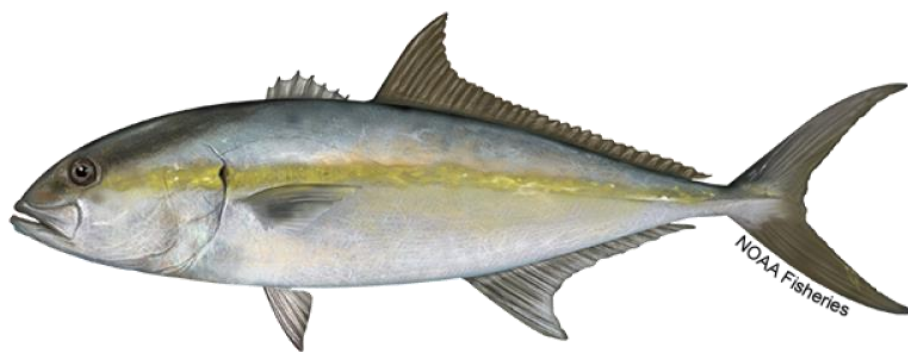




ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Επιγενετικοί παράγοντες στην οντογένεση της πεπτικής λειτουργίας στο μαγιάτικο (*Seriola dumerili*)»

“Epigenetic factors in the ontogenesis of digestive function in greater amberjack (*Seriola dumerili*)”



Πουπουνάκη Εμμανουέλα του Χρήστου

ΛΑΡΙΣΑ, 2025

Επιγενετικοί παράγοντες στην οντογένεση της πεπτικής λειτουργίας στο
μαγιάτικο (*Seriola dumerili*)

Epigenetic factors in the ontogenesis of digestive function in greater amberjack
(*Seriola dumerili*)

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

1. **Μούτου Αικατερίνη**, Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
2. **Σαραφίδου Θεολογία**, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
3. **Τσιπουρλιανός Ανδρέας**, Συμβασιούχος διδάσκοντας, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την κ. Αικατερίνη Μούτου που μου έδωσε την ευκαιρία να αποτελέσω μέλος του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την συνεργασία και τις γνώσεις που μου παρείχε.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαιτέρως τον Αγγελακόπουλο Ραφαήλ που στάθηκε δίπλα μου από την αρχή και ήταν πάντα πρόθυμος να με βοηθήσει και με ενθάρρυνε σε κάθε βήμα αυτής της ξεχωριστής πορείας. Ευχαριστώ όλα τα μέλη του Εργαστηρίου για την συνεργασία και τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Επιπλέον, θερμά ευχαριστώ στους γονείς μου αλλά και τους φίλους μου για τη διαρκή στήριξη και ενθάρρυνση σε όλη τη διάρκεια των σπουδών μου όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής μου, την κ. Θεολογία Σαραφίδου και τον κ. Τσιπουρλιανό Ανδρέα.

Περίληψη

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο είδος *Seriola dumerili*, ένα ενδιαφέρον υποψήφιο είδος για εκτροφή στην ιχθυοκαλλιέργεια στον Ελλαδικό χώρο λόγω της ταχείας αύξησής του, της γεύσης του και της υψηλής ποιότητάς του. Εξετάστηκαν οι επιγενετικοί παράγοντες της θερμοκρασίας και της διατροφής στα οντογενετικά πρότυπα γονιδίων που κωδικοποιούν για πεπτικά ένζυμα, με σκοπό την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών νυμφικής καλλιέργειας του μαγιάτικου. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα RNA, τα οποία συλλέχθηκαν από προνύμφες διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων που εκτράφηκαν σε τέσσερις πειραματικές ομάδες στο Εθνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ). Τα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR πραγματικού χρόνου έδειξαν πως τόσο η θερμοκρασία κατά το αυτότροφο στάδιο όσο και η διαφορετική ζωντανή τροφή παίζουν ρόλο στην συνολική ανάπτυξη των ιχθυονυμφών. Ο συνδυασμός της θερμοκρασίας στους 20°C με κωπήποδα παρουσίασε τον καλύτερο αναπτυξιακό ρυθμό ενώ η ομάδα που τράφηκε με τροχόζωα στην ίδια θερμοκρασία εμφάνισε τον πιο αργό ρυθμό ανάπτυξης. Η έκφραση του γονιδίου της αμυλάσης και της χυμοθρυψίνης που μελετήθηκε φάνηκε να επηρεάζεται από την θερμοκρασία, με την αύξηση της οποίας αυξάνει και η έκφραση των γονιδίων. Η διατροφή με τροχόζωα επηρέασε την έκφραση του γονιδίου της αμυλάσης αυξάνοντας την ενώ το γονίδιο της χυμοθρυψίνης δεν φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από τον τύπο της διατροφής. Τα παράλογα της πεψίνης, η αλανυλ-αμινοπεπτιδάση και το *AT1L* παράλογο της θρυψίνης που μελετήθηκαν δε φάνηκε να επηρεάζονται αξιοσημείωτα από την θερμοκρασία ή τον τύπο της διατροφής, με τα επίπεδα έκφρασης της δεύτερης να παραμένουν σταθερά χαμηλά καθ' όλη της διάρκεια της ανάπτυξης. Το δεύτερο παράλογο της θρυψίνης, *T3L*, φαίνεται να επηρεάζεται και από την αύξηση της θερμοκρασίας αλλά και από την διατροφή με την ομάδα των τροχόζωων να εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης του *T3L* γονιδίου. Τέλος, το γονίδιο της αλκαλικής φωσφατάσης φαίνεται να εκφράζεται σε χαμηλά επίπεδα με την θερμοκρασία να επηρεάζει την έκφρασή του αυξάνοντάς την στις δύο ομάδες των 24°C. Η διατροφή δεν φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την έκφρασή του.

Λέξεις-Κλειδιά: *Seriola dumerili*, πεπτικό σύστημα, έκφραση πεπτικών ενζύμων, οντογένεση

Abstract

The study focused on *Seriola dumerili*, a promising candidate species for fish farming in Greece due to its rapid growth and high flesh quality. The epigenetic effects of temperature and diet on the ontogenetic expression patterns of digestive genes were investigated to determine the optimal culture conditions for larval development. RNA samples were collected from larvae at different developmental stages, reared under four experimental conditions at the Hellenic Centre for Marine Research (HCMR). Both hatching temperature and diet significantly influenced overall larval development. The combination of a 20°C temperature and a copepod-based diet resulted in the highest growth rate, whereas the group fed rotifers at the same temperature exhibited the lowest growth rate. The expression of the digestive enzymes amylase and chymotrypsin increased with rising temperature. The rotifer-based diet induced amylase gene expression, while chymotrypsin expression appeared unaffected by diet type. The expression of pepsin paralog, alanyl-aminopeptidase, and the AT1L paralog of trypsin remained largely unaffected by either temperature or diet, with the AT1L paralog maintaining consistently low expression throughout development. In contrast, the second paralog of trypsin T3L was influenced by both temperature and diet, with higher expression observed in the rotifer-fed group. Finally, the alkaline phosphatase gene showed low expression levels overall but was upregulated in the two groups hatched at 24°C. Diet type did not significantly affect its expression.

Keywords: *Seriola dumerili*, digestive system, digestive genes expression, ontogeny

Περιεχόμενα

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Το μαγιάτικο, <i>Seriola dumerili</i>	8
1.2 Μορφολογία	9
1.3 Βιολογία- Ενδιαίτημα	10
1.4 Γονιδιωματικοί διπλασιασμοί	10
1.5 Ανάπτυξη	11
1.6 Διατροφή	13
1.6.1 Διατροφή στην φύση	13
1.6.2 Διατροφή στην ιχθυοκαλλιέργεια	14
1.7 Πεπτικό σύστημα	16
1.8 Πεπτικά ένζυμα	20
1.9 Κλιματική αλλαγή και Οικονομική σημασία	28
2. ΣΚΟΠΟΣ	29
3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	30
3.1 Πειραματικός σχεδιασμός	30
3.2 Εξαγωγή RNA και σύνθεση cDNA	31
3.3 RT-PCR	31
3.3.1 Πρωτόκολλο της RT-PCR	33
3.3.2 Ιδιοστατικά γονίδια (housekeeping genes)	34
3.3.2.1 Επιλογή ιδιοστατικών γονιδίων	35
3.3.3 Υπολογισμός αρχικής ποσότητας μεταγράφων στα δείγματα	36
3.4 Στατιστική Ανάλυση	37
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	38
4.1 Διάγραμμα συσχέτισης	38
4.2 Επίδραση διατροφής και θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του <i>S. dumerili</i>	39
4.3 Αμυλάση	39
4.5 Πεψίνη τύπου Α	42
4.6 Ανιονική θρυψίνη 1	44
4.7 Θρυψίνη τύπου 3	45
4.8 Χυμοθρυψίνη	47
4.9 Αλανυλ-αμινοπεπτιδάση 2	48
4.10 Αλκαλική φωσφατάση	50
4.11 Αναλογία γονιδιακής έκφρασης ανιονικής θρυψίνης 1/ θρυψίνης τύπου 3	51
4.12 Αναλογία γονιδιακής έκφρασης πεψίνης/ πεψίνης τύπου Α	53
4.13 Γονίδιο αλανυλ-αμινοπεπτιδάσης 1	54

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	55
6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	64
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	65

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το μαγιάτικο, *Seriola dumerili*

Το μαγιάτικο, με επιστημονική ονομασία *Seriola dumerili*, ανήκει στα πελαγικά και επιβενθικά είδη ψαριών, αφού κατοικεί τόσο σε υφάλους κοντά στην ακτή, όσο και στην ανοιχτή θάλασσα και είναι ένας οργανισμός με μεγάλο οικολογικό και οικονομικό ενδιαφέρον (Ahyong et al. 2025). Αποτελεί μέλος των πελαγικών ιχθύων και η συστηματική ταξινόμησή του φαίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Φυλογενετική ταξινόμηση μαγιάτικου

Βασίλειο	Φύλο	Κλάση	Υποκλάση	Τάξη	Οικογένεια	Γένος	Είδος
Animalia	Chordota	Actinopterygii	Teleostei	Carangiformes	Carangidae	<i>Seriola</i>	<i>dumerili</i>

Το γένος *Seriola* ανήκει στην οικογένεια των Carangidae και περιλαμβάνει 9 σαρκοφάγα είδη γνωστά ως “amberjacks” (Ahyong et al. 2025). Οι ιχθύες αυτοί διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα θαλάσσια οικοσυστήματα λόγω της θέσης τους στην τροφική αλυσίδα, ενώ έχουν επίσης, οικονομική σημασία λόγω της αλιείας και της εκτροφής, ιδιαίτερα σε χώρες της Μεσογείου (Mazzola, Favaloro, and Sarà 2000). Το πιο γνωστό είδος που απαντάται στον ελλαδικό χώρο είναι το *Seriola dumerili* (Ahyong et al. 2025). Είναι το μεγαλύτερο σε μέγεθος είδος με καταγραφές στην φύση να φτάνουν τα 190cm και 80kg και την μέγιστη αναφερόμενη ηλικία να είναι τα 15 έτη (Bauchot et al. 1987). Το βάθος στο οποίο εντοπίζεται μπορεί να ξεπερνά τα 350m (Ahyong et al. 2025). Η περίοδος αναπαραγωγής ξεκινά από το Μάιο και ολοκληρώνεται με το πέρας του Σεπτεμβρίου, με πιο έντονη δραστηριότητα να εμφανίζεται κατά τον Ιούλιο, λόγω της μεγάλης διάρκειας της μέρας, η οποία είναι καθοριστική για την αναπαραγωγή των μαγιάτικων (Bauchot et al. 1987).

Το μαγιάτικο θεωρείται ευρύαλο είδος, αφού έχει παρατηρηθεί πως έχει την ικανότητα να προσαρμόζεται σε ένα ευρύ φάσμα αλατότητας σε τιμές που κυμαίνονται μεταξύ 15 και 36 psu, με την βέλτιστη ανάπτυξη να επιτυγχάνεται σε χαμηλές τιμές (Barany et al. 2021). Αυτή η ιδιότητα του, το καθιστά κατάλληλο για ανάπτυξη τόσο σε φυσικά ενδιαίτηματα με μεταβαλλόμενες συνθήκες όσο και σε υδατοκαλλιέργειες. Η ικανότητά του να διασχίζει υδάτινα περιβάλλοντα με διαφορετική αλατότητα εξηγεί την παγκόσμια εξάπλωσή του από τον Ατλαντικό έως τον Ινδο-Ειρηνικό ωκεανό. Στη Μεσόγειο, το μαγιάτικο συναντάται σε

ανοιχτές θάλασσες αλλά και σε ημι-κλειστές λιμνοθάλασσες, όπως ο Μεσσηνιακός Κόλπος (Paxton et al. 1989).

Η επιλογή του *Seriola dumerili* ως αντικείμενο έρευνας βασίζεται σε διάφορα χαρακτηριστικά του, που εμφανίζουν πλεονεκτήματα έναντι άλλων ειδών του γένους *Seriola*. Συγκεκριμένα, το *S. dumerili* έχει ευρύτερη γεωγραφική κατανομή σε σύγκριση με συγγενικά είδη όπως το *S. rivoliana* (περιορισμένο σε τροπικούς ωκεανούς) ή το *S. hippos* (ενδημικό στην Αυστραλία) και διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο ως ανώτερος θηρευτής (Paxton et al. 1989). Συγκριτικά με άλλες συγγενικές ταξινομικές ομάδες, εμφανίζει ταχεία ανάπτυξη και μεγάλο μέγεθος, αφού μπορεί να φτάσει τα 6kg σε μόλις 2,5 χρόνια σε συνθήκες εκτροφής, γεγονός που το καθιστά ιδανικό υποψήφιο προς εκτροφή (Milián-Sorribes et al. 2024).

1.2 Μορφολογία

Όσον αφορά τα ανατομικά χαρακτηριστικά του, το μαγιάτικο διαθέτει σώμα με σχήμα τορπιλοειδές (torpedo-shaped), προσαρμοσμένο για γρήγορη κίνηση, ο κορμός του είναι πλατύς και πλευρικά πεπλατισμένος, με εμφανή καμπυλότητα στο κεφάλι (Paxton et al. 1989). Διαθέτει δύο ραχιαία πτερύγια με το δεύτερο να είναι μεγαλύτερο και πιο μαλακό. Το ουραίο του πτερύγιο είναι εγκολπωμένο, επιτρέποντάς του να πραγματοποιεί απότομους ελιγμούς. Το στόμα του είναι μεγάλο, με την άνω γνάθο να εκτείνεται πέρα από το πίσω μέρος των ματιών καθιστώντας το αποτελεσματικό θηρευτή. Τα αρσενικά άτομα εμφανίζονται στην φύση συνήθως με μήκος περίπου στα 100cm (Paxton et al. 1989). Η μετάβαση του μαγιάτικου από ιχθύδιο σε νεαρό άτομο προκαλεί σημαντική αλλαγή στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του, επιμηκύνοντας και συμπιέζοντας το σώμα του. Στην φύση το εύρος του είναι από 0,5 έως 46,5kg, με το μέγιστο βάρος, που έχει καταγραφεί να φτάνει τα 80,6kg (Smith-Vaniz, 1984).

Τα νεαρά άτομα έχουν πράσινο – κίτρινη απόχρωση, ενώ τα ενήλικα άτομα έχουν μπλε – γκρι ή λαδί απόχρωση στην ραχιαία περιοχή τους, με τις πλευρές και την κοιλιακή χώρα να είναι αργυρόλευκες. Η πλευρική γραμμή μπορεί να εμφανίζεται με μια αχνή κίτρινη ή καφέ – ροζ απόχρωση, καθώς και τα πτερύγια με σκούρες αποχρώσεις. Οι μεμβράνες των πτερυγίων, τέλος, εμφανίζουν επίσης σκούρους χρωματισμούς. Συνολικά, η μορφολογία του μαγιάτικου αντικατοπτρίζει τον ρόλο του ως ανώτερο θηρευτή στα θαλάσσια οικοσυστήματα, το ατρακτοειδές σώμα, τα ισχυρά πτερύγια και το χαρακτηριστικό

χρωματικό μοτίβο του συμβάλλουν στην εύκολη αναγνώρισή του από τα θηράματά του (Smith-Vaniz, 1984).

1.3 Βιολογία- Ενδιαίτημα

Το μαγιάτικο απαντάται παγκοσμίως, σε τροπικές και εύκρατες θάλασσες, με κύριες περιοχές όπως προαναφέρθηκε την Μεσόγειο, τον Ατλαντικό και τον Ειρηνικό ωκεανό. Ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο και την ηλικία των ατόμων συναντώνται σε διαφορετικά ενδιαίτηματα. Πιο συγκεκριμένα, τα νεαρά άτομα εμφανίζονται συχνότερα σε παράκτιες περιοχές, ενώ τα ενήλικα άτομα προτιμούν τις ανοιχτές θάλασσες. Το εύρος της θερμοκρασίας ανάπτυξης τους είναι μεταξύ 16 και 29°C, ενώ η βέλτιστη ανάπτυξη επιτυγχάνεται μεταξύ 18 και 24°C.

Τα νεαρά άτομα σχηματίζουν μικρές ομάδες, με τα μικρά ιχθύδια να παρουσιάζουν μία τάση για συγκέντρωση γύρω από επιπλέοντα αντικείμενα ενώ τα ενήλικα είναι μοναχικά ή συναντώνται σε ομάδες των δύο με τριών ατόμων (Paxton et al. 1989).

1.4 Γονιδιωματικοί διπλασιασμοί

Το *Seriola dumerili* ανήκει στους τελεόστεους. Η ταξινομική αυτή ομάδα χαρακτηρίζεται από τρεις γύρους διπλασιασμού του γονιδιώματος (Kasahara 2007). Ο πρώτος γύρος διπλασιασμού έλαβε χώρα σε έναν κοινό πρόγονο των άγναθων και γναθόστομων, ο δεύτερος σε κοινό πρόγονο σπονδυλωτών και γναθόστομων και ο τελευταίος (Teleost-specific Genome Duplication, TSGD) σε κοινό πρόγονο όλων των τελεόστεων. Η πιο πρόσφατη υπόθεση υποστηρίζει ότι ο δεύτερος διπλασιασμός πραγματοποιήθηκε μετά την εμφάνιση των ουροχορδωτών και πριν την εξάπλωση των γναθόστομων (Yu et al. 2024). Μέσω των γονιδιωματικών διπλασιασμών προκύπτουν δύο πανομοιότυπα αντίγραφα όλων των γονιδίων τα οποία καλούνται παράλογα γονίδια και χαρακτηριστικό τους είναι η αρχική όμοια λειτουργία τους. Οι δύο πρώτοι γύροι διπλασιασμού βασίζονται στην υπόθεση του 2R (2 Round hypothesis), με βάση τον κανόνα "1-2-4". Σύμφωνα με την βιβλιογραφία, ο τρίτος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος των τελεόστεων πραγματοποιήθηκε 350 εκατομμύρια χρόνια πριν περίπου οδηγώντας στην ύπαρξη οκτώ αντιγράφων κάθε γονιδίου (Glasauer et al. 2014). Ο διπλασιασμός του γονιδιώματος ασκεί στα μέλη των ομάδων αυτών πίεση για την πορεία των παράλογων γονιδίων καθώς αποτελεί το έναυσμα για την αύξηση της πολυπλοκότητας και της εξελικτικής προσαρμογής τους. Η συνηθέστερη περίπτωση είναι το ένα από τα δύο διπλασιασμένα γονίδια να χάσει την λειτουργία του λόγω των πολλών

βλαβερών μεταλλάξεων που θα συσσωρευτούν σε αυτό, αφού η πιθανότητα να συμβούν είναι μεγαλύτερη απ' ό,τι για τις ωφέλιμες μεταλλάξεις (Zhang et al. 2013). Δεύτερη περίπτωση είναι το διπλασιασμένο γονίδιο να χάσει μερικώς την λειτουργία του, μέσω ενός μηχανισμού που καλείται Duplication, Degeneration, Complementation (DDC). Ο μηχανισμός αυτός εξηγεί πως οι λειτουργίες ενός γονιδίου μπορούν να υποδιαιρεθούν μεταξύ των θυγατρικών γονιδίων, τα οποία συνεχίζουν συνεργατικά να εκτελούν τις λειτουργίες του προγονικού γονιδίου. Τρίτη περίπτωση για την πορεία του διπλασιασμένου γονιδίου αποτελεί η εμφάνιση μίας νέας λειτουργίας, η οποία απαιτεί ραγδαίες αλλαγές στην νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου. Για να συμβεί αυτό πρέπει το ένα από τα δύο αντίγραφα να διατηρήσει την αρχική λειτουργία του γονιδίου, δίνοντας στο δεύτερο την δυνατότητα να αναπτύξει μια νέα λειτουργία. Τελευταία επιλογή για την μοίρα των παράλογων αποτελεί το να μείνουν αμετάβλητα με βάση την υπόθεση της γονιδιακής ισορροπίας. Σύμφωνα με αυτήν, και τα δύο γονίδια διατηρούν την αρχική λειτουργία τους και εκφράζονται σε τέτοιο βαθμό ώστε να συμβάλουν και τα δύο στην γονιδιακή λειτουργία. Αυτό μπορεί να συμβεί με την διαμερισματοποίηση της λειτουργίας των δύο παράλογων γονιδίων είτε ιστοειδικά είτε αναπτυξιακοειδικά, εννοώντας πως τα δύο παράλογα μπορούν να εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς ή σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια.

