zhu et al., 2013). Scales appear during the late metamorphosis period and develop within an oblique pocket located in the superficial dermis. They are constantly growing outwards, by deposition of new material around an initially formed centre (focus) (Bereiterhahn & Zylberberg, 1993). The scale focus is surrounded by continuous concentric lines, called 'circuli'. They are periodical deposits that form as the scale grows bigger, following more or less the outline shape of the proximal rim. 'Radii' are centripetal grooves of reduced ossification, spreading from the focus towards the proximal rim (Bereiterhahn & Zylberberg, 1993; Brager & Moritz, 2016). Elasmoid scales are the most common scales in teleosts and are classified into two types, cycloid and ctenoid. The distinction between these two types is based on the presence of additional separate ossifications, called 'ctenii', marginally or submarginally to the distal rim (posterior field) of ctenoid scales (Brager & Moritz, 2016).

Scale structure reflects fish growth history and has been widely used in age determination and back-calculation of body size in wild stocks (e.g. Heidarsson et al., 2006; Pierce et al., 1996). Furthermore, it is frequently used to estimate differences in growth patterns reflected in morphological variability between fish of different spatial distribution or/and wild versus reared origin (e.g. Arechavala-Lopez, Sanchez-Jerez et al., 2012; Ibanez et al., 2017; Lund & Hansel, 1991;

 © 2021 John Wiley & Sons Ltd

TABLE 1 Characteristics of the samples taken during the hatchery and on-growing rearing phases

Rearing phase	Sample code	dph	SL (±*SD*, cm)	TW (±*SD*, g)	SRD (±*SD*, %)
Hatchery (indoor tanks)	Ht2-a	58	2.0 (0.2)	0.1 (0.0)	11.2 (5.7)
	Ht2-b	95	3.2 (0.3)	0.9 (0.2)	56.5 (12.7)
	Ht1-a	62	2.5 (0.2)	-	34.5 (12.8)
	Ht1-b	116	4.7 (0.4)	2.3 (0.6)	66.4 (12.5)
	Ht1-c	122	5.1 (0.3)	2.4 (2.6)	63.8 (11.8)
On-growing (sea cages)	Cg1-a	136	14.4 (0.9)	93.4 (18.9)	99.5 (1.5)
	Cg1-b	314	21.7 (1.0)	273.6 (38.1)	99.8 (0.9)
	Cg2-a	165	16.3 (1.3)	134.9 (31.6)	88.5 (9.3)
	Cg2-b	393	21.9 (1.8)	311 (78.3)	98.7 (3.0)

Note: Each sample consisted of 30 fish, except of Ht2-b (n = 18) and Cg2-b (n = 26).
Abbreviations: dph, days-post-hatching, SL, average standard length, SRD, average degree of scale regeneration; TW, average total weight.

Poulet et al., 2005; Šegvić-Bubić et al., 2020). Handling manipulations (e.g. counting, size-grading and vaccination) and high population densities in aquaculture facilities increase friction and physical collisions between fish, leading to significantly high rates of scale loss (Fiske et al., 2005; Izquierdo-Gomez et al., 2017; Lund & Hansel, 1991). Lost scales are rapidly replaced by new regenerated scales (Costa & Power, 2018; Vieira et al., 2011), which are characterized by the presence of a large focus (regeneration nucleus) lacking growth circulii (Bereiterhahn & Zylberberg, 1993; Blair, 1942).

Gilthead seabream (*Sparus aurata* L., 1758) is a euryhaline and eurythermal marine fish, distributed from the Black Sea and the Mediterranean to the eastern Atlantic. In addition to its importance in coastal fisheries, Gilthead seabream is the one of the two major species of the Mediterranean finfish aquaculture. Similar to other commercially farmed fish species, accidental escape events of reared seabreams, due to mainly technical or operational failures, are not rare (Arechavala-Lopez, Uglem et al., 2012; Glaropoulos et al., 2012). These escape events might be considered as a potential threat to the natural populations, due to genetic, physiological and morphological differences between reared and wild fish (Alarcon et al., 2004; Arechavala-Lopez et al., 2013; Carrillo et al., 2001; Fragkoulis et al., 2017; Geladakis et al., 2021; Karaiskou et al., 2009; Segvic-Bubic et al., 2014; Šegvić-Bubić et al., 2020; Zuzul et al., 2019). The ability to discriminate different origins (wild vs. farmed) in the wild represents a first step towards functional management of escapees. Scales have been used in the past as a low cost and easily applied morphological character to identify aquaculture escapees in the wild. Existing literature is based on the high degree of scale regeneration (SRD) in the reared fish (Arechavala-Lopez, Sanchez-Jerez, et al., 2012; Izquierdo-Gomez et al., 2017), as well as on the hypothesis that this high SRD characterizes the reared individuals throughout their entire life period. To our knowledge however, no study exists on the evolution of SRD during Gilthead seabream growth.