1.5 Ανάπτυξη

Με την εξωτερική γονιμοποίηση δημιουργείται το ζυγωτό και ξεκινά η εμβρυϊκή φάση ανάπτυξης, η οποία διαρκεί μέχρι την εκκόλαψη του αυγού. Το αυγό έχει σφαιρικό σχήμα, αποτελείται από την καλυπτήρια στοιβάδα, μία σκληρή εξωτερική στοιβάδα (χόριο), συγκρατώντας στο εσωτερικό της τα κύτταρα βάθους που θα δώσουν το έμβρυο και εναποτίθενται στο νερό. Διακρίνεται η συγκυτιακή λεκιθική στοιβάδα, η οποία καθοδηγεί τις κυτταρικές κινήσεις κατά την γαστριδίωση και τον σχηματισμό του οργανωτή και η λέκιθος.

Κατά την εκκόλαψη, η καλυπτήρια στοιβάδα του αυγού χάνει την σκληρότητά της με την βοήθεια χημικών ουσιών που εκκρίνονται από εκτοδερμικούς αδένες, που εντοπίζονται στο προστινόν τμήμα του εμβρύου και έτσι γίνεται πιο εύκολη η έξοδος του εμβρύου. Έχει παρατηρηθεί πως κατά την έξοδο του εμβρύου η ουρά βγαίνει πάντα στο τέλος διευκολύνοντας την ολοκλήρωση της εκκόλαψης (Aral et al. 2011).

Τα στάδια της εμβρυϊκής ανάπτυξης συνοψίζονται ως εξής: γονιμοποιημένο αυγό, εμβρυογένεση, όπου περιλαμβάνει τα στάδια της αυλάκωσης, γαστριδίωσης, νευριδίωσης και οργανογένεσης. Ακολουθείται από το προνυμφικό στάδιο, το οποίο προηγείται της μεταμόρφωσης, της ωρίμανσης και της γαμετογένεσης, κατά σειρά (Kimmel et al. 1995).

Με τον όρο αυλάκωση περιγράφονται οι πρώτες γρήγορες μιτωτικές διαιρέσεις που πραγματοποιούνται μετά την γονιμοποίηση και δίνουν τα βλαστομερίδια. Η γαστριδίωση αναφέρεται στην δημιουργία των τριών βλαστικών στοιβάδων (εξω-, μεσο-, ενδο-δερμα), όπου παρατηρούνται έντονες κυτταρικές μετακινήσεις, στο στάδιο αυτό καθορίζεται ο μετέπειτα ρόλος κάθε κυττάρου. Το πεπτικό σύστημα, όπως και το αναπνευστικό, θα αναπτυχθεί από κύτταρα του ενδοδέρματος (Kimmel et al. 1995). Το *S.dumerili* ανήκει στα δευτεροστόμια είδη, δηλαδή κατά την ανάπτυξη του πεπτικού σωλήνα δημιουργείται πρώτα η έδρα από τον βλαστοπόρο και μετά το στόμα. Κατά την νευριδίωση παρατηρούνται έντονες μορφογεννητικές διαφορές και ξεκινά να αναπτύσσεται το νευρικό σύστημα. Με το πέρας του σταδίου αυτού, έχει δημιουργηθεί ο φάρυγγας από ενδοδερμικά κύτταρα και ο εγκέφαλος. Η οργανογένεση είναι η διαδικασία κατά την οποία αναπτύσσονται όλα τα εσωτερικά όργανα και με το τέλος της ο οργανισμός θα διαθέτει όλα τα συστήματα του, χωρίς όμως αυτά να είναι απαραίτητα ώριμα (Kimmel et al. 1995).

Μετά την εκκόλαψη, το πρώτο στάδιο ανάπτυξης χαρακτηρίζεται ως αυτότροφο καθώς τα ψάρια δεν έχουν απορροφήσει πλήρως τον λεκιθικό σάκο και τρέφονται μέσω αυτού. Στη συνέχεια, με το πέρας κάποιων ημερών και την κατανάλωση της λεκίθου οι προνύμφες ανοίγουν το στόμα τους και αρχίζει το στάδιο της εξωγενούς τροφοληψίας (First feeding). Μορφολογικά στην αρχή της φάσης αυτής παρατηρείται ότι ο πεπτικός σωλήνας καθ' όλο το μήκος του είναι ευθυγραμμισμένος, το κεφάλι είναι συγκριτικά μικρότερο από το υπόλοιπο σώμα της προνύμφης και τα μάτια δεν έχουν ακόμη χρωματιστεί.

Το επόμενο στάδιο χαρακτηρίζεται από την κάμψη της νωτοχορδής, flexion (FL). Η νωτοχορδή αποτελεί μία προσωρινή εμβρυϊκή δομή που θα αντικατασταθεί από την σπονδυλική στήλη (Yang et al. 2016), εντοπίζεται ακριβώς κάτω από τον νευρικό σωλήνα, σχηματίζεται από κύτταρα που μεταναστεύουν στο εσωτερικό μέσω της εμβρυϊκής ασπίδας. Το σώμα της προνύμφης στο στάδιο αυτό αυξάνει σε βάθος και όγκο. Εμφανίζονται οι πρώτες ακτίνες των πτερυγίων και το οπίσθιο τμήμα της νωτοχορδής κάμπτεται με

αποτέλεσμα τον σχηματισμό του ουραίου πτερυγίου με το τέλος αυτού του σταδίου (Yang et al. 2016). Τα άτομα αποκτούν αλλαγές στην ικανότητα κολύμβησης χάρη στην εμφάνιση των πτερυγίων.

Στην συνέχεια, κατά την διαδικασία της ανάπτυξης ακολουθεί το στάδιο που ονομάζεται end of larva rearing (ELR), το οποίο σηματοδοτείται με το τέλος της προνυμφικής φάσης και την έναρξη της μεταμόρφωσης, όπου συνήθως αλλάζει και ο τύπος διαίτας των νεαρών ατόμων (Yang et al. 2016). Μορφολογικά στο στάδιο αυτό αρχίζουν να σχηματίζονται οι ραχοκοιλιακές θέσεις των πτερυγίων (Pavlidis et al. 2011).

Τελευταίο στάδιο της ανάπτυξης πριν τα άτομα γίνουν νεαρά ιχθύδια (Juveniles) φαίνεται να είναι αυτό της μέσης μεταμόρφωσης (MM), όπου τα άτομα αποκτούν χαρακτηριστικά ενήλικου έχοντας διαμορφώσει όλα τα πτερύγια τους και ξεκινά ο σχηματισμός των λεπιών (Pavlidis et al. 2011). Με το τέλος της μεταμόρφωσης έχει σχηματιστεί όλο το πεπτικό σύστημα.

1.6 Διατροφή

1.6.1 Διατροφή στην φύση

Το μαγιάτικο, ως σαρκοφάγο είδος κατά την διάρκεια της ανάπτυξής του υφίσταται κάποιες αλλαγές στις διατροφικές του επιλογές. Αρχικά, τα νεαρά άτομα μήκους μικρότερα από 8mm, στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια, στην φύση τρέφονται κυρίως με ζωοπλαγκτόν (πχ. κωπήποδα) και προνύμφες αμφίποδων. Περνώντας στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο, άτομα μεγέθους έως και 20mm εισέρχονται σε μία μεταβατική περίοδο όπου αρχίζουν να κολυμπούν και να αναζητούν νυκτοβενθικούς οργανισμούς (πχ. μικρά μαλάκια). Η περίοδος αυτή χαρακτηρίζεται ως πλαγκτονική και δεν ξεπερνά το χρονικό διάστημα των τριών μηνών κατά το οποίο το μαγιάτικο δεν είναι ακόμη ιχθυοφάγο (Badalamenti 1995). Τέλος, τα ενήλικα άτομα μετατρέπονται σε ιχθυοφάγα καθώς φεύγουν από την ανοιχτή θάλασσα και πλησιάζουν παράκτιες περιοχές (Badalamenti 1995). Η κύρια λεία τους ως ενήλικα είναι είδη όπως το *Loligo vulgaris* και το *Sepioloa* sp., τα οποία ανήκουν στα κεφαλόποδα και τα ψάρια *Scomber scombrus*, *Engraulis encrasicolus*, *Sardina pilchardus*, (Andaloro et al. 1997). Κατά την μη-αναπαραγωγική τους περίοδο δεν είναι γνωστές οι διατροφικές τους συνήθειες,

καθώς τα ενήλικα άτομα φεύγουν από τις παράκτιες περιοχές και περνούν σε μεγαλύτερα βάθη.

Τα κεφαλόποδα μαζί με τα κωπήποδα, τα τροχόζωα, την *Artemia* αποτελούν όπως αναφέρθηκε, κύριο μέρος της φυσικής διατροφής του μαγιάτικου. Τα κεφαλόποδα, όπως όλα τα μαλάκια, αποτελούν καλή πηγή πρωτεϊνών στην διατροφή των μαγιάτικων προάγοντας την ανάπτυξή τους, ενισχύοντας την αύξηση της σωματικής τους μάζας. Τα κωπήποδα διαθέτουν εξωσκελετό, ο οποίος περιέχει ως κύριο δομικό συστατικό την χιτίνη, έναν δομικό πολυσακχαρίτη άφθονο στην φύση. Το γεγονός αυτό προϋποθέτει πως η πέψη τους από το ψάρι θα είναι πιο δύσκολη, καθώς απαιτούνται υδρολυτικά ένζυμα (πχ. χιτινάσες) για την διάσπαση του (Gamberoni et al. 2021a).

Τα τροχόζωα και η *Artemia* είναι δύο ζωντανές τροφές που χρησιμοποιούνται ευρέως στην ιχθυοκαλλιέργεια λόγω των ευνοϊκών χαρακτηριστικών τους. Συγκεκριμένα, τα πρώτα είναι οργανισμοί του φύλου *Rotifera*, με μέγεθος 100–340 μm, ανάλογα με το είδος που συνήθως είναι το *Brachionus plicatilis* ή το *B. rotundiformis*. Χαρακτηρίζονται από μαλακό εξωσκελετό, είναι εύκολα καταναλώσιμα και παραμένουν αιωρούμενα στο νερό για μεγάλο χρονικό διάστημα σε αντίθεση με συνθετικές τροφές, καθώς εμφανίζουν επίσης αργή κίνηση γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για νεογέννητες προνύμφες ψαριών (Samat et al. 2020).

Μικρά καρκινοειδή του γένους *Artemia*, στα νεογνικά τους στάδια έχουν μέγεθος 400–500 μm με μέγιστες καταγραφές να είναι στα 667 μm (Abatzopoulos* et al. 1998) και χαρακτηρίζονται ως ναύπλιοι. Αποτελούν πηγή θρεπτικών συστατικών για μεγαλύτερες προνύμφες συγκριτικά με τα τροχόζωα διότι εμφανίζουν μεγαλύτερο μέγεθος από αυτά (Jan Vos et al. 1980).

1.6.2 Διατροφή στην ιχθυοκαλλιέργεια

Στην ιχθυοκαλλιέργεια ωστόσο, χρησιμοποιούνται κυρίως τα τροχόζωα και η *Artemia* ως ζωντανές τροφές, οι οποίες εμπλουτίζονται με λιπαρά οξέα λόγω έλλειψης βασικών από αυτών. Τα τροχόζωα χρησιμοποιούνται στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και στην συνέχεια ακολουθούν είδη της *Artemia* (Hamasaki et al. 2009). Τα τροχόζωα χρησιμοποιούνται κυρίως τις πρώτες 30 ημέρες εξωγενούς σίτισης των προνυμφών, διότι είναι είδη εύκολα στην καλλιέργεια και την αναπαραγωγή, γεγονός που τα καθιστά οικονομικά επωφελή για τους καλλιεργητές (Samat et al. 2020). Το πλεονέκτημα της *Artemia* στην ιχθυοκαλλιέργεια είναι το χαρακτηριστικό που εμφανίζουν τα αυγά της και μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλα

χρονικά διαστήματα σε μορφές που ονομάζονται κύστες (cysts) και να εκκολαφθούν εύκολα σε θαλασσινό νερό όταν χρειαστεί να χρησιμοποιηθούν ως τροφή (Jan Vos et al. 1980).

Η επιλογή της ζωντανής τροφής *Artemia* και τροχοζώων για την διατροφή των προνυμφών βασίζεται στα πλεονεκτήματά τους έναντι των σύνθετων τροφών (Samat et al. 2020). Κατά τα προνυμφικά στάδια ανάπτυξης, το πεπτικό σύστημα δεν είναι πλήρως ανεπτυγμένο, καθιστώντας την πέψη σύνθετων τροφών αδύνατη από τα άτομα, αφού δεν υπάρχουν τα απαιτούμενα πεπτικά ένζυμα. Μάλιστα, οι συνθετικές τροφές έχουν το χαρακτηριστικό ότι μπορούν να επιπλέουν στο νερό για ένα μικρό χρονικό διάστημα πριν βυθιστούν και έτσι συνήθως οι προνύμφες δεν προλαβαίνουν να τραφούν επαρκώς, σε αντίθεση με την ζωντανή τροφή που είναι διαθέσιμη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Η ζωντανή τροφή έχει την ικανότητα να κολυμπά και έτσι κατανέμεται σε όλη την δεξαμενή εκτροφής, οπότε γίνεται εύκολα διαθέσιμη για τις προνύμφες, οι οποίες είναι προσαρμοσμένες να επιτίθενται στην κινούμενη λεία τους (Conceição et al. 2010a). Η διατροφικές επιλογές των προνυμφών και των ιχθυδίων διαφοροποιούνται με την πρόοδο των αναπτυξιακών σταδίων καθώς το πεπτικό σύστημα διαμορφώνεται και αναπτύσσεται.

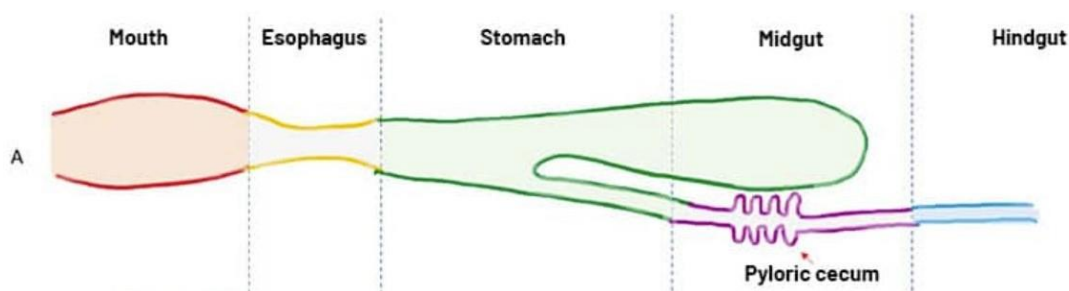
Έρευνες που έχουν διεξαχθεί και αφορούν στην εκτροφή του μαγιάτικου, έχουν δείξει ότι τα κωπήποδα έχουν καταλληλότερη θρεπτική σύσταση για την ανάπτυξη του μαγιάτικου σε σχέση με αυτή των τροχοζώων ή της *Artemia* (Conceição et al. 2010a),(Samat et al. 2020). Αυτό συμβαίνει διότι διαθέτουν υψηλή περιεκτικότητα ακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως τα δοκοσαεξανοϊκό οξύ (DHA) και το εικοσιπεντανοϊκό οξύ (EPA), που συσσωρεύονται στα φωσφολιπίδια (Conceição et al. 2010a). Το γεγονός αυτό οδηγεί στην απουσία ανάγκης εμπλουτισμού και έτσι μειώνεται η ανάγκη για συνεχή καθαρισμό των δεξαμενών εκτροφής. Οι απαιτήσεις σε φωσφολιπίδια σχετίζονται με την ηλικία των προνυμφών και το στάδιο ανάπτυξης του πεπτικού τους συστήματος. Σχετική μελέτη έδειξε ότι, όσο υψηλότερα είναι τα επίπεδα DHA στη διατροφή των προνυμφών των ψαριών, τόσο αυξάνεται η δραστηριότητα πεπτικών ενζύμων όπως πρωτεάσες, λιπάσες, αλκαλικές φωσφατάσες, οδηγώντας σε σημαντική βελτίωση της πεπτικής τους ικανότητας (Conceição et al. 2010a).

Τα κωπήποδα, χρησιμοποιούνται στην ιχθυοκαλλιέργεια ως ζωντανή τροφή για προνύμφες ψαριών λόγω της υψηλής περιεκτικότητάς τους σε ω-3 λιπάρα οξέα και πρωτεΐνες. Επιπρόσθετα, ξεχωρίζουν, διότι έχουν έναν σημαντικό αριθμό ελεύθερων αμινοξέων, τα

οποία ενισχύουν την διατροφή των προνυμφών και συμμετέχουν τόσο σε αναβολικές όσο και σε καταβολικές διεργασίες τους (Rønnestad et al. 2003). Το πλεονέκτημα των ελεύθερων αμινοξέων είναι το ότι δεν απαιτούν προηγούμενη πέψη κατά την επεξεργασία τους. Τέλος, τα κωπήποδα περιέχουν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων συγκριτικά με την *Artemia* και τα τροχόζωα.

1.7 Πεπτικό σύστημα

Το μαγιάτικο ανήκει στους σαρκοφάγους ιχθύες. Μορφολογικά, το πεπτικό του σύστημα με το τέλος της μεταμόρφωσης, διαθέτει μεγάλο στόμαχο (Εικόνα 1) με σκοπό να μπορεί να προσλαμβάνει μεγάλες ποσότητες τροφής και κοντό πεπτικό σωλήνα (Βουλτσιάδου κ.α. 2015). Το πεπτικό σύστημα των ιχθύων είναι υπεύθυνο για τον μεταβολισμό και την πέψη των τροφών με σκοπό την απορρόφηση όλων των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών για την σωστή ανάπτυξή τους. Τα βασικά μέρη από τα οποία αποτελείται είναι το στόμα, ο οισοφάγος, το στομάχι, τα πυλωρικά τυφλά, το πρόσθιο και οπίσθιο έντερο (Εικόνα 1).



Εικόνα 1: Βασικά τμήματα του πεπτικού συστήματος σαρκοφάγων ιχθύων (Rodríguez J. L. 2022).

Βοηθητικά πεπτικά όργανα τα οποία συμβάλλουν στην πεπτική λειτουργία αποτελούν το ήπαρ, το πάγκρεας και η χοληδόχος κύστη από την οποία εκκρίνεται η χολή κατά την πέψη των λιπαρών. Αρχικά, στο στόμα πραγματοποιείται η σύλληψη και συγκράτηση του θηράματος με την βοήθεια των δοντιών. Στην συνέχεια, η τροφή περνά στον οισοφάγο, ο οποίος στα σαρκοφάγα ψάρια έχει μία χαρακτηριστική ελαστικότητα λόγω του ραβδοειδή μυ και της βλεννώδους μεμβράνης που διαθέτει για να μπορεί να αναμασήσει την τροφή που εισέρχεται σε αυτόν (Βουλτσιάδου κ.α. 2015). Οι οισοφαγικοί αδένες του είναι υπεύθυνοι για την λίπανση του πεπτικού σωλήνα, καθώς οι ιχθύες δεν διαθέτουν διακριτούς σιελογόνους αδένες με αυτόν τον ρόλο (Βουλτσιάδου κ.α. 2015).

Η τροφή διέρχεται από τον οισοφάγο και καταλήγει στο στομάχο όπου ξεκινά η πέψη με την βοήθεια των πεπτικών ενζύμων και του υδροχλωρικού οξέος που εκκρίνονται από το επιθήλιο του στομάχου (Βουλτσιάδου κ.α. 2015). Το υδροχλωρικό οξύ βοηθά στην ενεργοποίηση των ζυμογόνων όπως του πεψινογόνου προς πεψίνη, στην μετουσίωση πρωτεϊνών της τροφής, ενισχύει την απελευθέρωση θρεπτικών συστατικών από οργανικά σύμπλοκα και μπορεί να δράσει ως βακτηριοκτόνος παράγοντας σκοτώνοντας πιθανά βακτήρια που εισέρχονται στον οργανισμό μαζί με την τροφή. Τέλος, μπορεί να διεγείρει τις εντερικές εκκρίσεις ενεργοποιώντας την απελευθέρωση παγκρεατικών ενζύμων και χολής.

Ο γαστρικός χυμός, στον οποίο περιέχονται αυτά τα συστατικά, εκκρίνεται από τους γαστρικούς αδένες του στομάχου. Κατά την διαδικασία της πέψης, στο στομάχι παρατηρούνται χαρακτηριστικές περισταλτικές κινήσεις για την ανακίνηση του γαστρικού περιεχομένου με σκοπό την συνολική επαφή του περιεχομένου με τα γαστρικά υγρά για την καλύτερη πέψη. Μορφολογικά και λειτουργικά, ο στομάχος χωρίζεται σε δύο διακριτές μοίρες, στην καρδιακή και την πυλωρική μοίρα. Η καρδιακή έχει λεπτά, ελαστικά τοιχώματα, ενώ η πυλωρική διαθέτει παχιά τοιχώματα μυϊκού ιστού. Η τροφή που εισέρχεται στην καρδιακή μοίρα αποθηκεύεται για σύντομο χρονικό διάστημα και στην συνέχεια, μέσω συσπάσεων των τοιχωμάτων του στομάχου κατευθύνεται προς την πυλωρική μοίρα (Βουλτσιάδου κ.α. 2015).

Με την βοήθεια του πυλωρικού σφιγκτήρα, η τροφή μεταβαίνει στο λεπτό έντερο, όπου μορφολογικά, υπάρχουν περισσότερα βλεννογόνα κύτταρα και μύες σε αυτό το τμήμα του εντέρου σε σχέση με το παχύ έντερο. Βιοχημικά το εντερικό τμήμα των σαρκοφάγων ψαριών έχει μεγαλύτερη ικανότητα να καταβολίζει πολυπεπτίδια σε αμινοξέα σε σχέση με την ικανότητα πέψης των πολυσακχαριτών (Βουλτσιάδου κ.α. 2015). Αυτό συμβαίνει διότι τα σαρκοφάγα είδη έχουν εξελιχθεί έτσι ώστε να αξιοποιούν πρωτεϊνικές πηγές τροφής. Τα βακτήρια που απαρτίζουν το εντερικό μικροβίωμα των οργανισμών συνήθως προέρχονται μεταξύ άλλων και από την τροφή τους (Larsen et al. 2014) και η ποικιλοπλοκότητά τους αυξάνεται όσο αναπτύσσεται το εντερικό σύστημα (Paralika et al. 2023). Σε πείραμα που διεξήχθη, προνύμφες *S. dumerili* τράφηκαν στην μία περίπτωση με τροχόζωα και στην άλλη με κωπήποδα και φάνηκε πως το διαφορετικό διαιτολόγιο δεν επηρέασε σημαντικά την ποσότητα ή την ποιότητα του εντερικού μικροβιώματος (Paralika et al. 2023), η οικογένεια των βακτηρίων που φάνηκε να επικρατεί είναι τα *Rhodobacteriaceae*.

Το πάγκρεας στα ψάρια μπορεί να συγκεντρώνεται σε ένα όργανο ή να είναι διάχυτο σε εξωκρινή και ενδοκρινή κύτταρα (νησίδες Lagerhans). Τα πεπτικά ένζυμα και τα διττανθρακικά που εκκρίνονται απελευθερώνονται στον εντερικό αυλό. Τα διττανθρακικά παράγονται από κύτταρα της εξωκρινής μοίρας του παγκρέατος, αυξάνοντας το pH του εντέρου σε τέτοιο βαθμό ώστε τα πεπτικά ένζυμα που εκκρίνονται στο έντερο και τα πυλωρικά τυφλά να μπορούν να δράσουν (Βουλτσιάδου κ.α. 2015). Η ινσουλίνη παράγεται από τα ενδοκρινή κύτταρα μετά την πέψη για την ρύθμιση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα των ιχθύων. Η χοληδόχος κύστη αποθηκεύει τη χολή, η οποία παράγεται από τα ηπατοκύτταρα, και στη συνέχεια την εκκρίνει στον εντερικό αυλό ως απάντηση σε συγκεκριμένα ορμονικά ερεθίσματα όπως η αύξηση της χολοκυστικίνης, με σκοπό την απορρόφηση και πέψη των λιπών της τροφής (Βουλτσιάδου κ.α. 2015).

Κατά τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης και μέχρι το στάδιο της μεταμόρφωσης η μορφολογία του πεπτικού συστήματος περνά από διάφορες αλλαγές μέχρι την τελική διαμόρφωσή του. Η ανάπτυξη του πεπτικού συστήματος σχετίζεται άμεσα με την ανάπτυξη του νευρικού σωλήνα και την σωστή ανάπτυξη του σκελετικού συστήματος.

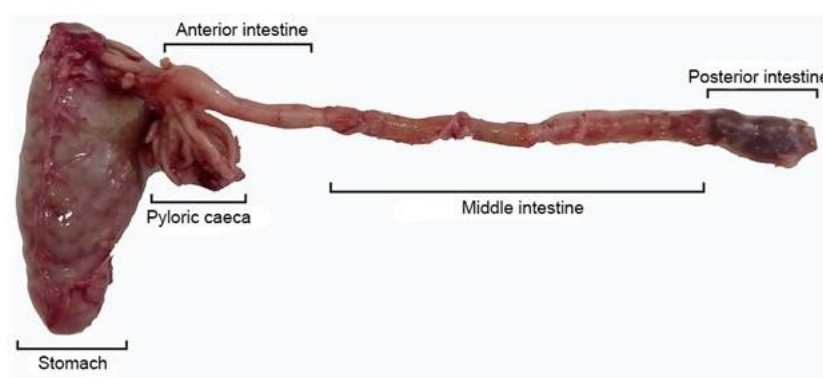
Από την εκκόλαψη των αυγών μέχρι τη δεύτερη μέρα μετά την εκκόλαψη (2 DAH) ο πεπτικός σωλήνας εμφανίζεται κλειστός σε ευθεία γραμμή και εντοπίζεται ραχιαία της λεκίθου αποτελούμενος από μία στιβάδα επιθηλιακών κυττάρων (Pérez et al. 2020a).

Η οργανογένεση του πεπτικού συστήματος του μαγιάτικου γίνεται σε τρεις φάσεις. Η πρώτη φάση περιλαμβάνει το χρονικό διάστημα από την εκκόλαψη μέχρι το άνοιγμα του στόματος και του ορθού, όπου η διατροφή βασίζεται μονάχα στην απορρόφηση των θρεπτικών μέσω της λεκίθου για τις πρώτες 2 DAH (Pérez et al. 2020a). Η εμφάνιση της ειλεορθικής βαλβίδας καθυστερεί την εμφάνισή της στο *S. dumerili* συγκριτικά με άλλα είδη και γίνεται στην 4 DAH. Η ειλεορθική βαλβίδα είναι ένα ανατομικό χαρακτηριστικό που τοποθετείται μεταξύ του ειλεού (τελικού τμήματος του λεπτού εντέρου) και του ορθού (τελικό τμήμα παχέος εντέρου) και δρα ως ρυθμιστικός μηχανισμός μεταφοράς του εντερικού περιεχομένου από το λεπτό στο παχύ έντερο (Loufi et al. 2024). Μέχρι το τέλος της πρώτης αυτής φάσης έχουν αρχίσει να εμφανίζονται τα πρώιμα ηπατικά και παγκρεατικά κύτταρα τα οποία προέρχονται από το ενδόδερμα. Το ήπαρ αναπτύσσεται ταχεία και ξεκινά να διαμορφώνεται και να λειτουργεί την 3 DAH μακριά από την νωτοχορδή σε είδη όπως το *Seriola rivoliana* (Teles et al. 2019a). Η δεύτερη φάση ανάπτυξης του πεπτικού είναι μία μεταβατική περίοδος και σηματοδοτείται με την έναρξη της εξωγενούς πρόσληψης τροφής, δηλαδή την στιγμή του first feeding (FF)

(4-10 DAH). Κατά την διάρκεια της φάσης αυτής εμφανίζονται ο καρδιακός και πυλωρικός σφιγκτήρας του στομάχου, οι δύο μυϊκοί δακτύλιοι που ελέγχουν την ροή της τροφής εντός του στομάχου. Ο καρδιακός σφιγκτήρας βρίσκεται μεταξύ οισοφάγου και στομάχου και ελέγχει την είσοδο της τροφής σε αυτό αποτρέποντας την παλινδρόμηση των γαστρικών οξέων προς τον οισοφάγο. Ο πυλωρικός σφιγκτήρας με την σειρά του, εμφανίζεται την 7DAH στο *S.dumerili* (Pérez et al. 2020a) και βρίσκεται στο τέλος του στομάχου, ρυθμίζοντας την εκκένωση του χυμού προς το λεπτό έντερο σε συγχρονισμένες κινήσεις (Pérez et al. 2020a). Επιπλέον, τα κύτταρα του βλεννογόνου του οισοφάγου εμφανίζονται την 13 DAH (Pérez et al. 2020a). Η αύξηση του μήκους του εντέρου ξεκινά να παρατηρείται την 4 DAH και συμβάλλει λειτουργικά στην διαδικασία της πέψης των τροφών και απορρόφησης των θρεπτικών, γεγονός που υποδηλώνεται από την αύξηση της επιφάνειας των λαχνών του εντέρου. Με το πέρας αυτής της φάσης, τα ηπατοκύτταρα και τα παγκρεατικά κύτταρα έχουν διαφοροποιηθεί πλήρως. Τα παγκρεατικά κύτταρα είναι δύο ειδών, ενδοκρινούς και εξωκρινούς μοίρας όπως αναφέρθηκε. Έχει παρατηρηθεί πως η διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων συμβαίνει ταυτόχρονα με την εμφάνιση του γλυκογόνου, γεγονός που επιβεβαιώνει την επίτευξη της λειτουργικής ωρίμανσης των ηπατοκυττάρων ως αποθήκες γλυκόζης με μορφή γλυκογόνου.

Τέλος, η τρίτη φάση της ανάπτυξης του πεπτικού συστήματος σηματοδοτείται από την εμφάνιση των γαστρικών αδένων στο στομάχι, περίπου την ημέρα 15 DAH. Ωστόσο, κατά την ιχθυοκαλλιέργεια, έχει παρατηρηθεί πως η εμφάνιση αυτή αργεί και γίνεται μεταξύ 17-20 DAH (Loufi et al. 2024; Pérez et al. 2020a). Με το τέλος αυτής της φάσης, έχουν εμφανιστεί και τα κύτταρα του εντερικού βλεννογόνου περίπου την 15 DAH. Η τρίτη περίοδος και κατ'επέκταση και η οργανογένεση ολοκληρώνονται με τον σχηματισμό των πυλωρικών τυφλών (*pyloric caeca*) περίπου την 28 DAH (Loufi et al. 2024), όπου είναι προεξοχές του στομάχου κοντά στην πυλωρική περιοχή και έχουν ως στόχο την αύξηση της επιφάνειας του στομάχου, με σκοπό την αύξηση της πέψης, καθώς εκκρίνουν πεπτικά ένζυμα και την ενίσχυση της απορρόφησης θρεπτικών συστατικών. Σύμφωνα με έρευνα που αφορούσε την διατροφή με κωπήποδα (Loufi et al. 2024), παρατηρήθηκε ότι οι προνύμφες που τρέφονταν με αυτά εμφάνισαν γρηγορότερα τα πυλωρικά τυφλά (22 DAH) σε σχέση με προνύμφες που δεν τρέφονταν με αυτά, όπως επίσης και πως το μήκος των εντερικών λαχνών ήταν μεγαλύτερο στις προνύμφες που είχαν λάβει τα κωπήποδα ως τροφή. Το ίδιο ίσχυε και για τον αριθμό των κυττάρων του εντερικού βλεννογόνου (Loufi et al. 2024). Η ύπαρξη αυτών των επιπλέον

βλεννοκυττάρων στο εντερικό επιθήλιο πιθανολογείται πως συμβάλει στην προστασία του σε περιόδους όπου τα υπάρχοντα εντερικά ένζυμα θα μπορούσαν να στραφούν έναντι των εντερικών κυττάρων και να οδηγήσουν στην λύση τους (πχ. περίοδος απογαλακτισμού) (Loufi et al. 2024). Η διαφορά που παρατηρείται στο μήκος των εντερικών λαχνών θα μπορούσε να εξηγήσει τις διαφορές που παρατηρούνται στην συνολική ανάπτυξη των ιχθυδίων, αφού φαίνεται πως με την χρήση των κωπήποδων ο ρυθμός ανάπτυξης είναι μεγαλύτερος. Συνολικά, ο πεπτικός σωλήνας στο *S. dumerili* απεικονίζεται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2: Βασικά τμήματα πεπτικού σωλήνα *S. dumerili* (Navarro-Guillén, Yúfera, and Perera 2022).

1.8 Πεπτικά ένζυμα

Στην διαδικασία της πέψης κύριοι πρωταγωνιστές είναι τα πεπτικά ένζυμα, τα οποία παράγονται από την εξωκρινή μοίρα του παγκρέατος και αποθηκεύονται σε κοκκία περιμένοντας το κατάλληλο σήμα για την απελευθέρωση τους, η οποία θα γίνει μέσω εξωκύττωσης στον εντερικό αυλό. Κύρια ένζυμα που συμβάλλουν ανεξαρτήτως διαιτολογίου στην πεπτική λειτουργία και διασπούν πρωτεΐνες είναι η θρυψίνη που διασπά πεπτίδια στο έντερο, η χυμοθρυψίνη που συμπληρώνει την δράση της θρυψίνης, η πεψίνη που είναι ένα από τα βασικά γαστρικά ένζυμα σε είδη όπως το *S. dumerili* που διαθέτουν στόμαχο και οι καρβοξυπεπτιδάσες μαζί με τις αμινοπεπτιδάσες που δρουν στο έντερο κόβοντας της πεπτιδικές αλυσίδες σε μεμονωμένα αμινοξέα. Για την διάσπαση των λιπών σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη πρωταγωνιστές είναι τα ένζυμα παγκρεατική λιπάση που είναι κύριο ένζυμο στην διαδικασία της λιπόλυσης, οι φωσφολιπάσες και τα χολικά άλατα που παράγονται από το ήπαρ και αν και όχι ένζυμα βοηθούν στην πέψη των λιπών. Ο μεταβολισμός των υδατανθράκων σε μονοσακχαρίτες τέλος, πραγματοποιείται από ένζυμα όπως η α-αμυλάση

και η λακτάση που διασπά τον δισακχαρίτη λακτόζη σε απλά σάκχαρα. Ο τύπος των πεπτικών ενζύμων που θα παραχθούν σε έναν οργανισμό για να συμβάλλουν στον καταβολισμό της τροφής εξαρτάται άμεσα από τις διατροφικές συνήθειες του οργανισμού αυτού. Για παράδειγμα ένζυμα όπως η αμυλάση συνήθως εμφανίζουν περιορισμένη έκφραση σε σαρκοφάγα ζώα και αντίστοιχα η πεψίνη ενδέχεται να έχει μειωμένη έκφραση σε φυτοφάγα ζώα (Βουλτσιάδου κ.α. 2015).

Η α-αμυλάση με ταξινομικό αριθμό EC 3.2.1.1 σύμφωνα με το σύστημα ταξινόμησης της επιτροπής ενζύμων είναι μία καρβοϋδρολάση η οποία διασπά το άμυλο σε γλυκόζη με pK_A ίσο με 8.25. Συγκεκριμένα, υδρολύει τους α -1,4 γλυκοζιτικούς δεσμούς (Munilla-Mordn and Saborido-Rey 1996). Στους ιχθύες, η α-αμυλάση είναι η μοναδική αμυλάση που παράγεται και καταλύει την υδρόλυση των πολυσακχαριτών σε μικρότερα μόρια. Επειδή το μαγιάτικο είναι ένα σαρκοφάγο είδος, θα περίμενε κανείς η πέψη του αμύλου να μην είναι τόσο έντονη. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί πως στα σαρκοφάγα είδη η πέψη του είναι αντιστρόφως ανάλογη της προσλαμβανόμενης ποσότητας του μέσω της τροφής (Rodríguez, 2022). Στο μαγιάτικο, το μετάγραφο του γονιδίου της αποτελείται από 9 εξόνια και κωδικοποιεί για 512 αμινοξικά κατάλοιπα (Εικόνα 3). Το μοριακό βάρος της υπολογίζεται στα 57,645 g/mol (The UniProt Consortium 2025).

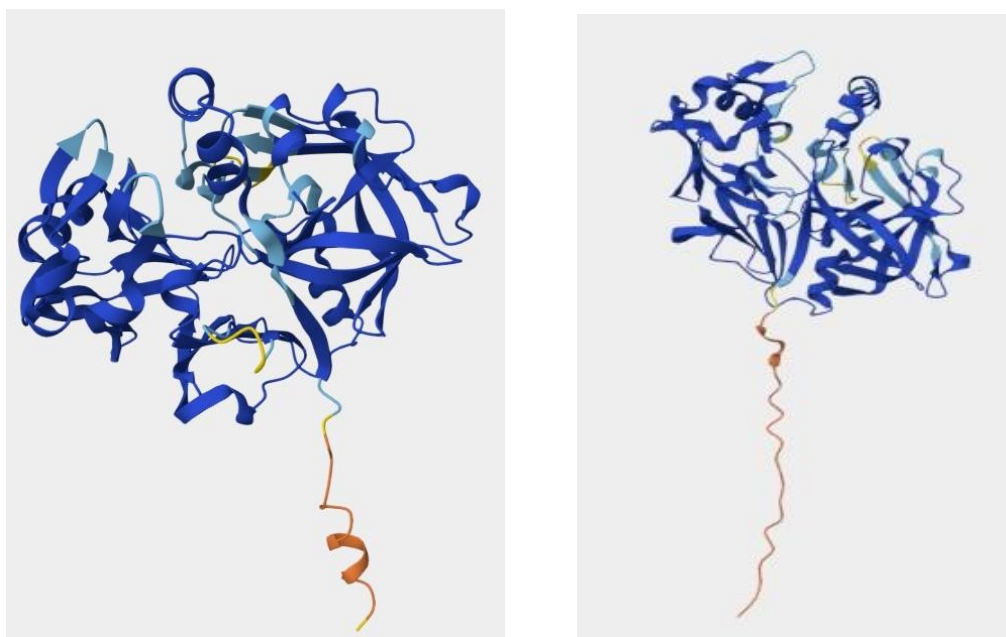


Εικόνα 3: 3D δομή αμυλάσης (The UniProt Consortium 2025).

Η πεψίνη (3.4.23.1) είναι ένα πρωτεολυτικό ένζυμο που ανήκει στην οικογένεια πεπτιδασών του ασπαραγινικού και διασπά τις πρωτεΐνες σε μικρότερα πεπτίδια, συμβάλλοντας στην προετοιμασία της πέψης στο λεπτό έντερο. Οι πεπτιδάσες ασπαραγινικού δρουν

υδρολύοντας τον πεπτιδικό δεσμό μέσω ενός ενεργοποιημένου μορίου νερού και όχι μέσω της νουκλεοφιλικής πλευρικής αλυσίδας της σερίνης όπως συμβαίνει στην χυμοθρυψίνη, η οποία είναι μια πρωτεάση σερίνης. Παράγεται στο στομάχι από τα κύτταρα του γαστρικού βλεννογόνου ως ανενεργό προένζυμο, το πεψινογόνο, το οποίο με την παρουσία του HCl οξέος αυτοκαταλύεται και μετατρέπεται σε ενεργή πεψίνη (Heda et al. 2019). Η ενεργοποίησή του περιλαμβάνει την αποκοπή τμήματος του αμινοτελικού άκρου του, το τελικό προϊόν της οποίας είναι η πεψίνη. Σύμφωνα με δεδομένα της UniProt το βέλτιστο pH λειτουργίας του είναι αρκετά όξινο με το ισοηλεκτρικό του σημείο να είναι στο 5.6 και αποτελείται συγκεκριμένα από 379 αμινοξικά κατάλοιπα με μοριακό βάρος 41,3 g/mol και 16 πρωτεϊνικές επικράτειες (The UniProt Consortium 2025). Κρυσταλλικές δομές της αποδεικνύουν πως έχει δύο λοβούς, στο εσωτερικό των οποίων εντοπίζεται το ενεργό της κέντρο, όπου υπάρχουν δύο κατάλοιπα ασπαραγινικού (Εικόνα 4). Η κύρια αντίδραση που καταλύει είναι η υδρόλυση των αμινοτελικών και καρβοξυτελικών άκρων σε γειτονικά αμινοξέα όπως Glu-Tyr και Phe-Phe, αλλά με μικρή απόδοση (Bela Szecsi 2013; Tang 2013).

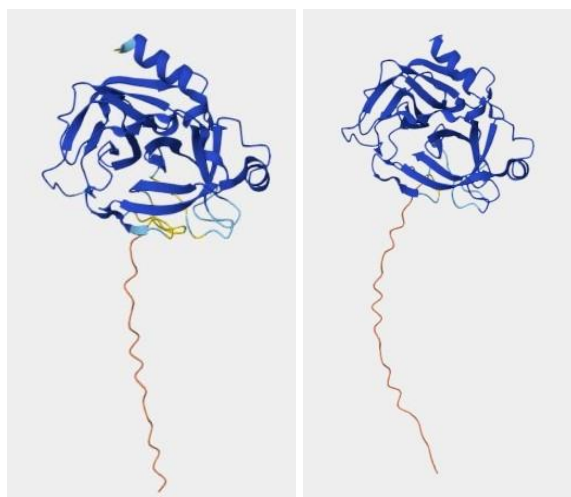
Το δεύτερο παράλογο της πεψίνης PAL, διαθέτει 382 αμινοξικά κατάλοιπα. Το μοριακό της βάρος κυμαίνεται στα 41,5 g/mol, ανήκει στις πεπτιδάσες ασπαραγινικού, συγκεκριμένα στην οικογένεια A1 (The UniProt Consortium 2025). Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 5 το μόριο της διαθέτει δύο λοβούς στο εσωτερικό των οποίων βρίσκεται το ενεργό κέντρο του μορίου με τα καταλυτικά αμινοξέα του να είναι δύο στις θέσεις Asp93, Asp275 (The UniProt Consortium 2025). Ο καταλυτικός μηχανισμός οδηγεί στην δημιουργία ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου όπως και στις πρωτεάσες σερίνης, με την διαφορά όπως ήδη αναφέρθηκε να είναι πως το νουκλεόφιλο μόριο είναι η καρβοξυλική ομάδα του μορίου νερού, η οποία μετατρέπεται σε ιόν υδροξειδίου (Dunn et al. 2000).