In the present study we examined whether SRD changes during the rearing process, from the stage of metamorphosis (scale formation onset) to the end of on-growing. For this purpose, we examined the evolution of SRD in Gilthead seabream during (a) the juvenile production phase in land-based hatcheries, and, (b) the on-growing in sea cages. For a better understudying of SRD variability in different rearing sites, fish from two different hatcheries, a commercial and an experimental, were examined. Similarly, during the on-growing phase, the juvenile population from the commercial hatchery was distributed into two different cage farms for the comparative monitoring of the evolution of the SRD.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Fish origin

In both hatcheries, egg incubation and larval rearing were performed according to the standard methodology for the species. In short, larvae were reared in the presence of background phytoplankton (*Chlorella* sp.), with initial feeding on enriched rotifers *Brachionus plicatilis*, *Artemia* nauplii and finally on inert commercial diets. Water temperature was 19–20°C, oxygen saturation was 90–95% and salinity 35–36 g L^{-1}. Fish stocking density ranged from initially 100 fish L^{-1}, to ca 5–10 (commercial hatchery) or 2–5 fish L^{-1} (experimental hatchery) at the end of the hatchery phase. The juvenile population from the commercial hatchery was later split and transferred to two different cage farms, located in the western (Ionian Sea, Cg1) and the eastern Greece (Aegean Sea, Cg2). Stocking density ranged from 0.3 to 20 Kg m^{-3} in Cg1 and 0.1–10 Kg m^{-3} in Cg2. During the on-growing period, water temperature (T) followed the natural seasonal fluctuations with an average of 20.6 ± 4.1°C and 19.3 ± 3.3°C for Cg1 and Cg2 farm respectively.

2.2 | Sampling and scale examination

Scale regeneration was examined in the period between the end of metamorphosis (i.e. almost complete squamation, Loizides et al., 2014) and the end of the on-growing phase. Three fish samples from

the commercial and two from the experimental hatchery were randomly taken at different time points between 58 and 122 days post-hatching (dph). During the following on-growing period, two random fish samples were taken from each cage farm, at the middle and the end of the rearing phase (Table 1).

In the laboratory, fish were measured for standard length (SL, tip of snout to base of the central caudal lepidotrichium) and weighted. A sample of 20 scales was randomly removed from the left side of each fish, at the area between the anterior dorsal fin and the lateral line. Removed scales were photographed (Lumenera's INFINITY1-5C) under a stereoscopic microscope (Olympus SZ61) and examined for the presence of a regenerated nucleus, indicative of scale regeneration (e.g. Quilhac & Sire, 1998). Indicative scale samples were selected and stained with Alizarin Red S (0.5% in d.w.) for better illustrating their morphology (Figure 1).

The relationship between the SRD and fish size (SL) presented an obvious inflexion point (see section 3). Therefore, a piecewise linear regression, fitted with a non-linear estimation procedure (Nikolioudakis et al., 2010), was used to describe this relationship:

$$\mathrm{Ln}\,(\mathrm{SRD}) = b_0 + b_1 * \mathrm{SL} + b_2 * (\mathrm{SL} - \mathrm{SL}_i) * (\mathrm{SL} \geq \mathrm{SL}_i),$$

where SRD and SL are the average SRD and average standard length of each fish sample, b_0 is the y-intercept, b_1 and b_2 are the slopes before and after the inflection point, and SL_i is the SL at the inflection point.

2.3 | Ethics statement

This manuscript does not need an ethical approval. Rearing of Gilthead seabream was performed under routine production conditions at a company registered for aquaculture production in Greece, holding a GLOBALG.A.P quality certification, which requires a certified Veterinary Doctor to periodically verify fish health and welfare. Following routine procedures, 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).

3 | RESULTS

During fish growth, new circuli were formed, with the simultaneous increase in radii size and number (Figure 1). At the end of metamorphosis, scales were characterized by the presence of relatively long ctenii (Figure 1a, a′), which however disappeared in the following period (Figure 1b-d). Regenerated scales presented a similar gross morphology and growth pattern, with however the additional presence of a clear regeneration nucleus lacking growth circuli (Figure 1a′–d′).

During the hatchery phase, from the metamorphosis stage to the end of the juvenile production period, the SRD levels increased with fish age (Figure 2). Observed mean SRD values ranged from 11.2 ± 5.7% (58 dph) to 56.5 ± 12.7% (95 dph) in the experimental and from 34.5 ± 12.8% (62 dph) to 63.8 ± 11.8% (122 dph) in the commercial hatchery (Table 1). During the following on-growing phase, SRD levels increased continuously with fish age (Figure 2), finally reaching to mean values of 99.8 ± 0.9% in Cg1 and 98.7 ± 3% in Cg2 (Table 1). Despite the common fish origin for both cage farms, at both sampling ages, Cg2 presented wider SRD ranges than Cg1 (Figure 2d-g).

Interestingly, in spite of differences in sample origin (Ht1, Ht2, Cg1, Cg2), the SRD-SL relationship presented a uniform pattern for all rearing sites and phases. The piecewise regression model fitted

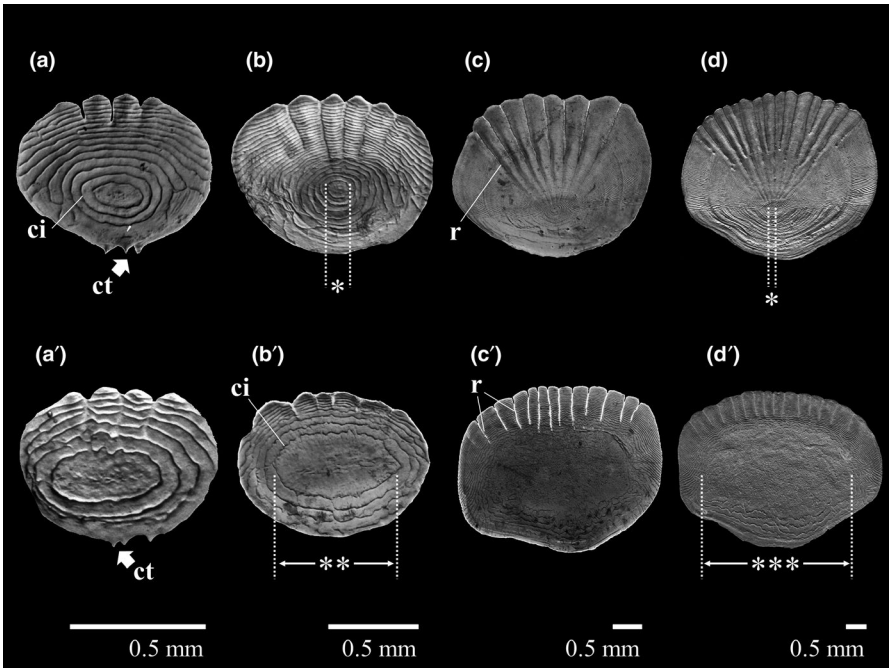


FIGURE. 1 Normal (a-d) and regenerated (a′-d′) scales at four different fish lengths (SL, standard length). a, a′: 2.6 cm SL, b, b′: 5.2 cm SL, c, c′: 12.4 cm SL, d, d′: 21.5 cm SL. Morphological characteristics are shown with letters, arrows and slim lines: ci, circulli r, radii, ct, ctenii. Dashed lines and two-way arrows illustrate the length of the focus of two normal and two regenerated scales, *, 0.1 mm, **, 0.7 mm, ***, 1.9 mm. Scale bars correspond to 0.5 mm. Photographs were taken under transmitted light, following the Alizarin staining.