Εικόνα 4: 3D δομή παραλόγων πειψίνης A: 3D δομή πειψίνης, B: 3D δομή πειψίνης τύπου A

(The UniProt Consortium 2025).

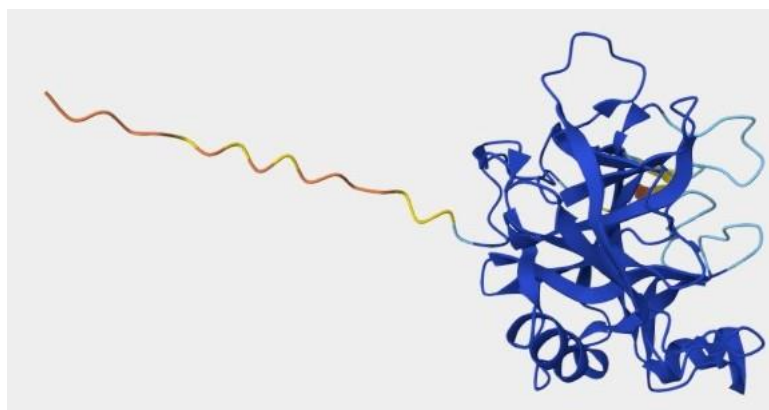
Η θρυψίνη είναι μία παγκρεατικής προέλευσης πρωτεάση με ταξινομικό αριθμό EC: 3.4.21.4 και ιδανική τιμή pH=7 (The UniProt Consortium 2025). Η ανιονική θρυψίνη 1 ανήκει στις πεπτιδάσες σερίνης, με 249 αμινοξέα και μοριακό βάρος 27,4 g/mol (The UniProt Consortium 2025). Υδρολύει δεσμούς που διαθέτουν ως πρώτο αμινοξύ λυσίνη ή αργινίνη ενώ μπορεί να έχει βέλτιστη δραστηριότητα και σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες έως 60°C σε ορισμένα είδη *Seriola* (Jesús-De La Cruz et al. 2018). Ένα άλλο παράλογο γονίδιο θρυψίνης κωδικοποιεί για μια θρυψίνη που υδρολύει δεσμούς με αργινίνη με μεγάλη απόδοση ενώ δεσμούς που περιέχουν λυσίνη τους υδρολύει σε μικρότερο βαθμό. Έχει την ικανότητα να διασπά δεσμούς σε μη-πρωτεολυτικά υποστρώματα όπως τα προ-ένζυμα (Jesús-De La Cruz et al. 2018). Οι δομές των δύο παραλόγων φαίνονται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: 3D δομή παραλόγων θρυψίνης, A: παράλογο ανιονικής θρυψίνης 1, B: παράλογο θρυψίνης τύπου 3

(The UniProt Consortium 2025).

Η χυμοθρυψίνη με ταξινομικό αριθμό EC 3.4.21.1 ανήκει στην κατηγορία των πρωτεασών σερίνης, μία οικογένεια πρωτεϊνών που αποτελείται από ενδοπρωτεάσες που έχουν την ικανότητα να διασπούν τις πρωτεΐνες στο εσωτερικό της κύριας αλυσίδας τους. Οι πρωτεάσες σερίνης διακρίνονται από μία χαρακτηριστική σερίνη στο ενεργό τους κέντρο, οι οποίες διασπούν πεπτιδικούς δεσμούς μεταξύ υδρόφοβων αμινοξέων (trp, tyr, phe). Συγκεκριμένα, υδρολύει το καρβοξυλικό τμήμα των αρωματικών πλευρικών αλυσίδων τους. Η καταλυτική τριάδα της αποτελείται από τα αμινοξέα His57, Asp102 και Ser195 και είναι απαραίτητη για τη διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού. Η σερίνη που βρίσκεται στο ενεργό κέντρο συμμετέχει άμεσα στην διάσπαση του πεπτιδικού δεσμού καθώς λειτουργεί ως νουκλεόφιλο στην νουκλεοφιλική προσβολή του πεπτιδικού δεσμού από την υδροξυλομάδα της. Η πρωτεΐνη αυτή συντίθεται ως πρόδρομο ανενεργό μόριο (χυμοθρυψινογόνο), το οποίο ενεργοποιείται έπειτα από την διάσπαση ενός τμήματός του χωρίς την κατανάλωση ενέργειας και είναι σημαντική για την πέψη πρωτεϊνών στο λεπτό έντερο. Το βέλτιστο pH λειτουργίας της σύμφωνα με την UniProt είναι το 7.7 και αποτελείται από 263 αμινοξικά κατάλοιπα ενώ το μοριακό της βάρος είναι στο 28,267 g/mol, με συνολικά 18 πρωτεϊνικές επικράτειες (The UniProt Consortium 2025). Αποτελείται από τρεις πολυπεπτιδικές αλυσίδες, που είναι συνδεδεμένες με δύο δισουλφιδικούς δεσμούς. Το μόριο της είναι ελλειψοειδές, με αρκετές αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες και κάποιες περιοχές α-έλικας (Gráf et al. 2013). Η δομή του μορίου φαίνεται στην Εικόνα 6.



Εικόνα 6: 3D δομή της χυμοθρυψίνης (The UniProt Consortium 2025).

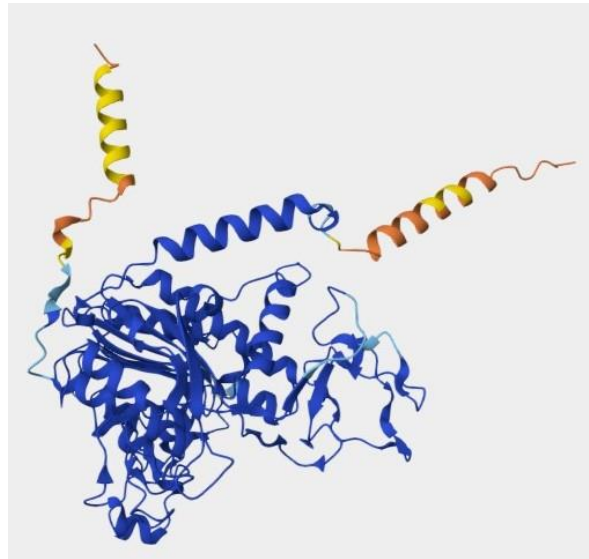
Η αλανυλ-αμινοπεπτιδάση(AlaAP), EC 3.4.11.2, είναι μεμβρανική μεταλλοπρωτεΐνη, που αφαιρεί αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών, συμμετέχει στην πέψη πρωτεϊνών και στην ρύθμιση πεπτιδίων. Έχει μέγεθος 965 αμινοξέων και μοριακό βάρος 110 g/mol, διαθέτει μία μεγάλη εξωκυτταρική περιοχή που περιέχει το ενεργό κέντρο το οποίο δρα ως δέκτης πρωτονίων. Στην περιοχή του ενεργού κέντρου δρουν ως συμπαράγοντες ιόντα ψευδαργύρου (Εικόνα 7). Το ισοηλεκτρικό της σημείο εμφανίζεται σε pH= 6.8 και έχει 21 επικράτειες (The UniProt Consortium 2025). Η ισχυρότερη δραστηριότητά της εντοπίζεται στα πυλωρικά τυφλά και το πρόσθιο τμήμα του εντέρου ενώ στο οπίσθιο τμήμα φαίνεται ασθενέστερη. Συμμετέχει στο τελευταίο στάδιο της πρωτεϊνικής πέψης, διασπώντας μικρά πεπτίδια που προκύπτουν από την προηγούμενη δράση γαστρικών και παγκρεατικών πρωτεασών. Πιο συγκεκριμένα, καταλύει την απελευθέρωση ελεύθερων αμινοξέων από το N-τελικό άκρο των πεπτιδίων, επιτρέποντας την απορρόφησή τους από τα εντεροκύτταρα (Tlak et al. 2024).



Εικόνα 4: 3D δομή ανυλιν-αμυνοπεπτιδάσης (The UniProt Consortium 2025).

Η αλκαλική φωσφατάση, EC 3.1.3.1, είναι υδρολυτικό γλυκοπρωτεϊνικό ένζυμο που αφαιρεί φωσφορικές ομάδες (αποφωσφορυλίωση), σύμφωνα με δεδομένα της UniProt το βέλτιστο pH=6,9, έχει 530 αμινοξικά κατάλοιπα και μοριακό βάρος 58,15 g/mol (The UniProt Consortium 2025). Αποτελείται από 15 επικράτειες (domains) και λειτουργεί ως ομοδιμερές (Εικόνα 8), παίζοντας ρόλο στην μεταφορά φωσφόρου, στην μεταβολική δραστηριότητα και την πέψη πρωτεϊνών και αλκαλοειδών. Στο είδος *Seriola dumerili*, η δραστηριότητά της εντοπίζεται σε εντεροκύτταρα καθ'όλο το μήκος του εντερικού σωλήνα. Στο είδος *Sphyræna sphyræna* (Linnaeus, 1758) εντοπίζονται διαφορετικά επίπεδα έκφρασης κατά μήκος του εντέρου. Πιο συγκεκριμένα, στα αρχικά τμήματα, πυλωρικά τυφλά, εμφανίζεται η ισχυρότερη δραστηριότητα του ενζύμου. Περνώντας στο μεσαίο τμήμα του εντέρου, η δραστηριότητα είναι ισχυρή κυρίως στο βασικό τμήμα των εντερικών λαχνών και στην συνέχεια, στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου εμφανίζεται ισχυρή δραστηριότητα σε όλο το μήκος των εντερικών λαχνών (Tlak et al. 2024). Σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία, σε άλλα είδη ψαριών, η δραστηριότητα της μειώνεται σταδιακά περνώντας από το πρόσθιο στο οπίσθιο τμήμα του εντέρου τόσο σε νεαρά όσο και σε ενήλικα άτομα (Lallès 2020). Η αλκαλική φωσφατάση έχει πολύ σημαντικό ρόλο στην πεπτική διαδικασία, καθώς συμβάλλει στην απορρόφηση γλυκόζης, λιπιδίων, ανόργανου φωσφόρου και ασβεστίου. Συμμετέχει στη διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας στο εντερικό μικροπεριβάλλον για την σωστή λειτουργία όλων των ενζύμων και την ομοιοστάση της μικροχλωρίδας του εντέρου. Επιπλέον,

αποτελεί αναπτυξιακό δείκτη αφού η δραστηριότητά της φυσιολογικά εμφανίζεται στα αρχικά στάδια ανάπτυξης σηματοδοτώντας τη λειτουργική ωρίμανση των εντεροκυττάρων. (Tlak et al. 2024).



Εικόνα 8: 3D δομή αλκαλικής φωσφατάσης (The UniProt Consortium 2025).

1.9 Κλιματική αλλαγή και Οικονομική σημασία

Στον ελλαδικό χώρο ήδη από το 1999 υπάρχει η ανάγκη για την εισαγωγή νέων ειδών στην ιχθυοκαλλιέργεια με το μαγιάτικο να αποτελεί έναν από τους κύριους υποψήφιους με σημαντικές οικονομικές προοπτικές. Ο έντονος ανταγωνισμός που υπάρχει με την Τουρκία στην Ευρωπαϊκή αγορά κάνει την ανάγκη αυτή για την εισαγωγή του στις ιχθυοκαλλιέργειες μεγαλύτερη. Είναι ένα είδος που διαθέτει χαρακτηριστικά που το καθιστούν οικονομικά κατάλληλη επιλογή για την ιχθυοκαλλιέργεια, καθώς έχει υψηλή αγοραστική ζήτηση, υψηλή τιμή πώλησης, ταχείς ρυθμούς ανάπτυξης που μειώνουν τον χρόνο εκτροφής και άρα περιορίζουν το κόστος παραγωγής ενώ συνδυάζει και υψηλή ποιότητα κρέατος. Η επιθυμία για την επιτυχή εκτροφή του έχει φανεί από το 2018, όπου με Ευρωπαϊκή πρωτοβουλία το πρόγραμμα DIVERSITY έδωσε έμφαση στην εύρεση των κατάλληλων συνθηκών εκτροφής του μαγιάτικου. Σύμφωνα με έρευνα που έχει διεξαχθεί, το μαγιάτικο προσαρμόζεται εύκολα στο περιβάλλον αιχμαλωσίας του, αλλά η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών αναπαραγωγής του δεν έχει επιτευχθεί ακόμα (Parandroulakis et al. 2005).

Η κλιματική αλλαγή έχει οδηγήσει σε αύξηση της θερμοκρασίας της Μεσογείου με αρκετά υψηλό ρυθμό τις τελευταίες δύο δεκαετίες (Durrieu de Madron et al. 2011), μία αύξηση που προβλέπεται πως θα συνεχιστεί και τα επόμενα χρόνια και απειλεί την βιωσιμότητα των θαλάσσιων οργανισμών (Schreiber et al. 2011). Αυτό συμβαίνει διότι η θερμοκρασία είναι ένας από τους κύριους επιγενετικούς παράγοντες που επηρεάζουν τον ρυθμό ανάπτυξης τους. Δημιουργείται έτσι ένα μεγάλο κενό για την επιτυχή εκτροφή των ιχθύων το οποίο η επιστήμη καλείται να εξαλείψει.

Η άνοδος της θερμοκρασίας σε συνδυασμό με την αύξηση της οξύτητας των θαλασσών αυξάνει την θνησιμότητα των ατόμων έως και 50% (Araújo et al. 2018). Η οξύτητα της θάλασσας αυξάνεται λόγω του CO₂ της ατμόσφαιρας, το οποίο διαλύεται στο θαλασσινό νερό δίνοντας ανθρακικό οξύ, που με την σειρά του διίσταται και δίνει κατιόντα υδρογόνου μειώνοντας έτσι το pH και αυξάνοντας την οξύτητα του νερού. Η οξύνηση αυτή οδηγεί σε αύξηση της καταβολικής διαδικασίας των λιπών και της πεπτικής λειτουργίας των ατόμων (Araújo et al. 2018).

Σε μελέτη που αφορά την επίδραση της υπερθέρμανσης των ωκεανών στους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς ιχθύων, φάνηκε πως με την αύξηση της θερμοκρασίας, η

δραστικότητα του συμπλόκου κυτοχρώματος CYP1A μειώθηκε σημαντικά υποδεικνύοντας πως η θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει τους αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς στα ψάρια, με αποτέλεσμα να επηρεάζει αρνητικά την υγεία τους (Madeira et al. 2016). Στην ίδια έρευνα φάνηκε πως τα ένζυμα τρανσφεράση της γλουταθιόνης (GST), δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) και λιπιδική υπεροξειδάση εμφανίζουν αύξηση της δραστικότητάς τους στο ήπαρ με την αύξηση της θερμοκρασίας γεγονός που αποτυπώνει την καταπόνηση του οργάνου, δηλαδή την ευαισθησία του στην παραγωγή ROS, με την αύξηση της θερμοκρασίας. Σε επιπλέον έρευνες που διεξήχθησαν (Maulu et al. 2021), φαίνεται πως η άνοδος αυτή μπορεί να επιταχύνει τον ρυθμό αναπαραγωγής, όπως και την μολυσματικότητα καθώς και την διάρκεια ζωής των παθογόνων του νερού, αυξάνοντας τις απειλές για τους θαλάσσιους οργανισμούς (Marcogliese 2008). Το γεγονός αυτό στην περίπτωση της υδατοκαλλιέργειας θα οδηγήσει σε μειωμένα οικονομικά κέρδη και θα επηρεάσει την βιωσιμότητα της. Αντίθετα, οι ασθένειες των ψυχρών νερών ενδέχεται να εκλείψουν σταδιακά λόγω της αλλαγής των συνθηκών, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στο να ευδοκιμήσουν είδη που ζουν εκεί (Sae-Lim et al. 2017). Πρόσφατο παράδειγμα των επιπτώσεων αυτών αποτελεί η περίπτωση της Χιλής όπου λόγω της εξάπλωσης ειδών όπως *Pseudochattonella cf. verruculosa* και *Alexandrium catenella*, εμφανίστηκε μια μεγάλη απώλεια ψαριών που συνδέθηκε με τις κλιματικά επαγόμενες αλλαγές στους θαλάσσιους υδροβιότοπους (Trainer et al. 2020). Η κλιματική αλλαγή ωστόσο, δεν επηρεάζει μόνο την θερμοκρασία, αλλά αλλάζει και τα πρότυπα των βροχοπτώσεων σε διάφορους γεωγραφικούς τόπους, προκαλώντας προβλήματα στους υδρόβιους οργανισμούς που ζουν εκεί (Maulu et al. 2021). Ένας επίσης σημαντικός περιοριστικός παράγοντας για την θαλάσσια ζωή είναι τα επίπεδα O₂ στις θαλάσσιες δεξαμενές τα οποία επηρεάζουν τον μεταβολισμό των ψαριών. Με την αύξηση της θερμοκρασίας έχει φανεί πως αυξάνεται και ο ρυθμός κατανάλωσης O₂ (Remen et al. 2015).

2. ΣΚΟΠΟΣ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης διαφορετικών συνθηκών εκτροφής, ειδικότερα της θερμοκρασίας και της διαφορετικής διατροφής με χρήση κωπήποδων και τροχοζώων, στην ανάπτυξη του πεπτικού συστήματος του είδους *S. dumerili*. Η μελέτη της ανάπτυξης του πεπτικού συστήματος πραγματοποιείται μέσω ανάλυσης της γονιδιακής έκφρασης επιλεγμένων πεπτικών ενζύμων σε δείγματα από

διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια με την χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR). Απώτερος σκοπός της μελέτης είναι ο εντοπισμός των βέλτιστων συνθηκών εκτροφής που προάγουν την ομαλή και γρήγορη οντογένεση και φυσιολογική λειτουργία του πεπτικού συστήματος του είδους *S. dumerili* με στόχο την βελτιστοποίηση της παραγωγικότητας και της υγείας του στο πλαίσιο της εντατικής υδατοκαλλιέργειας του.

3. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης πεπτικών ενζύμων σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του πεπτικού συστήματος στο μαγιάτικο πραγματοποιήθηκε σε δείγματα των οποίων η εκτροφή έλαβε χώρα σε εγκαταστάσεις του Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιέργειας στο Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ, Κρήτη, Ελλάδα). Τα δείγματα που παραλήφθηκαν προέρχονταν από 4 διαφορετικούς συνδυασμούς συνθηκών εκτροφής. Οι παράμετροι που αναλύθηκαν ήταν η θερμοκρασία και η διατροφή. Επιλέχθηκαν δύο διαφορετικές θερμοκρασίες εκτροφής, 20 και 24°C και δύο διαφορετικοί τύποι ζωντανής τροφής (κωπήποδα (C) και τροχόζωα (R)). Οι 4 πειραματικές ομάδες που δημιουργήθηκαν ήταν οι: (20C, 20R, 24C, 24R). Για την εξαγωγή έγκυρων αποτελεσμάτων λήφθηκαν δείγματα από μέλη του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης έτσι ώστε να δημιουργηθεί μία σφαιρική εικόνα της οντογένεσης του πεπτικού συστήματος καθ' όλη την διάρκεια της προνυμφικής ανάπτυξης του μαγιάτικου. Για την χαρτογράφηση της οντογένεσης του πεπτικού συστήματος λήφθηκαν δείγματα κατά την προνυμφική ανάπτυξη τα οποία προέρχονταν από τρία διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Συγκεκριμένα, τα στάδια αυτά είναι η έναρξη της εξωγενούς τροφοληψίας (FF), η κάμψη της νωτοχορδής (FL) και το τέλος της προνυμφικής ανάπτυξης (ELR). Η τελευταία δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στο μέσο της μεταμόρφωσης (MM). Όλα τα δείγματα αποθηκεύτηκαν κατάλληλα σε υδατικό διάλυμα σταθεροποίησης RNA στους -20°C.

3.2 Εξαγωγή RNA και σύνθεση cDNA

Η απομόνωση του RNA από τα δείγματα *S. dumerili* έγινε από μέλη του Εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με την χρήση του E.Z.N.A.[®] Total RNA Kit I (Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA, Cat. No: R6834-02) σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Το kit αυτό, χρησιμοποιείται για την απομόνωση RNA μέγιστης ποσότητας 100μg από ιστούς ή κύτταρα ευκαρυωτών, με σκοπό την περαιτέρω χρήση του σε αναλύσεις όπως η RT-PCR και η Western Blot. Παράλληλα, χρησιμοποιήθηκε και DNA-free DNA Removal kit (Invitrogen, Waltham, MA, USA, Cat. No: AM1906), για την απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων γενωμικού DNA από τα δείγματα. Έπειτα, έγινε η σύνθεση του cDNA με την χρήση του High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, Cat no: 4374966) μαζί με 1μg ολικού RNA που είχε επεξεργαστεί με DNAάσες και έναν συνδυασμό διάφορων ολιγονουκλεοτιδίων και εκκινητών. Τα δείγματα cDNA που συντέθηκαν αραιώθηκαν σε 1:20 και αποθηκεύτηκαν στους -80°C μέχρι να αποψυχθούν για χρήση.

3.3 RT-PCR

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των πεπτικών ενζύμων στα δείγματα γίνεται μέσω της χρήσης real- time PCR. Η real- time PCR είναι μία ποσοτική αντίδραση που επιτυγχάνει την ποσοτικοποίηση νουκλεϊκών οξέων σε πραγματικό χρόνο (Arya 2005). Κύριο συστατικό της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης είναι η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιώντας DNA ως υπόστρωμα παράγει πολλαπλά αντίγραφα ενός προκαθορισμένου τμήματος του. Τα οριοθετημένα τμήματα DNA που θα πολλαπλασιαστούν εξαρτώνται από τους εκκινητές που θα χρησιμοποιηθούν. Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτιδικά τμήματα DNA τα οποία είναι συμπληρωματικά και αντιπαράλληλα αλληλουχιών DNA που θέλουμε να ενισχυθούν. Στην περίπτωση αυτή, τα τμήματα DNA που μας ενδιέφερε να ενισχυθούν ήταν αλληλουχίες των εννέα (9) πεπτικών ενζύμων που αναλύθηκαν έτσι ώστε να μελετηθεί η διαφορά στα επίπεδα έκφρασής τους μεταξύ των διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης. Με την χρήση του προγράμματος PrimerBlast δημιουργήθηκαν τα κατάλληλα ζεύγη εκκινητών (Πίνακας 2).

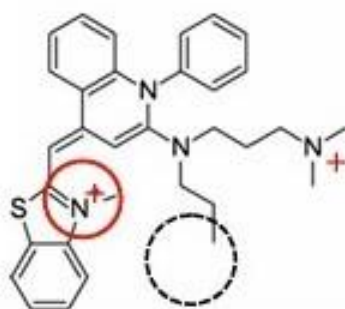
Πίνακας 2: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της έκφρασης των γονιδίων ενδιαφέροντος. Τα γονίδια με αστερίσκο αποτελούν πρότερα δεδομένα του εργαστηρίου Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας

Όνομα γονιδίου	Ensembl ID του γονιδίου	Εμπρόσθιος εκκινητής	Οπίσθιος εκκινητής	Μέγεθος προϊόντος (bp)
<i>Amyl</i> (αμυλάση)	ENSSDUG00000009412	TCCATCTGGGAAGGGTAACTG	ACGAAAACGAAAGCATTGCC	145
<i>Chym</i> (χυμοθρυψίνη)	ENSSDUG00000008088	GTTCAAGCATCCCCGCTACA	CATGCCTCCAGGGAAGTTGT	139
<i>Pepsin</i> (πεψίνη)	ENSSDUG00000009527	AGGTTTAACCCAGCACGAG	CACTGTGTCGTATGCGAGGA	105
<i>Alph</i> (αλκαλική φωσφατάση)	ENSSDUG00000006624	GTTCAGCCCAATCTCCACCA	AGACTGGTTTCTCCCTGA	131
<i>Alaami_1</i> (αλανυλ-αμινοπεπτιδάση 1)	ENSSDUG00000002571	TGAAGAAAGTCAGGGTGGAGC	CCCGGTGGTGGTATCTATGG	127
<i>Alaami_2</i> (αλανυλ-αμινοπεπτιδάση 2)	ENSSDUG00000008006	CACCGTGGCTTTTGAACAGG	TTTGCTCGGACGAAGTTCCA	139
<i>PAL*</i> (πεψίνη τύπου A)	ENSSDUG00000008954	TTTGCTGTGTGTAGGATGC	CGTTGGTCATGCCCTCAGTA	150
<i>T3L*</i> (θρυψίνη τύπου 3)	ENSSDUG00000014978	GTCCGCCAACGGCAACTT	ATTACACACCAGAGGACCACC	178
<i>AT1L*</i> (ανιονική θρυψίνη 1)	ENSSDUG00000009575	CCCGTCACCGTGAACCAATA	AGGGTAGGAGGCATCACAGT	183

Η RT-PCR χρειάζεται εκτός από την DNA-πολυμεράση και τους εκάστοτε κάθε φορά εκκινητές, ένα ρυθμιστικό διάλυμα και δεοξυριβονουκλεοτίδια τα οποία προσθέτει κατά την επιμήκυνση των πρωταρχικών τμημάτων η DNA-πολυμεράση. Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι υπεύθυνο για την διατήρηση του pH της αντίδρασης σταθερό έτσι ώστε να μην επηρεάζεται η δραστικότητα της πολυμεράσης από τις αυξομειώσεις του. Η ποσοτική PCR έχει ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό το οποίο είναι ότι καθιστά δυνατή την παρακολούθηση της αντίδρασης σε πραγματικό χρόνο. Αυτό γίνεται εφικτό διότι χρησιμοποιείται πέραν των άλλων συστατικών και μία φθορίζουσα χρωστική που έχει την ικανότητα επιλεκτικής πρόσδεσης μονάχα σε δίκλωνο DNA, η οποία ονομάζεται SYBER GREEN (Εικόνα 9). Η

χρωστική αυτή, συνδέεται μη-ειδικά στο δίκλωνο DNA, δηλαδή δεν απαιτείται ειδικά αλληλουχία DNA για να μπορέσει να δεσμευτεί (Dragan et al. 2012). Το σήμα του φθορισμού της ενισχύεται σημαντικά μετά την πρόσδεση στο δίκλωνο τμήμα. Ο φθορισμός που εκπέμπεται είναι ανάλογος με την ποσότητα του DNA που ενισχύεται στα δείγματα και η σχέση της αναλογίας τους θα αναλυθεί στην συνέχεια (Dragan et al. 2012). Η ελεύθερη χρωστική έχει μικρό φθορισμό ενώ μετά την σύνδεσή της με το δίκλωνο DNA αλλάζει η στερεοδιάταξη του μορίου και ο φθορισμός αυξάνεται στα 525nm κατά προσέγγιση (Dragan et al. 2012). Η ανίχνευση του φθορισμού γίνεται με την χρήση θερμοκυκλοποιητή του οποίου η βασική λειτουργία είναι η αυξομείωση της θερμοκρασίας για την πραγματοποίηση της αντίδρασης. Τέλος, χρησιμοποιείται κατάλληλο λογισμικό το οποίο μετατρέπει τα δεδομένα του θερμοκυκλοποιητή σε καμπύλες ενίσχυσης της αντίδρασης (Arya 2005).

SYBR Green I (SG)



Εικόνα 9: Χημική δομή του μορίου της SYBR Green (Dragan et al. 2012).

3.3.1 Πρωτόκολλο της RT-PCR

Οι αντιδράσεις του συγκεκριμένου πειράματος έλαβαν χώρα στο μηχάνημα StepOnePlus της εταιρίας Applied Biosystems. Η διαδικασία διεξαγωγής της κάθε αντίδρασης στο μηχάνημα αυτό περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια:

1. Αποδιάταξη των δίκλωνων τμημάτων που πραγματοποιείται με αύξηση της θερμοκρασίας στους 95°C για 5'.
2. 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού όπου κάθε κύκλος διαρκεί 20'' στους 95°C για την υβριδοποίηση των εκκινητών και άλλα 20'' στους 60°C.
3. Δημιουργία καμπύλης διαχωρισμού (melting curve) που περιλαμβάνει 15'' στους 95°C και 60'' στους 50°C. Στόχος της καμπύλης αυτής είναι ο έλεγχος της

ανεπιθύμητης ενίσχυσης επιπλέον τμημάτων που θα οδηγήσει στον σχηματισμό παραπροϊόντων και διμερών εκκινητών.

Ο τελικός όγκος της κάθε αντίδρασης είναι τα 10μl και περιλαμβάνονται σε αυτά 2μl cDNA και 8μl Master Mix. Το Master Mix περιέχει 5 μl SYBR Green I, κατάλληλη συγκέντρωση εκκινητών και H₂O έτσι ώστε η τελική ποσότητα να φτάνει τα 8 μl. Οι κατάλληλες συγκεντρώσεις εκκινητών για το κάθε γονίδιο (Πίνακας 3) βρέθηκαν μετά από δοκιμές και επιλέχθηκαν διότι εμφάνιζαν τα καλύτερα efficiencies.

Πίνακας 3: Συγκεντρώσεις εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Όνομα γονιδίου	Συγκέντρωση εμπρόσθιου εκκινητή	Συγκέντρωση οπίσθιου εκκινητή
<i>elf1</i>	200nM	200nM
<i>rps18</i>	200nM	200nM
<i>rpl13</i>	300nM	300nM
<i>fau</i>	250nM	250nM
<i>Amyl</i>	200nM	200nM
<i>Chym</i>	300nM	300nM
<i>Pepsin</i>	250nM	250nM
<i>Alph</i>	200nM	200nM
<i>Alaami_2</i>	250nM	250nM
<i>PAL</i>	350nM	350nM
<i>T3L</i>	200nM	200nM
<i>AT1L</i>	200nM	200nM

3.3.2 Ιδιοστατικά γονίδια (housekeeping genes)

Λόγω μικρών διαφορών που υπάρχουν στις αρχικές ποσότητες των RNA που απομονώνονται από τα δείγματα, άρα του cDNA που συντίθεται και άλλες που δημιουργούνται κατά την PCR εμφανίζονται συστηματικά σφαλματα στο πείραμα, τα οποία αντιμετωπίζονται με την διαδικασία της κανονικοποίησης. Η διαδικασία αυτή βασίζεται σε γονίδια των οποίων η έκφραση παραμένει σταθερή και τα ποσοστά έκφρασής τους είναι υψηλά στα δείγματα μας. Τα γονίδια αυτά καλούνται ιδιοστατικά και εμφανίζουν χαρακτηριστικά σταθερή έκφραση μεταξύ των ιστών του οργανισμού (Arya et al., 2005). Στην διαδικασία της κανονικοποίησης

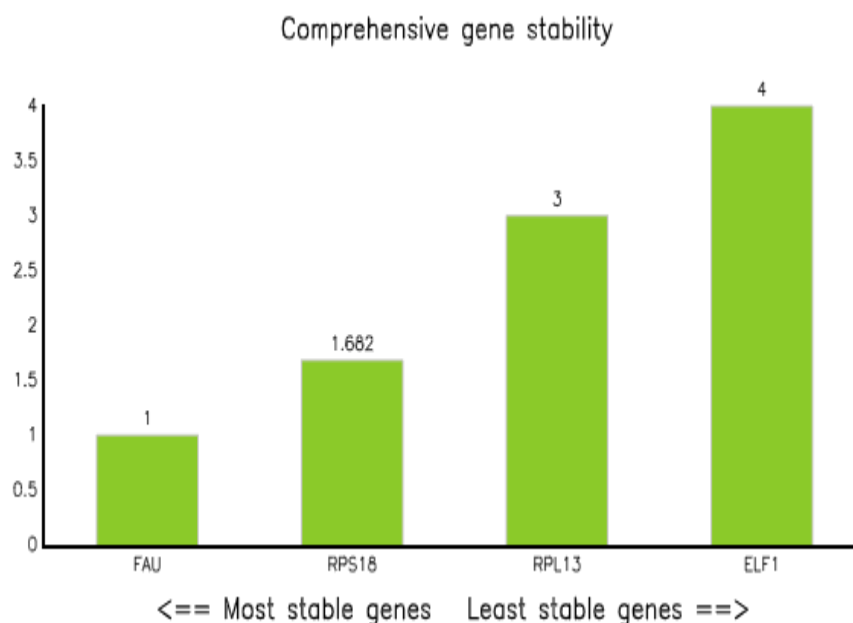
λαμβάνουν μέρος διάφορα ιδιοστατικά γονίδια περισσότερα του ενός με σκοπό την ακριβή μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των υπο μελέτη γονιδίων (Vandesompele et al. 2002). Στην συγκεκριμένη περίπτωση τα ιδιοστατικά γονίδια τα οποία χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4. Αλληλουχίες εκκινητών των ιδιοστατικών γονιδίων που χρησιμοποιήθηκαν

Όνομα γονιδίου	Ensembl ID του γονιδίου	Εμπρόσθιος εκκινητής	Οπίσθιος εκκινητής	Μέγεθος προϊόντος
<i>elf1</i> (Elongation factor 1-alpha)	ENSSDUG00000008198	CACCCCAAGTTCGTCAAGTC	GACCAAGGGGAGCGTAGTTG	100bp
<i>rps18</i> (Ribosomal protein S18)	ENSSDUG00000012209	ATCGCCTTCGCCATCACTG	GCTCCCCAGCCCTCTTGTTG	100bp
<i>rpl13</i> (Ribosomal protein L13a)	ENSSDUG00000001262	TTGCCCCACAAAACCAAGAG	GGACAACCATGCGCTTCCTC	100bp
<i>Fau</i> (FAU ubiquitin like and ribosomal protein S30 fusion a)	ENSSDUG00000009474	TGAGGGGACAGACACCCAAG	ACGTTCACAAAGCGCCTGTT	100bp

3.3.2.1 Επιλογή ιδιοστατικών γονιδίων

Με την χρήση της πλατφόρμας ReFinder δημιουργήθηκε το παρακάτω διάγραμμα, στο οποίο εμφανίζεται η συνολική σταθερότητα των πιθανών ιδιοστατικών γονιδίων.



Σύμφωνα με το γράφημα παρατηρείται πως τα πιο σταθερά γονίδια που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως ιδιοστατικά είναι τα *fau*, *rps18*, *rpl13*, καθώς εμφανίζουν τους μεγαλύτερους συντελεστές σταθερότητας της γονιδιακής έκφρασης με τιμές 1, 1.682 και 3 αντίστοιχα.

3.3.3 Υπολογισμός αρχικής ποσότητας μεταγράφων στα δείγματα

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η RT-PCR εκπέμπει φθορισμό ανάλογο με την ποσότητα του cDNA που ενισχύθηκε. Για να υπολογιστεί η αρχική ποσότητα mRNA που περιέχεται στο κάθε δείγμα πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Πρώτο βήμα της ποσοτικοποίησης είναι ο υπολογισμός του αρχικού φθορισμού και άρα της αρχικής ποσότητας mRNA των δειγμάτων. Ο υπολογισμός αυτός εφαρμόζεται και στα γονίδια που εξετάζονται αλλά και στα ιδιοστατικά που χρησιμοποιούνται και γίνεται σύμφωνα με τον τύπο $R_0 = R_{Ct} / (E+1)^{Ct}$, όπου R_{Ct} συμβολίζεται το threshold, το οποίο στην συγκεκριμένη μελέτη, έχει οριστεί στην τιμή **50,000**, E δηλώνεται η απόδοση (efficiency) και το Ct αντιπροσωπεύει τον αριθμό κύκλων που χρειάζεται το κάθε δείγμα για να φτάσει το κοινό για όλες τις αντιδράσεις κατώφλι (threshold, **50,000**) (Cikoš, Bukovská, and Koppel 2007). Δεύτερο βήμα, έρχεται ο υπολογισμός του συντελεστή κανονικοποίησης (normalization factor ή NF) ο οποίος υπολογίζεται με βάση τον γεωμετρικό μέσο των ιδιοστατικών γονιδίων. Η έκφραση των ιδιοστατικών γονιδίων δεν θα πρέπει να εμφανίζει μεγάλες διακυμάνσεις για να υπάρχει όσο το δυνατόν μεγαλύτερη αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Τελευταίο βήμα

είναι η κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με την διαίρεση του R_0 των γονιδίων ενδιαφέροντος προς τον NF.

3.4 Στατιστική Ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με την βοήθεια της γλώσσας προγραμματισμού R και του Rstudio. Η R είναι μια γλώσσα ανοικτού κώδικα και διαθέτει περιβάλλον το οποίο παρέχει στον χρήστη την δυνατότητα να χρησιμοποιεί υπολογιστική στατιστική και να κατασκευάζει γραφήματα (R core Team, 2020).

Με την βοήθεια του προγράμματος αυτού πραγματοποιήθηκαν ο υπολογισμός των ελάχιστων, μέγιστων, μέσων, διαμέσων και οι τυπικές αποκλίσεις για κάθε μέτρηση, ενώ ελέγχθηκε και η κανονική κατανομή των δεδομένων με την χρήση του Shapiro-Wilk test. Το τεστ αυτό, ελέγχει την προσαρμογή ενός τυχαίου δείγματος στην κανονική κατανομή. Φάνηκε πως όλα τα δεδομένα ακολουθούν μη κανονική κατανομή. Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε Kruskal-Wallis test διότι τα δεδομένα έχουν μικρό όγκο και μη-κανονική κατανομή όπως αναφέρθηκε. Με το τεστ αυτό, ελέγχεται εάν τουλάχιστον μία ομάδα των αποτελεσμάτων διαφέρει στατιστικά σημαντικά από τις υπόλοιπες ως προς την διάμεσό τους. Έπειτα, συγκρίθηκαν όλα τα πιθανά ζεύγη των δεδομένων ανά group (20C, 20R, 24C, 24R) και ανά αναπτυξιακό στάδιο (FL, ELR, MM) με Pairwise Wilcox test για να ελεγχθεί εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Περαιτέρω, δημιουργήθηκαν τα correlation plots ανά group και αναπτυξιακό στάδιο και τα boxplots.

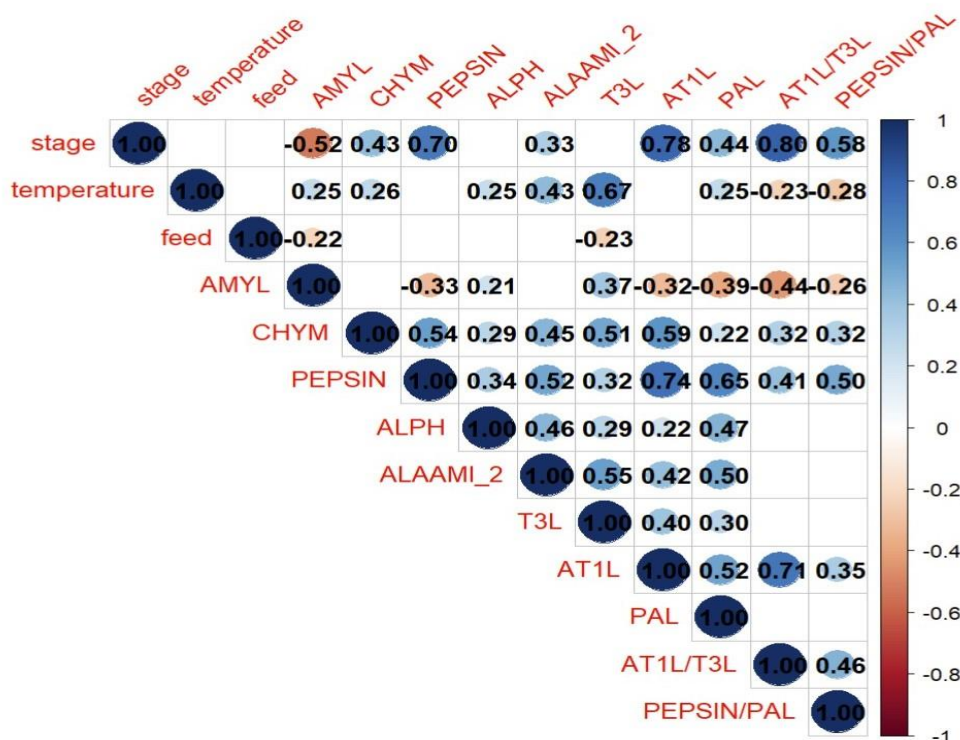
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Διάγραμμα συσχέτισης

Από το διάγραμμα συσχέτισης φαίνεται πως τα γονίδια *PEPSIN*, *AT1L* και οι λόγοι των παραλόγων πεψίνης και θρυψίνης (*AT1L/ T3L*, *PEPSIN/PAL*) έχουν ισχυρή θετική συσχέτιση με το αναπτυξιακό στάδιο. Για τα γονίδια *CHYM*, *ALAAMI_2*, *PAL* φαίνεται πως εμφανίζεται μέτρια θετική συσχέτιση. Επίσης, παρατηρείται πως η *AMYL* εμφανίζει μέτρια αρνητική συσχέτιση με την ανάπτυξη. Τέλος, τα γονίδια *ALPH*, *T3L* δεν εμφανίζουν γραμμική συσχέτιση της έκφρασής τους με την ανάπτυξη.

Για τα γονίδια *ALAAMI_2*, *T3L* εμφανίζεται μέτρια θετική συσχέτιση με την θερμοκρασία ενώ για όλα τα υπόλοιπα γονίδια εμφανίζεται χαμηλή συσχέτιση είτε θετική (*AMYL*, *CHYM*, *ALPH*, *PAL*) είτε αρνητική για τους λόγους των παραλόγων πεψίνης και θρυψίνης (*PEPSIN/PAL*, *AT1L/ T3L*). Για την *PEPSIN* και την *AT1L* δεν φαίνεται να υπάρχει καμία γραμμική συσχέτιση μεταξύ της έκφρασής τους και της θερμοκρασίας.

Όσον αφορά την τροφή με την οποία έγινε η εκτροφή, φαίνεται να υπάρχει χαμηλή αρνητική συσχέτιση στις περιπτώσεις των γονιδίων *AMYL* και *T3L*, ενώ όλα τα άλλα γονίδια δεν εμφανίζουν γραμμική συσχέτιση της έκφρασής τους με την τροφή εκτροφής.