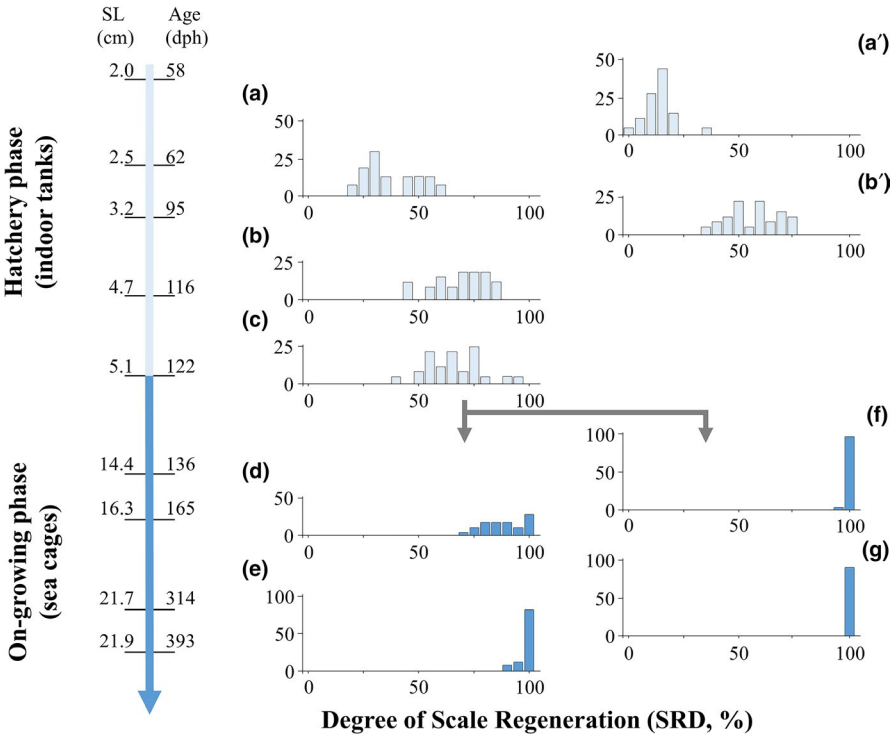


FIGURE. 2 Frequency distribution of the degree of scale regeneration (SDR) for the fish samples taken during the hatchery and on-growing rearing phases. a, b, c, samples taken from the commercial hatchery at 62 (Ht1-a), 116 (Ht1-b) and 122 (Ht1-c) days-post-hatching (dph) respectively. a′, b′, samples taken from the experimental hatchery at 58 (Ht2-a) and 95 (Ht2-b) dph. d, e, samples taken from the Cg 1 at 136 (Cg1-a) and 314 (Cg1-b) dph, f, g, samples taken from the Cg2 at 165 (Cg2-a) and 393 (Cg2-b) dph. Cg1 and Cg2 fish originated from the Ht1 population.

the mean SRD–SL data well (Figure 3) for the entire studied period [Ln(SRD) = −2.6 + 2.5 × SL + (−2.4) × (SL − 2.7) × (SL ≥ 2.7), r^2=0.99, p <0.001]. Analysis revealed a clear inflection point (SL_i) at 2.7 cm SL (95% C.I.: 2.6–2.9 cm), at which the rate of SRD increase changed significantly.

4 | DISCUSSION

In the present study, we examined the SRD evolution in Gilthead seabream during the hatchery and on-growing rearing phases. In seabream, squamation starts in the middle of metamorphosis (1.4–1.7 cm SL) and completes at the onset of the juvenile stage (Loizides et al., 2014). Upon their formation, scales may be lost from fish skin due to handling manipulations and physical contacts between individuals (Izquierdo-Gomezet al., 2017; Lund & Hansel, 1991). Scale loss causes skin superficial injury and activates a complex immune response for rapid wound healing (Vieira et al., 2011). The fast skin re-epithelialization is associated with epidermal closure, re-establishment of the basement membrane and determination of scale patterning. In Gilthead seabream, after 4 days of scale removal, epidermis and dermis are re-established and the new regenerated scales start to mineralize (Costa & Power, 2018).

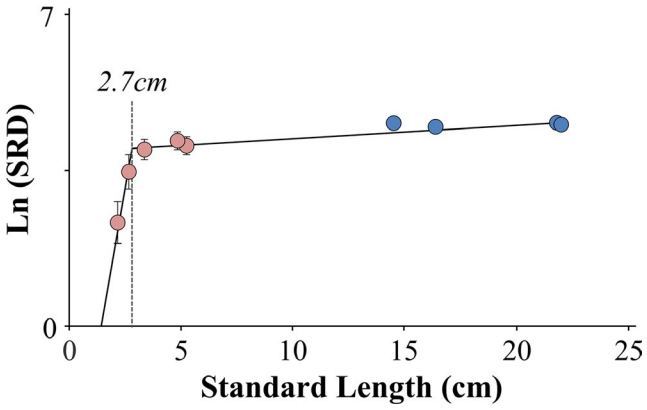


FIGURE. 3 Plot of the fitted piecewise regression. SRD, degree of scale regeneration. Error bars equal to 1 *SD*. Red markers: hatchery phase. Blue markers: on-growing phase.