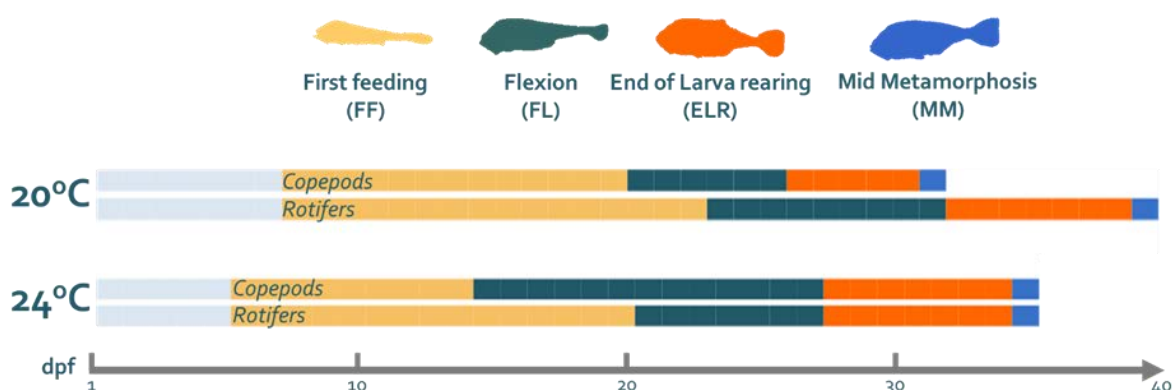


Εικόνα 10: Διάγραμμα συσχέτισης όπου απεικονίζονται οι συντελεστές συσχέτισης *R*. Ο συντελεστής συσχέτισης *R* δείχνει τον βαθμό και την κατεύθυνση της γραμμικής σχέσης μεταξύ 2 μεταβλητών. Τιμές κοντά στο +1, με σκούρο μπλε χρώμα δηλώνουν θετική γραμμική συσχέτιση, με αύξηση της μίας μεταβλητής, εμφανίζεται αύξηση και της άλλης.

Τιμές κοντά στο 0 δηλώνουν ότι υπάρχει αδύναμη ή ανύπαρκτη γραμμική συσχέτιση μεταξύ των δύο μεταβλητών. Τιμές κοντά στο -1 δηλώνουν ισχυρή αρνητική γραμμική συσχέτιση, με αύξηση των τιμών της μίας, σημειώνεται μείωση των τιμών της άλλης μεταβλητής. Με αύξηση της διαμέτρου του κύκλου αυξάνεται και η στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των τιμών που συγκρίνονται. Με χρώμα υποδηλώνεται η θετική συσχέτιση ενώ με κόκκινο η αρνητική. Με άσπρο φαίνονται οι μη-στατιστικά σημαντικές διαφορές.

4.2 Επίδραση διατροφής και θερμοκρασίας στην ανάπτυξη του *S. dumerili*

Φαίνεται πως τόσο η θερμοκρασία όσο και η διατροφή επηρέασαν την ανάπτυξη και το ρυθμό μετάβασης των προνυμφών *S. dumerili* στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο (Εικόνα 11). Ο ταχύτερος ρυθμός ανάπτυξης με την μεταμόρφωση να ξεκινά την 32^η dpf παρατηρήθηκε σε προνύμφες, οι οποίες εκκολάφθηκαν στους 20 °C και η εκτροφή τους έγινε με κωπήποδα, ενώ η πιο αργή ανάπτυξη παρατηρήθηκε σε προνύμφες εκκόλαψης των 20 °C που τράφηκαν με τροχόζωα με το στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης να ξεκινά την 40^η dpf. Οι ομάδες προνυμφών εκκόλαψης στους 24°C και για τις δύο τροφές πραγματοποίησαν την μετάβαση στο στάδιο της μεταμόρφωσης την ίδια ημέρα (35^η).

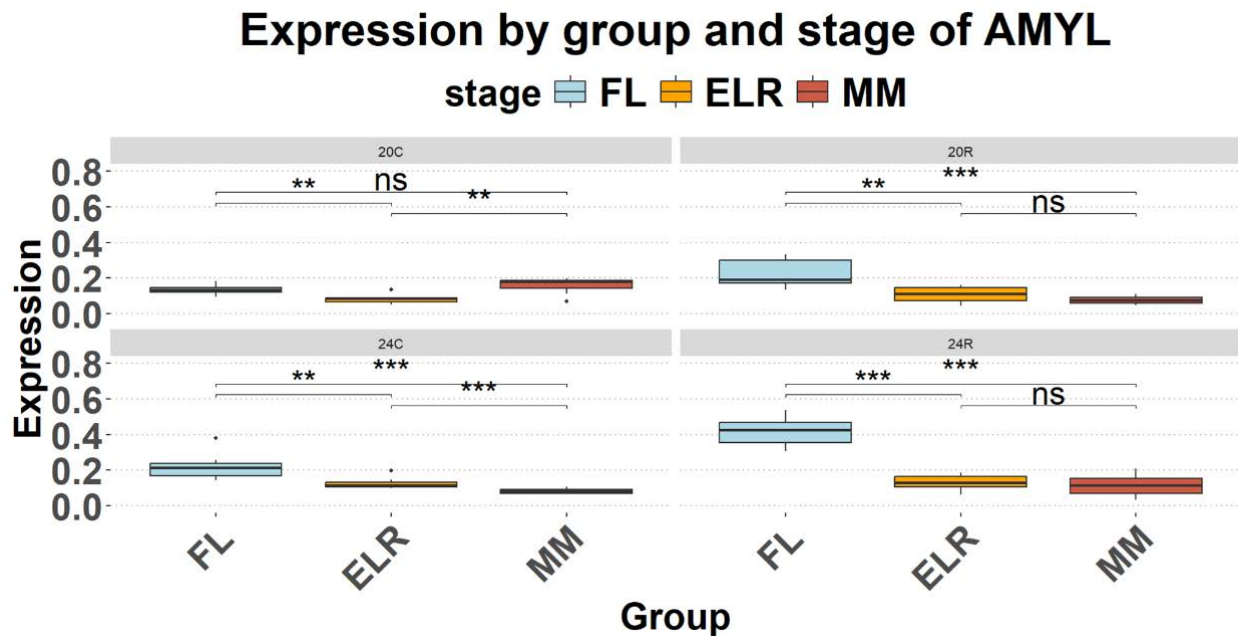


Εικόνα 11: Ημέρες μετάβασης αναπτυξιακών σταδίων ανά γκρουπ εκτροφής (Angelakopoulos et al., 2025 in preparation).

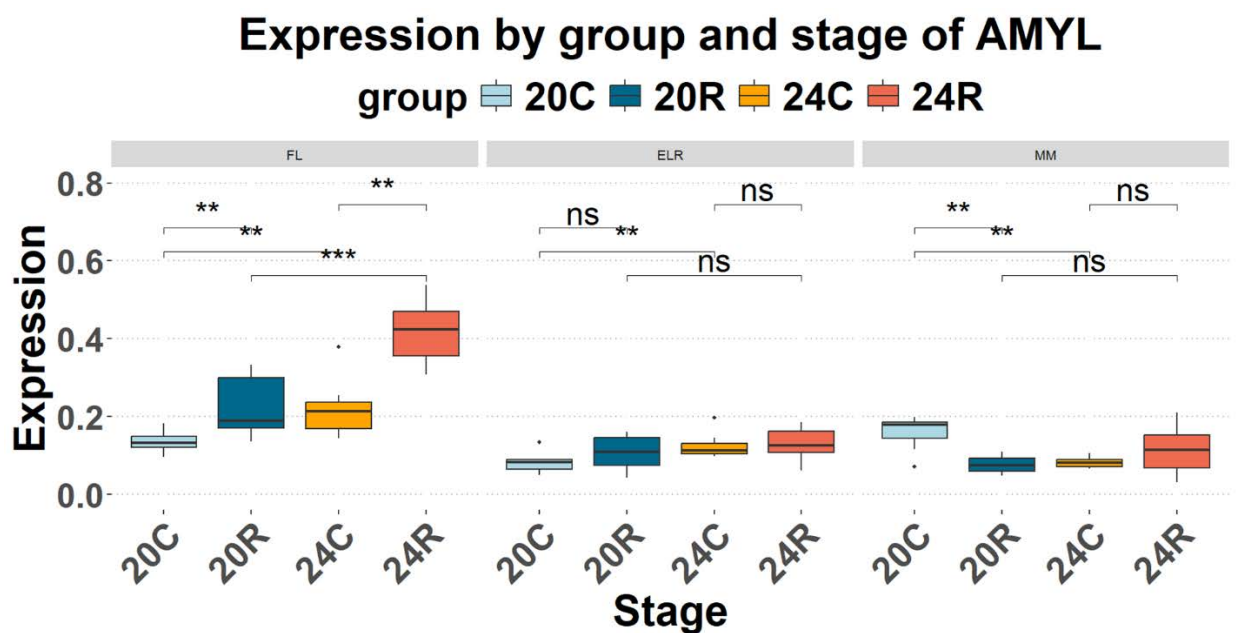
4.3 Αμυλία

Σε όλες τις ομάδες προνυμφών, η μεγαλύτερη έκφραση της αμυλίας παρατηρήθηκε στο στάδιο FL με τα επίπεδα έκφρασης σε αυτό το στάδιο να είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερα από τα υπόλοιπα στάδια, με εξαίρεση την ομάδα 20C που παρουσίασε ίδια έκφραση αμυλίας στο στάδιο ανάπτυξης FL και MM (Εικόνα 12). Σε όλες τις υπόλοιπες ομάδες, η έκφραση της αμυλίας μειώθηκε καθώς η ανάπτυξη προχωρούσε.

Η εκτροφή με τροχόζωα οδήγησε σε υψηλότερη έκφραση αμυλάσης στο στάδιο FL και στις δύο θερμοκρασίες, ενώ η ομάδα 24R εμφάνισε και τη μέγιστη έκφραση αμυλάσης σε αυτό το στάδιο (Εικόνα 13). Μέχρι το στάδιο της MM, η ομάδα 20C παρουσίασε τα ίδια επίπεδα έκφρασης αμυλάσης με την ομάδα 24R.



Εικόνα 12: Διαγράμματα τύπου boxplots αναπτυξιακών σταδίων ανά γκρουπ της έκφρασης του γονιδίου της αμυλάσης. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns>0,05$, $*<0,01$, $**<0,001$, $***<0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το FL στάδιο ανάπτυξης, με μουσταρδί το ELR και με κεραμιδί το στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (MM). Τα 4 group που φαίνονται είναι το 20C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 20R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με τροχόζωα), 24C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 24R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με τροχόζωα).

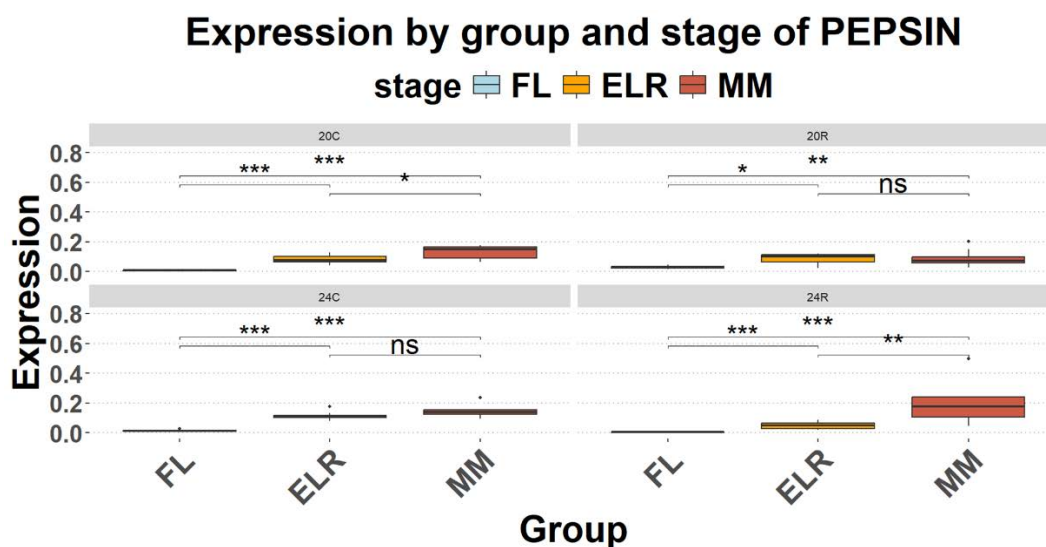


Εικόνα 13: Διαγράμματα τύπου boxplots ομάδων εκτροφής ανά στάδιο ανάπτυξης της έκφρασης του γονιδίου της αμυλάσης. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns>0,05$, $*<0,01$, $**<0,001$, $***<0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το γκρουπ προνυμφών που τράφηκαν με κωπήποδα και εκκολάφθηκαν στους 20°C, με μπλε το γκρουπ που τράφηκε με τροχόζωα και οι προνύμφες του εκκολάφθηκαν στους 20°C, με πορτοκαλί το γκρουπ των 24°C τα άτομα του οποίου τράφηκαν με κωπήποδα και τέλος με κοραλλί φαίνονται οι προνύμφες εκκόλαψης στους 24°C με τροφή ανάπτυξης τα τροχόζωα.

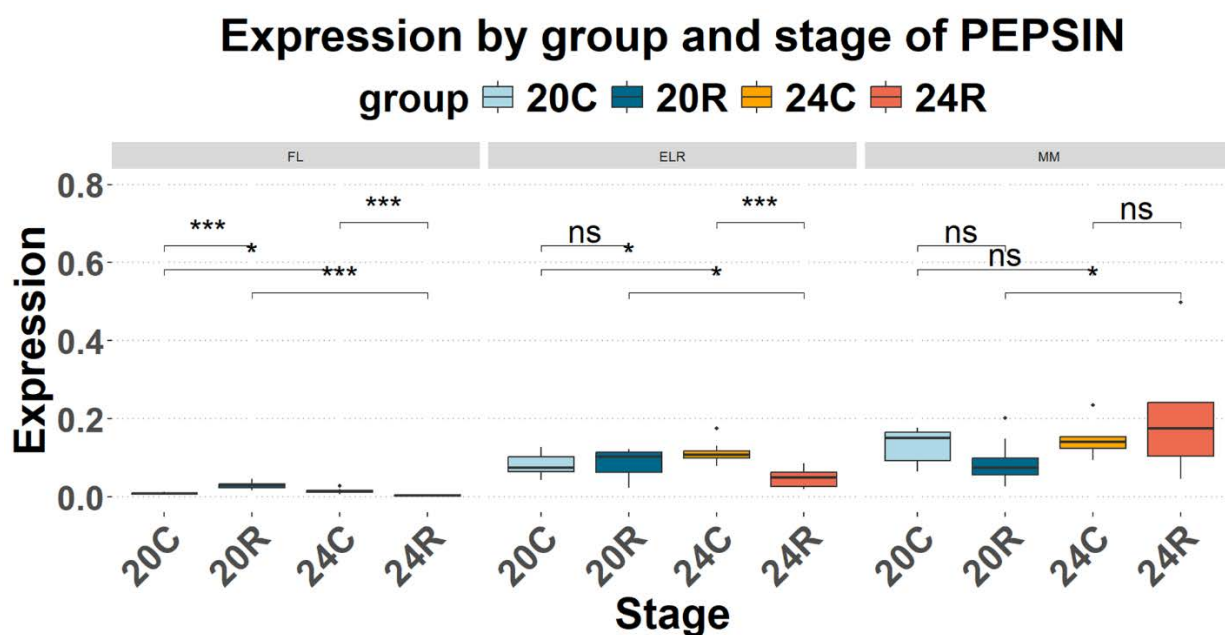
4.4 Πεψίνη

Στην ομάδα των 20R, φαίνεται απότομη αύξηση της έκφρασης της πεψίνης μεταξύ των FL & ELR σταδίων με την μεγαλύτερη τιμή να επιτυγχάνεται στο ELR, ενώ στις υπόλοιπες υπάρχει σταδιακή αύξηση της έκφρασης. Στο FL στάδιο όλων των ομάδων η έκφραση του γονιδίου είναι μηδενική (Εικόνα 14).

Στα γκρουπ των 20°C μεγαλύτερη τιμή έκφρασης εμφανίζει η ομάδα R, ενώ στα γκρουπ των 24°C μεγαλύτερη τιμή εμφανίζει η ομάδα των C (Εικόνα 15). Στην ομάδα 20R η έκφραση του γονιδίου της πεψίνης μειώνεται στο MM στάδιο. Η ομάδα 24R φαίνεται να έχει απότομη αύξηση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της πεψίνης σε αυτό το στάδιο με την τιμή της να ξεπερνά όλα τα άλλα γκρουπ (Εικόνα 15).



Εικόνα 14: Διαγράμματα τύπου boxplots αναπτυξιακών σταδίων ανά γκρουπ της έκφρασης του γονιδίου της πεψίνης. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns>0,05$, $*<0,01$, $**<0,001$, $***<0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το FL στάδιο ανάπτυξης, με μουςταρντί το ELR και με κεραμιδί το στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (MM). Τα 4 group που φαίνονται είναι το 20C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 20R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με τροχόζωα), 24C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 24R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με τροχόζωα).



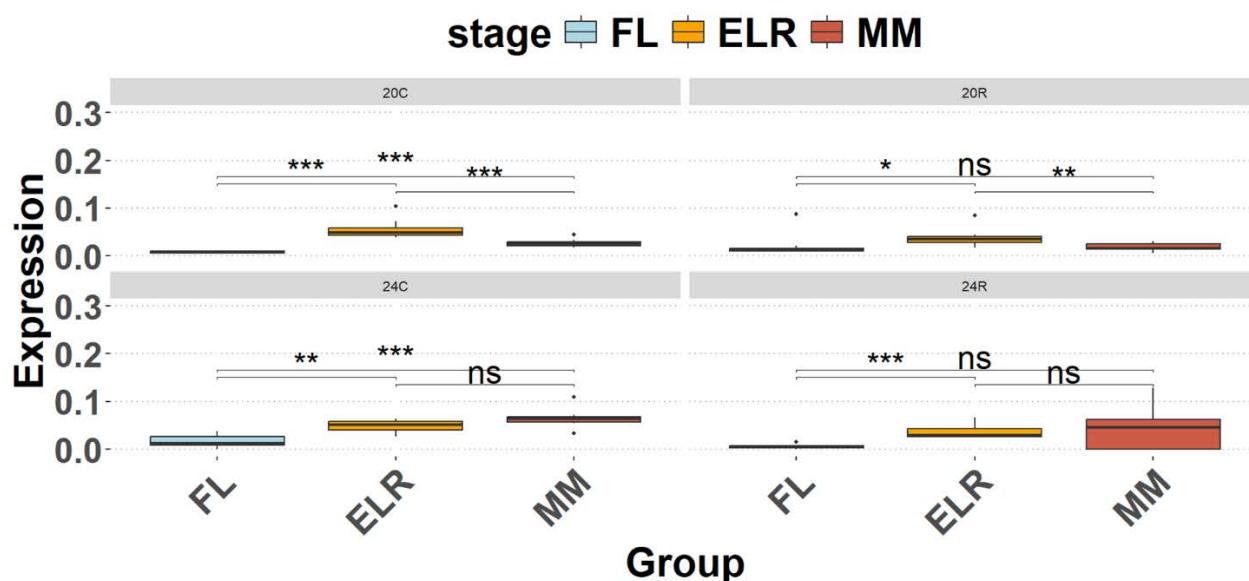
Εικόνα 15: Διαγράμματα τύπου boxplots ομάδων εκτροφής ανά στάδιο ανάπτυξης της έκφρασης του γονιδίου της πεψίνης. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns > 0,05$, $* < 0,01$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το γκρουπ προνυμφών που τράφηκαν με κωπήποδα και εκκολάφθηκαν στους 20°C, με μπλε το γκρουπ που τράφηκε με τροχόζωα και οι προνύμφες του εκκολάφθηκαν στους 20°C, με πορτοκαλί το γκρουπ των 24°C τα άτομα του οποίου τράφηκαν με κωπήποδα και τέλος με κοραλλί φαίνονται οι προνύμφες εκκόλαψης στους 24°C με τροφή ανάπτυξης τα τροχόζωα.

4.5 Πεψίνη τύπου A

Στα γκρουπ των 20°C φαίνεται να εμφανίζεται μέγιστο στα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στο ELR στάδιο, ενώ στο MM οι τιμές έκφρασης μειώνονται. Στα γκρουπ των 24°C παρατηρείται διαφορετικό μοτίβο στην έκφραση με σταδιακή αύξηση. Στο γκρουπ των 24C επιτυγχάνεται η μέγιστη τιμή έκφρασης όλων των γκρουπ στο MM στάδιο (Εικόνα 16).

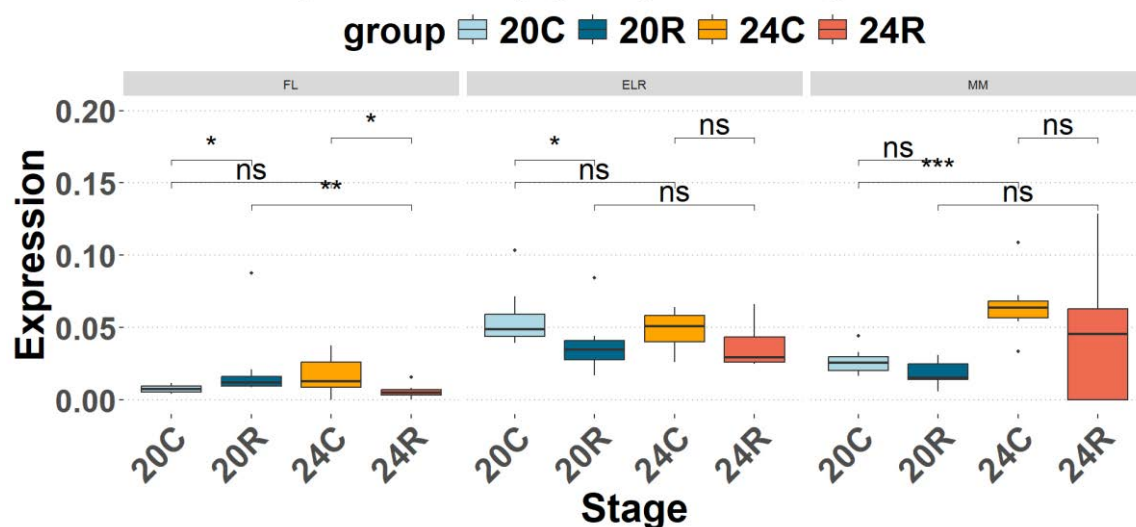
Στο στάδιο FL εμφανίζονται τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της πεψίνης τύπου A, με σχεδόν μηδενικές τιμές. Στο επόμενο στάδιο, ELR, παρατηρείται μία τάση να υπερσχύουν σε έκφραση τα γκρουπ που τράφηκαν με κωπήποδα. Τέλος, στο MM στάδιο φαίνεται τα γκρουπ των 20°C να μειώνουν την έκφρασή τους, ενώ αντίθετα αυτά των 24°C να την αυξάνουν ακόμη περισσότερο. Στο γκρουπ 24R εμφανίζεται πολύ μεγάλο εύρος τιμών (Εικόνα 17).

Expression by group and stage of PAL



Εικόνα 16: Διαγράμματα τύπου boxplots αναπτυξιακών σταδίων ανά γκρουπ της έκφρασης του γονιδίου της πεψίνης τύπου A. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns > 0,05$, $* < 0,01$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το FL στάδιο ανάπτυξης, με μουσταρδί το ELR και με κεραμιδί το στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (MM). Τα 4 group που φαίνονται είναι το 20C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 20R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με τροχόζωα), 24C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 24R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με τροχόζωα).

Expression by group and stage of PAL

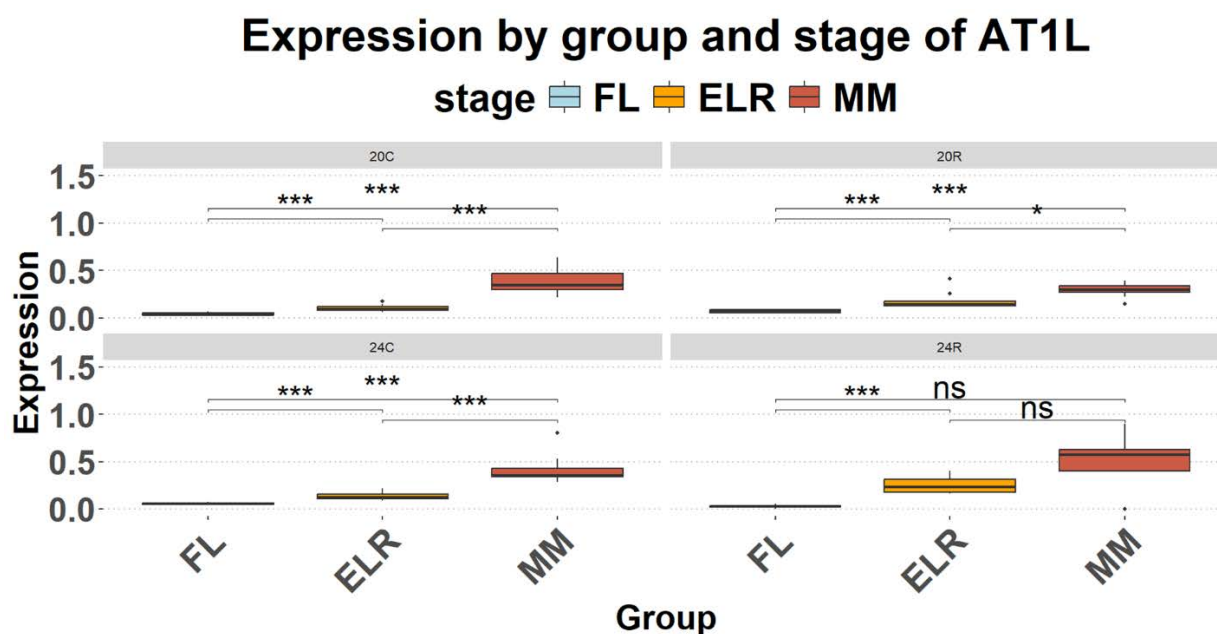


Εικόνα 17: Διαγράμματα τύπου boxplots ομάδων εκτροφής ανά στάδιο ανάπτυξης της έκφρασης του γονιδίου της πεψίνης τύπου A. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns > 0,05$, $* < 0,01$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το γκρουπ προνυμφών που τράφηκαν με κωπήποδα και εκκολάφθηκαν στους 20°C, με μπλε το γκρουπ που τράφηκε με τροχόζωα και οι προνύμφες του εκκολάφθηκαν στους 20°C, με πορτοκαλί το γκρουπ των 24°C τα άτομα του οποίου τράφηκαν με κωπήποδα και τέλος με κοραλλί φαίνονται οι προνύμφες εκκόλαψης στους 24°C με τροφή ανάπτυξης τα τροχόζωα.

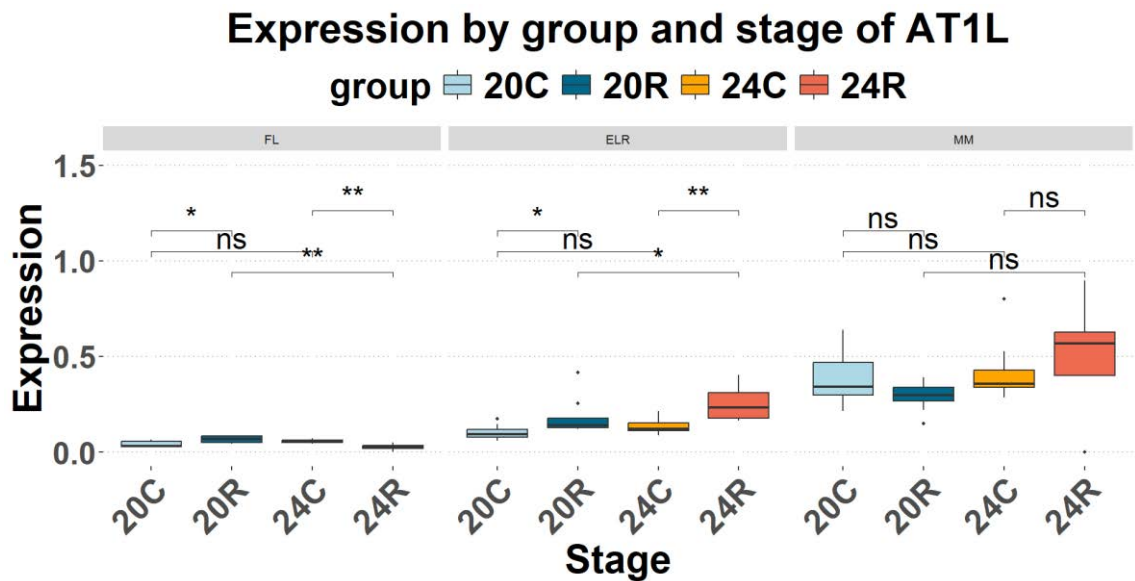
4.6 Ανιονική θρυψίνη 1

Σε όλα τα γκρουπ εκτροφής παρατηρείται σταδιακή αύξηση της έκφρασης με την πάροδο της ανάπτυξης. Στο γκρουπ των 20C φαίνεται απότομη αύξηση της έκφρασης στο στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (Εικόνα 18).

Στο FL στάδιο παρατηρούνται σχεδόν μηδενικές τιμές έκφρασης με την μεγαλύτερη τιμή να αντιστοιχεί στην ομάδα 20R. Τα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης στο στάδιο ELR σημειώνονται στην ομάδα 24R ενώ αμέσως μετά ακολουθεί η ομάδα 20R. Στο στάδιο MM, αυξάνεται σημαντικά η έκφραση. Στην ομάδα 20R σημειώνεται η μικρότερη αύξηση. Τα γκρουπ των 24°C εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης συγκριτικά με αυτά των 20°C (Εικόνα 19).



Εικόνα 18: Διαγράμματα τύπου boxplots αναπτυξιακών σταδίων ανά γκρουπ της έκφρασης του γονιδίου της ανιονικής θρυψίνης 1. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns > 0,05$, $* < 0,01$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το FL στάδιο ανάπτυξης, με μoustαρδί το ELR και με κεραμιδί το στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (MM). Τα 4 group που φαίνονται είναι το 20C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 20R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με τροχόζωα), 24C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 24R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με τροχόζωα).

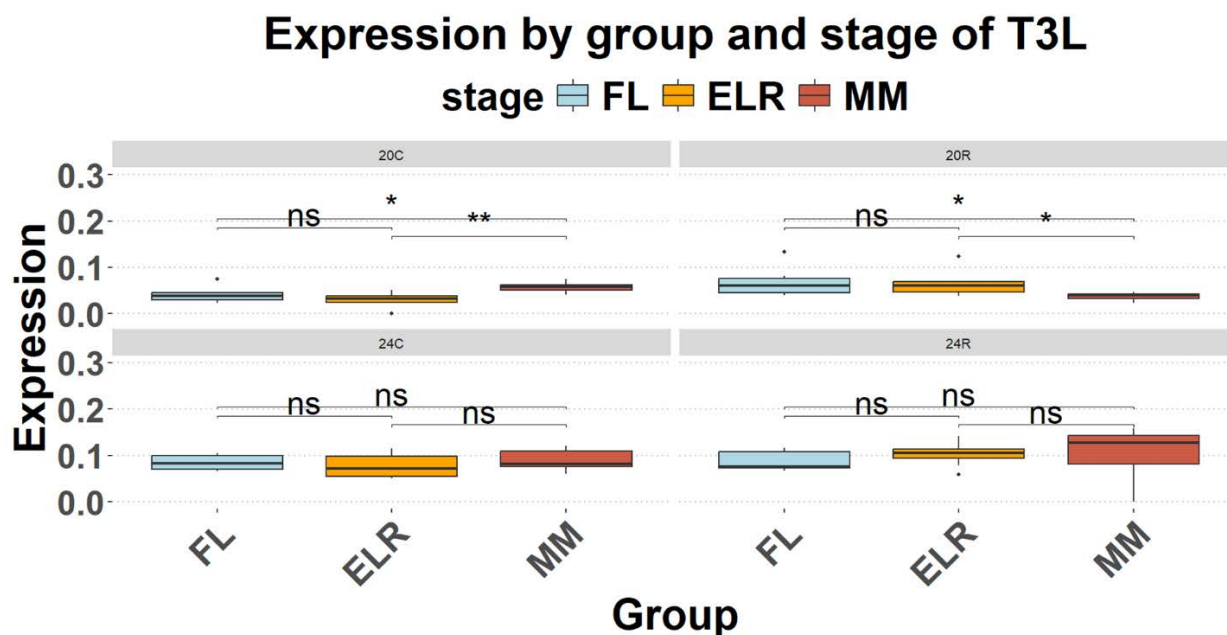


Εικόνα 19: Διαγράμματα τύπου boxplots ομάδων εκτροφής ανά στάδιο ανάπτυξης της έκφρασης του γονιδίου της ανιονικής θρυψίνης A. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns > 0,05$, $* < 0,01$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το γκρουπ προνυμίων που τράφηκαν με κωπήποδα και εκκολάφθηκαν στους 20°C, με μπλε το γκρουπ που τράφηκε με τροχόζωα και οι προνύμφες του εκκολάφθηκαν στους 20°C, με πορτοκαλί το γκρουπ των 24°C τα άτομα του οποίου τράφηκαν με κωπήποδα και τέλος με κοραλλί φαίνονται οι προνύμφες εκκόλαψης στους 24°C με τροφή ανάπτυξης τα τροχόζωα.

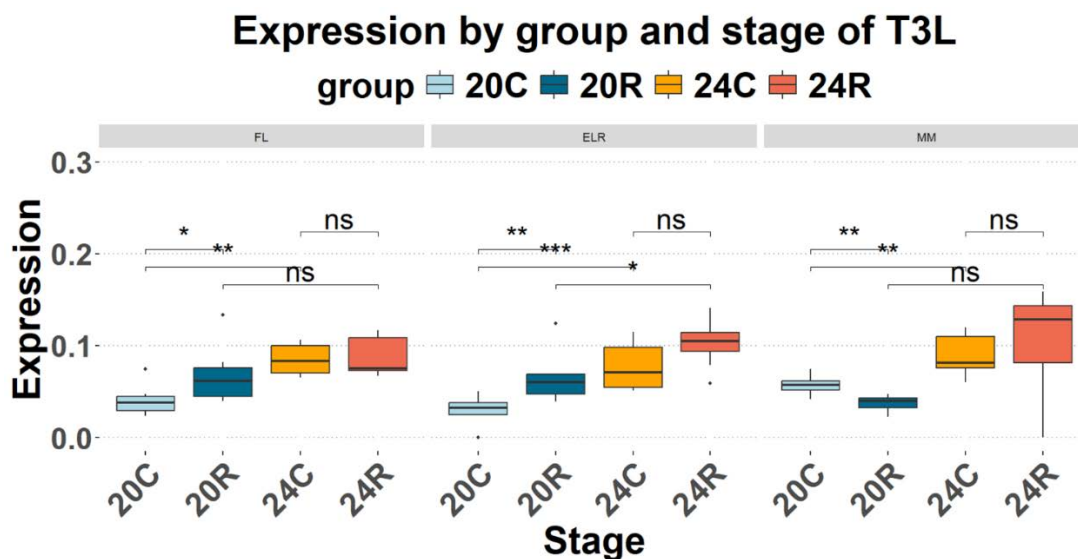
4.7 Θρυψίνη τύπου 3

Στους 24°C τα επίπεδα έκφρασης αν και χαμηλά είναι μεγαλύτερα από αυτά των 20°C. Στο γκρουπ των 20C φαίνεται πως η έκφραση μειώνεται ελάχιστα περνώντας από το FL στο ELR στάδιο και αυξάνεται ξανά στο MM σε τιμές μεγαλύτερες από τις αρχικές. Η έκφραση στο γκρουπ των 20R φαίνεται να παρουσιάζει σταδιακή μείωση, αντίθετα με το γκρουπ των 24R που παρατηρείται σταδιακή αύξηση των επιπέδων έκφρασης με την τιμή της έκφρασης του σταδίου MM να αποτελεί και την υψηλότερη μεταξύ όλων των τιμών (Εικόνα 20).

Στο στάδιο FL η μεγαλύτερη τιμή των επιπέδων έκφρασης εμφανίζεται στο γκρουπ 24C. Στο επόμενο στάδιο, ELR, η έκφραση στο γκρουπ των 24R αυξάνεται και ξεπερνά αυτή των 24C. Τέλος, στο στάδιο MM φαίνεται πως η έκφραση αυξάνεται σε όλα τα γκρουπ εκτός από το γκρουπ 20R όπου μειώνεται. Το γκρουπ 24R έχει και σε αυτό το στάδιο την μεγαλύτερη έκφραση (Εικόνα 21).



Εικόνα 20: Διαγράμματα τύπου boxplots αναπτυξιακών σταδίων ανά γκρουπ της έκφρασης του γονιδίου της θρυψίνης τύπου 3. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns>0,05$, $*<0,01$, $**<0,001$, $***<0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το FL στάδιο ανάπτυξης, με μουσταρδί το ELR και με κεραμιδί το στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (MM). Τα 4 group που φαίνονται είναι το 20C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 20R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με τροχόζωα), 24C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 24R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με τροχόζωα).

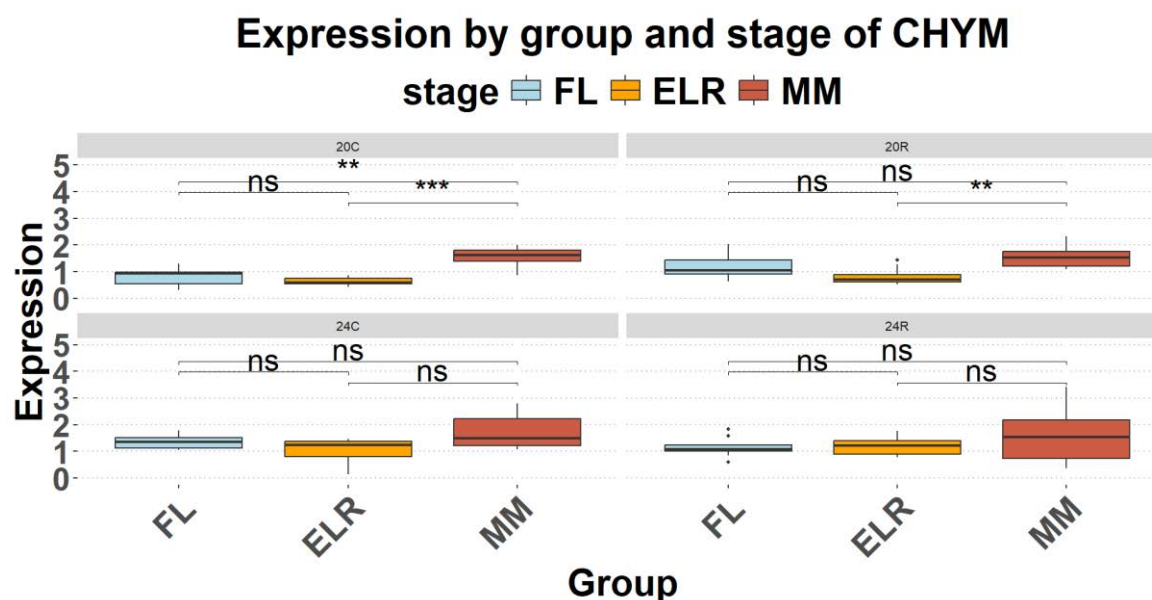


Εικόνα 21: Διαγράμματα τύπου boxplots ομάδων εκτροφής ανά στάδιο ανάπτυξης της έκφρασης του γονιδίου της θρυψίνης τύπου 3. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns>0,05$, $*<0,01$, $**<0,001$, $***<0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το γκρουπ προνυμφών που τράφηκαν με κωπήποδα και εκκολάφθηκαν στους 20°C, με μπλε το γκρουπ που τράφηκε με τροχόζωα και οι προνύμφες του εκκολάφθηκαν στους 20°C, με πορτοκαλί το γκρουπ των 24°C τα άτομα του οποίου τράφηκαν με κωπήποδα και τέλος με κοραλλί φαίνονται οι προνύμφες εκκόλαψης στους 24°C με τροφή ανάπτυξης τα τροχόζωα.

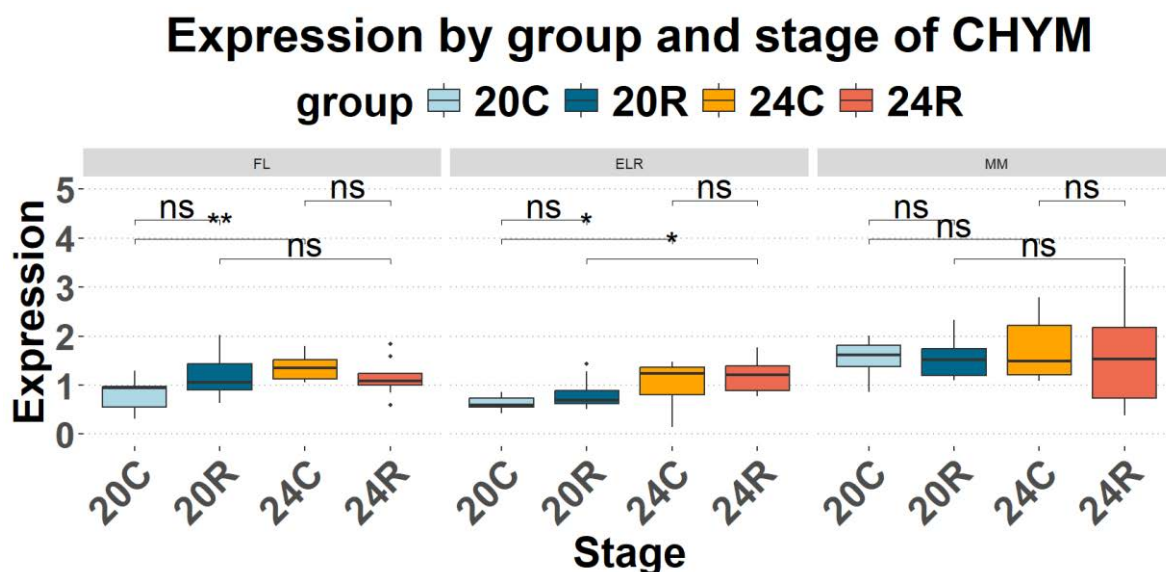
4.8 Χυμοθρυψίνη

Στο στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης φαίνεται να αυξάνεται η έκφραση του γονιδίου συγκριτικά με τα προηγούμενα στάδια. Οι πιο έντονες διαφορές μεταξύ των σταδίων ELR & MM παρατηρούνται στις ομάδες ανάπτυξης των 20 °C. Επίσης, φαίνεται πως στις ομάδες των 20 °C η έκφραση του γονιδίου μειώνεται στο δεύτερο αναπτυξιακό στάδιο, ELR και αυξάνεται ξανά στο στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (Εικόνα 22).