Several different methodologies have been applied for the identification of aquaculture escapees in wild-caught Gilthead seabream samples, mainly involving morphological and genetic traits (e.g. Arechavala-Lopez, Sanchez-Jerez, et al., 2012; Segvic-Bubic et al., 2014; Šegvić-Bubić et al., 2020; Zuzul et al., 2019). Among them, scale regeneration has been suggested as a cost-effective and rapid morphological index. Existing literature suggests that SRD of reared fish at harvesting is >93%, and such high threshold has been used for discerning aquaculture escapees from wild fish (Izquierdo-Gomez et al., 2017). Despite the remarkable similarity of the reported SRD levels for reared seabream at harvest size between different studies (>93%, Izquierdo-Gomez et al., 2017; >94%, Geladakis et al., 2021; >89%, present study), our finding that SRD increases continuously during the on-growing phase controvert the use of such a high threshold. The low SRD values at the beginning of cage farming (40%–92%) reported here clearly suggest that early escape events may release in the wild, fish with SRD values lower than the previously used threshold of 93%.

The classification of wild-caught fish with SRD <93% as purely non-escapees is also controverted by the low SRDs (≤ 43%) of

seabream samples collected in Spain from areas where the presence of escapees is unlikely (Izquierdo-Gomez et al., 2017). Wild-caught samples with SRD values higher than 43% are not necessarily composed exclusively by fish escaped from aquaculture facilities. Geladakis et al. (2021) used a conservative threshold of 30% SRD to exclude escapees from the comparison of otolith morphology and fluctuating asymmetry between wild and reared Gilthead seabream. They showed that wild-caught fish with SRDs higher than this threshold presented intermediate phenotypes, between the wild fish of low SRD (0%–30%) and the reared fish. At this intermediate SRD range, wild-caught samples might contain both aquaculture escapees and wild fish.

To conclude, the present study showed that scales are lost continuously during the rearing process. The increase in SRD was shown to follow a two-phase relationship with fish length, with a significant decrease in the rate of scale loss after 2.7 cm SL. The observed inflection point coincides with the end of squamation ontogeny in Gilthead seabream (2.4–2.7 cm SL, Loizides et al., 2014). In the period after this inflection point, our results demonstrate that scales are lost with a homogenous rate, independently of the rearing conditions applied (e.g. hatchery or on-growing). The inclusion of more data in the described model by future studies would address whether this model can be considered as valid for all the reared seabream populations and thus be used for the back-calculation of escapees' size at the moment of their release in the wild.

ACKNOWLEDGEMENT

We would to thank the aquaculture company for the provision of samples and information on the rearing methodology.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

G.K. and S.S. designed research; G.G. performed the research; G.G., S.S. and G.K. analysed the data; G.G., S.S. and G.K. wrote the paper. All authors have approved the final version of the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding authors upon reasonable request.

ORCID

Giorgos Koumoundouros https://orcid.org/0000-0002-9738-0403

REFERENCES

Alarcon, J. A., Magoulas, A., Georgakopoulos, T., Zouros, E., & Alvarez, M. C. (2004). Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, *230*(1–4), 65–80. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00434-4

Arechavala-Lopez, P., Fernandez-Jover, D., Black, K. D., Ladoukakis, E., Bayle-Sempere, J. T., Sanchez-Jerez, P., & Dempster, T. (2013). Differentiating the wild or farmed origin of Mediterranean fish: A review of tools for sea bream and sea bass. *Reviews in Aquaculture*, *5*(3), 137–157. https://doi.org/10.1111/raq.12006

Arechavala-Lopez, P., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J. T., Sfakianakis, D. G., & Somarakis, S. (2012). Discriminating farmed gilthead sea bream *Sparus aurata* and European sea bass *Dicentrarchus labrax* from wild stocks through scales and otoliths. *Journal of Fish Biology*, *80*(6), 2159–2175. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2012.03236.x

Arechavala-Lopez, P., Uglem, I., Fernandez-Jover, D., Bayle-Sempere, J. T., & Sanchez-Jerez, P. (2012). Post-escape dispersion of farmed seabream (*Sparus aurata* L.) and recaptures by local. *Fisheries Research*, *121*, 126–135. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2012.02.003

Bereiterhahn, J., & Zylberberg, L. (1993). Regeneration of teleost fish scale. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *105*(4), 625–641. https://doi.org/10.1016/0300-9629(93)90262-3

Berntssen, M. H. G., Waagbo, R., Toften, H., & Lundebye, A. K. (2003). Effects of dietary cadmium on calcium homeostasis, Ca mobilization and bone deformities in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) parr. *Aquaculture Nutrition*, *9*(3), 175–183. https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.2003.00245.x

Blair, A. A. (1942). Regeneration of the scales of Atlantic salmon. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, *5c*(5), 440–447. https://doi.org/10.1139/f40-045

Brager, Z., & Moritz, T. (2016). A scale atlas for common Mediterranean teleost fishes. *Vertebrate Zoology*, *66*(3), 275–386.

Browning, A., Ortiz, C., & Boyce, M. C. (2013). Mechanics of composite elasmoid fish scale assemblies and their bioinspired analogues. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *19*, 75–86. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2012.11.003

Carrillo, J., Koumoundouros, G., Divanach, P., & Martinez, J. (2001). Morphological malformations of the lateral line in reared gilthead sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Aquaculture*, *192*(2–4), 281–290. https://doi.org/10.1016/S0044-8486(00)00454-3

Costa, R. A., & Power, D. M. (2018). Skin and scale regeneration after mechanical damage in a teleost. *Molecular Immunology*, *95*, 73–82. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2018.01.016

Denton, E. J. (1970). Review lecture: On the organization of reflecting surfaces in some marine animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, *258*(824), 285–313. https://doi.org/10.1098/rstb.1970.0037

Esteban, A. M. (2012). An overview of the immunological defenses in fish skin. *ISRN Immunology*, *2012*, 853470. https://doi.org/10.5402/2012/853470

Fiske, P., Lund, R. A., & Hansen, L. P. (2005). Identifying fish farm escapees. In S. X. Cardin, L. A. Kerr, & S. Mariani (Eds.), *Stock identification methods: Applications in fishery science* (pp. 659–680). Elsevier Academic Press.

Fragkoulis, S., Christou, M., Karo, R., Ritas, C., Tzokas, C., Batargias, C., & Koumoundouros, G. (2017). Scaling of body-shape quality in reared gilthead seabream *Sparus aurata* L. Consumer preference assessment, wild standard and variability in reared. *Aquaculture Research*, *48*(5), 2402–2410.

Geladakis, G., Somarakis, S., & Koumoundouros, G. (2021). Differences in otolith shape and fluctuating-asymmetry between reared and wild gilthead seabream (*Sparus aurata* Linnaeus, 1758). *Journal of Fish Biology*, *98*(1), 277–286. https://doi.org/10.1111/jfb.14578

Glaropoulos, A., Papadakis, V. M., Papadakis, I. E., & Kentouri, M. (2012). Escape-related behavior and coping ability of sea bream due to food supply. *Aquaculture International*, *20*(5), 965–979. https://doi.org/10.1007/s10499-012-9521-9

Heidarsson, T., Antonsson, T., & Snorrason, S. S. (2006). The relationship between body and scale growth proportions and validation of two back-calculation methods using individually tagged and recaptured wild Atlantic salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, *135*(5), 1156–1164. https://doi.org/10.1577/T05-286.1

Ibanez, A. L., Hernandez-Fraga, K., & Alvarez-Hernandez, S. (2017). Discrimination analysis of phenotypic stocks comparing fish otolith and scale shapes. *Fisheries Research*, *185*, 6–13. https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.09.025

Izquierdo-Gomez, D., Arechavala-Lopez, P., Bayle-Sempere, J. T., & Sanchez-Jerez, P. (2017). Assessing the influence of gilthead sea bream escapees in landings of Mediterranean fisheries through a scale-based methodology. *Fisheries Management and Ecology*, *24*(1), 62–72. https://doi.org/10.1111/fme.12202

Karaiskou, N., Triantafyllidis, A., Katsares, V., Abatzopoulos, T. J., & Triantaphyllidis, C. (2009). Microsatellite variability of wild and farmed populations of *Sparus aurata*. *Journal of Fish Biology*, *74*(8), 1816–1825. https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02186.x

Loizides, M., Georgakopoulou, E., Christou, M., Iliopoulou, M., Papadakis, I., Katharios, P., Divanach, P., & Koumoundouros, G. (2014). Thermally-induced phenotypic plasticity in gilthead seabream *Sparus aurata* L. (*Perciformes*, *Sparidae*). *Aquaculture*, *432*, 383–388. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.06.002

Lund, R. A., & Hansel, L. P. (1991). Identification of wild and reared Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using scale characters. *Aquaculture Research*, *22*(4), 499–508. https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.1991.tb00763.x

Nikolioudakis, N., Koumoundouros, G., Kiparissis, S., & Somarakis, S. (2010). Defining length-at-metamorphosis in fishes: a multi-character approach. *Marine Biology*, *157*(5), 991–1001. https://doi.org/10.1007/s00227-009-1379-7

Pierce, C. L., Rasmussen, J. B., & Leggett, W. C. (1996). Back-calculation of fish length from scales: Empirical comparison of proportional methods. *Transactions of the American Fisheries Society*, *125*(6), 889–898. https://doi.org/10.1577/1548-8659(1996)125<0889:Bcoflf>2.3.Co;2

Poulet, N., Reyjol, Y., Collier, H., & Lek, S. (2005). Does fish scale morphology allow the identification of populations at a local scale? A case study for rostrum dace *Leuciscus burdigalensis* in river Viaur (SW France). *Aquatic Sciences*, *67*(1), 122–127. https://doi.org/10.1007/s00027-004-0772-z

Quilhac, A., & Sire, J. Y. (1998). Restoration of the subepidermal tissues and scale regeneration after wounding a cichlid fish, *Hemicromis bimaculatus*. *Journal of Experimental Zoology*, *281*(4), 305–327. https://doi.org/10.1002/(Sici)1097-010x(19980701)281:4<305:Aid-Jez6>3.0.Co;2-S

Segvic-Bubic, T., Talijancic, I., Grubisic, L., Izquierdo-Gomez, D., & Katavic, I. (2014). Morphological and molecular differentiation of wild and farmed gilthead sea bream *Sparus aurata*: Implications for management. *Aquaculture Environment Interactions*, *6*(1), 43–54. https://doi.org/10.3354/aei00111

Šegvić-Bubić, T., Talijančić, I., Vulić, L., Šegvić, B., Žužul, I., Radonić, I., & Grubišić, L. (2020). Assignment of gilthead seabream *Sparus aurata* to its origin through scale shape and microchemistry composition: Management implications for aquaculture escapees. *Water*, *12*(11), 3186.

Vernerey, F. J., & Barthelat, F. (2014). Skin and scales of teleost fish: Simple structure but high performance and multiple functions. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, *68*, 66–76. https://doi.org/10.1016/j.jmps.2014.01.005

Vieira, F. A., Gregório, S. F., Ferraresso, S., Thorne, M. A. S., Costa, R., Milan, M., Bargelloni, L., Clark, M. S., Canario, A. V. M., & Power, D. M. (2011). Skin healing and scale regeneration in fed and unfed sea bream, Sparus Auratus. *BMC Genomics*, *12*(1), 12–490. https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-490

Yang, W., Chen, I. H., Gludovatz, B., Zimmermann, E. A., Ritchie, R. O., & Meyers, M. A. (2013). Natural flexible dermal armor. *Advanced Materials*, *25*(1), 31–48. https://doi.org/10.1002/adma.201202713

Zhu, D., Barthelat, F., & Vernerey, F. (2013). Intricate multiscale mechanical behaviors of natural fish-scale. In S. Li & X.-L. Gao (Eds.), *Handbook of Micromechanics and Nanomechanics* (pp. 975–998). New York: Jenny Stanford Publishing.

Zuzul, I., Segvic-Bubic, T., Talijancic, I., Dzoic, T., Pleic, I. L., Paklar, G. B., Ivatek-Šahdan, S., Katavić, I., & Grubisic, L. (2019). Spatial connectivity pattern of expanding gilthead seabream populations and its interactions with aquaculture sites: A combined population genetic and physical modelling approach. *Scientific Reports*, *9*, 14718. https://doi.org/10.1038/S41598-019-51256-Z

How to cite this article: Geladakis G, Somarakis S, Koumoundouros G. Scale regeneration in reared Gilthead seabream: Revisiting the use of scales in identifying aquaculture escapees. *Aquaculture Research*. 2021;00:1–6. https://doi.org/10.1111/are.15264