Στο FL στάδιο, μεταξύ των θερμοκρασιακών γκρουπ των 20°C μεγαλύτερη έκφραση παρουσιάζει το R γκρουπ, ενώ μεταξύ των θερμοκρασιακών γκρουπ των 24°C μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης εμφανίζονται στο C γκρουπ. Συγκριτικά, τα γκρουπ που αναπτύχθηκαν στους 24°C έχουν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης όπως και στο στάδιο ELR. Στο MM στάδιο όλα τα γκρουπ έχουν παρόμοια έκφραση (Εικόνα 23).



Εικόνα 22: Διαγράμματα τύπου boxplots αναπτυξιακών σταδίων ανά γκρουπ της έκφρασης του γονιδίου της χυμοθρυψίνης. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns > 0,05$, $* < 0,01$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το FL στάδιο ανάπτυξης, με μουσταρδί το ELR και με κεραμιδί το στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (MM). Τα 4 group που φαίνονται είναι το 20C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 20R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με τροχόζωα), 24C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 24R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με τροχόζωα).



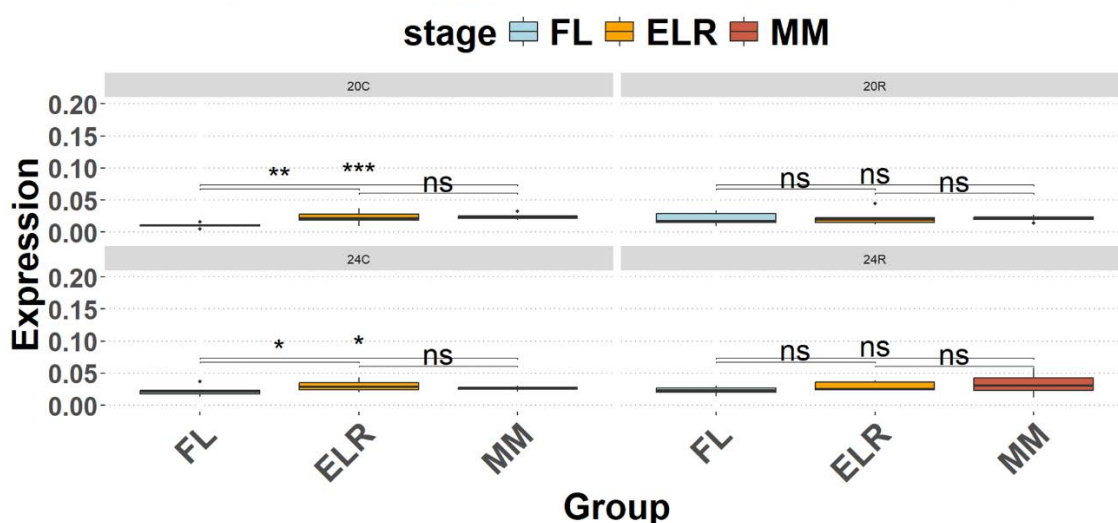
Εικόνα 23: Διαγράμματα τύπου boxplots ομάδων εκτροφής ανά στάδιο ανάπτυξης της έκφρασης του γονιδίου της χυμοθρυψίνης. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns>0,05$, $*<0,01$, $**<0,001$, $***<0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το γκρουπ προνυμφών που τράφηκαν με κωπήποδα και εκκολάφθηκαν στους 20°C, με μπλε το γκρουπ που τράφηκε με τροχόζωα και οι προνύμφες του εκκολάφθηκαν στους 20°C, με πορτοκαλί το γκρουπ των 24°C τα άτομα του οποίου τράφηκαν με κωπήποδα και τέλος με κοραλλί φαίνονται οι προνύμφες εκκόλαψης στους 24°C με τροφή ανάπτυξης τα τροχόζωα.

4.9 Αλανυλ-αμινοπεπτιδάση 2

Στα γκρουπ που τράφηκαν με κωπήποδα φαίνεται να παρουσιάζεται ένα κοινό μοτίβο, στο FL στάδιο η έκφραση είναι χαμηλή και μετά σχεδόν σταθεροποιείται στα δύο επόμενα στάδια. Στα γκρουπ που τράφηκαν με τροχόζωα στους 20°C υπάρχει παρόμοια έκφραση σε όλα τα στάδια σε μέτρια επίπεδα, με την μεγαλύτερη τιμή να παρατηρείται στο FL, ενώ στους 24°C το στάδιο FL εμφανίζει τα χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης (Εικόνα 24).

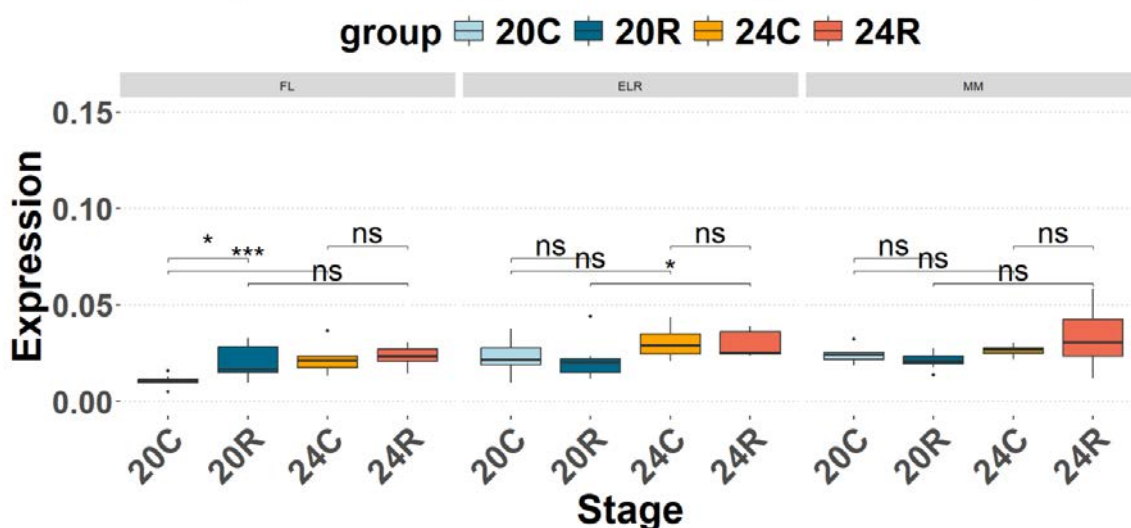
Οι ομάδες των 24°C εμφανίζουν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης από αυτές των 20°C, ενώ επίσης και οι προνύμφες εκτροφής με τροχόζωα εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τις ομάδες εκτροφής με κωπήποδα. Στο στάδιο ELR μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σημειώνονται στην ομάδα των 24C. Στο στάδιο MM τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου σε όλα τα γκρουπ παραμένουν σχεδόν σταθερά εκτός από την ομάδα 24R όπου η έκφραση αυξάνεται (Εικόνα 25).

Expression by group and stage of ALAAMI_2



Εικόνα 24: Διαγράμματα τύπου boxplots αναπτυξιακών σταδίων ανά γκρουπ της έκφρασης του γονιδίου της αλανυλαμινοπεπτιδάσης 2. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns > 0,05$, $* < 0,01$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το FL στάδιο ανάπτυξης, με μουσταρδί το ELR και με κεραμιδί το στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (MM). Τα 4 group που φαίνονται είναι το 20C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 20R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με τροχόζωα), 24C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 24R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με τροχόζωα).

Expression by group and stage of ALAAMI_2

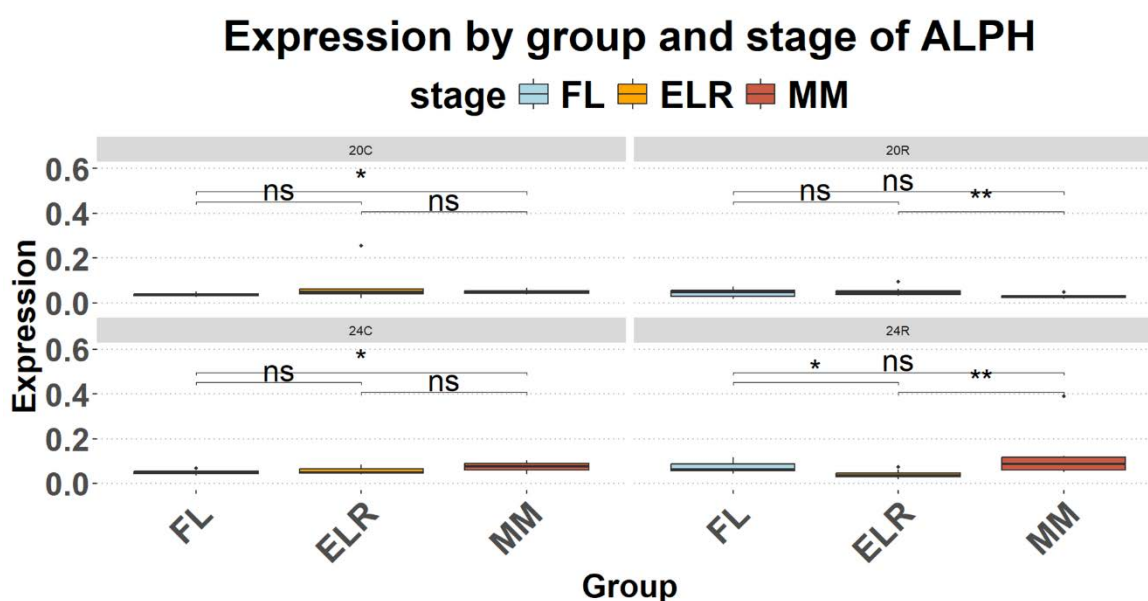


Εικόνα 25: Διαγράμματα τύπου boxplots ομάδων εκτροφής ανά στάδιο ανάπτυξης της έκφρασης του γονιδίου της αλανυλαμινοπεπτιδάσης 2. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns > 0,05$, $* < 0,01$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το γκρουπ προνυμφών που τράφηκαν με κωπήποδα και εκκολάφθηκαν στους 20°C, με μπλε το γκρουπ που τράφηκε με τροχόζωα και οι προνύμφες του εκκολάφθηκαν στους 20°C, με πορτοκαλί το γκρουπ των 24°C τα άτομα του οποίου τράφηκαν με κωπήποδα και τέλος με κοραλλί φαίνονται οι προνύμφες εκκόλαψης στους 24°C με τροφή ανάπτυξης τα τροχόζωα.

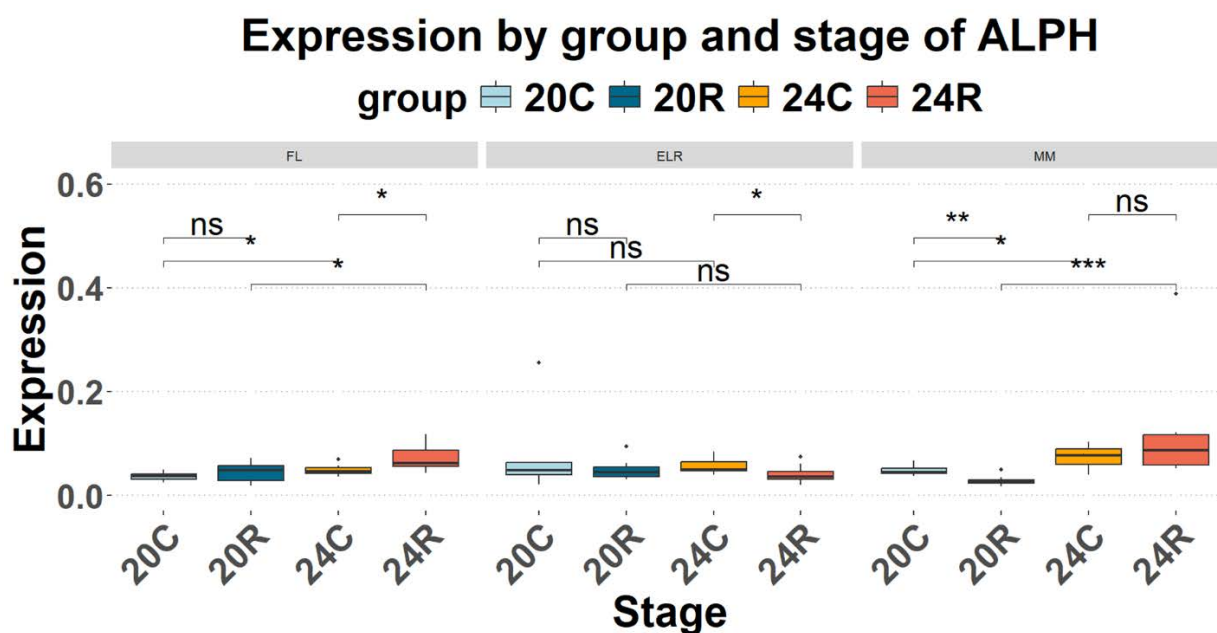
4.10 Αλκαλική φωσφατάση

Τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της αλκαλικής φωσφατάσης φαίνεται να είναι σχεδόν μηδενικά καθ' όλη την διάρκεια της ανάπτυξης. Το γκρουπ των 24R εμφανίζει την μεγαλύτερη έκφραση συγκριτικά με τα υπόλοιπα στο στάδιο του FL αλλά τα επίπεδα έκφρασης σε αυτό το γκρουπ στο επόμενο στάδιο, ELR, μειώνονται πιο χαμηλά από οποιοδήποτε άλλο και η έκφραση αυξάνεται ξανά στην υψηλότερη τιμή της στο τελευταίο στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (Εικόνα 26).

Παρατηρείται πως τα γκρουπ R έχουν χαμηλότερη έκφραση από τα C στο στάδιο FL, όπως και στο ELR. Στο MM στάδιο φαίνεται πως για τις ομάδες των 24°C η έκφραση είναι μεγαλύτερη από τα αντίστοιχα γκρουπ των 20°C, με την ομάδα των τροχόζων να ξεπερνά αυτή των κωπήποδων (Εικόνα 27).



Εικόνα 26: Διαγράμματα τύπου boxplots αναπτυξιακών σταδίων ανά γκρουπ της έκφρασης του γονιδίου της αλκαλικής φωσφατάσης. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns>0,05$, $*<0,01$, $**<0,001$, $***<0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το FL στάδιο ανάπτυξης, με μουσταρδί το ELR και με κεραμιδί το στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (MM). Τα 4 group που φαίνονται είναι το 20C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 20R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με τροχόζωα), 24C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 24R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με τροχόζωα).



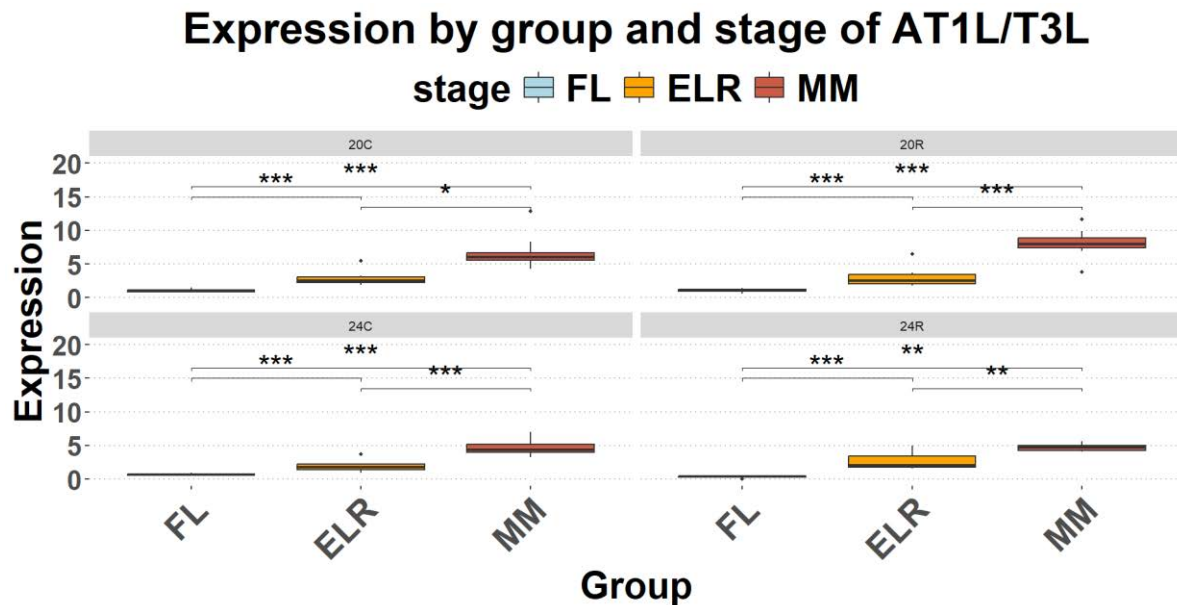
Εικόνα 27: Διαγράμματα τύπου boxplots ομάδων εκτροφής ανά στάδιο ανάπτυξης της έκφρασης του γονιδίου της αλκαλικής φωσφατάσης. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns > 0,05$, $* < 0,01$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το γκρουπ προνυμφών που τράφηκαν με κωπήποδα και εκκολάφθηκαν στους 20°C, με μπλε το γκρουπ που τράφηκε με τροχόζωα και οι προνύμφες του εκκολάφθηκαν στους 20°C, με πορτοκαλί το γκρουπ των 24°C τα άτομα του οποίου τράφηκαν με κωπήποδα και τέλος με κοραλλί φαίνονται οι προνύμφες εκκόλαψης στους 24°C με τροφή ανάπτυξης τα τροχόζωα.

4.11 Αναλογία γονιδιακής έκφρασης ανιονικής θρυψίνης 1/ θρυψίνης τύπου 3

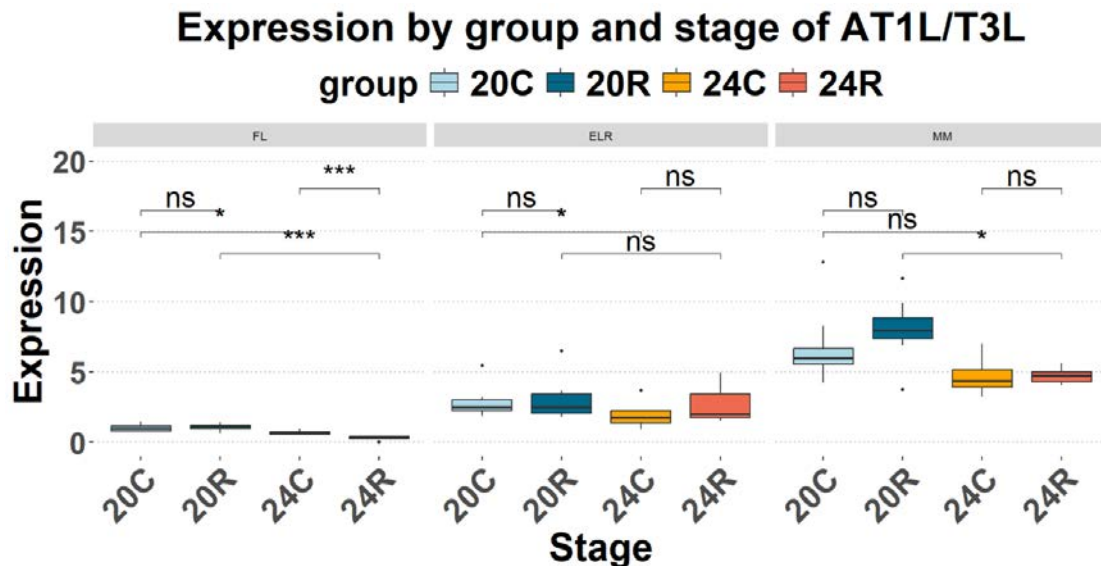
Σε όλα τα γκρουπ καλλιέργειας φαίνεται πως ο λόγος αυξάνεται σταδιακά ολοένα και περισσότερο, με τις αναλογίες στους 20°C να είναι μεγαλύτερες από αυτές στους 24°C. Στους 20°C η αναλογία στο στάδιο FL είναι ίση με 1, δηλαδή σε αυτό το στάδιο τα δύο γονίδια εκφράζονται στον ίδιο βαθμό. Όσο προχωρά η ανάπτυξη ο λόγος αυξάνεται δηλώνοντας πως το γονίδιο της ανιονικής θρυψίνης 1 εκφράζεται σε μεγαλύτερο βαθμό. Στο γκρουπ των 20R φαίνεται πως ο λόγος γίνεται σχεδόν δεκαπλάσιος στο στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης και ξεπερνά κατά πολύ αυτόν του αντίστοιχου σταδίου στο γκρουπ 20C. Για τα γκρουπ των 24°C φαίνεται πως ο λόγος στο αρχικό στάδιο FL είναι σχεδόν μηδενικός δηλώνοντας πως το γονίδιο της ανιονικής θρυψίνης 1 έχει πολύ χαμηλή έκφραση (Εικόνα 28).

Οι ομάδες των 20°C εμφανίζουν πανομοιότυπες τιμές του λόγου. Περνώντας στο στάδιο ELR, οι τιμές των λόγων έκφρασης των δύο γονιδίων αυξάνονται σε όλες τις πειραματικές ομάδες. Την μικρότερη αύξηση εμφανίζει η ομάδα των 24C, στην οποία τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων παραμένουν σε παρόμοια επίπεδα. Την πιο απότομη αλλαγή στην έκφραση

των δύο γονιδίων και συνεπώς στο πηλίκό έκφρασής τους εμφανίζει η ομάδα των 24R (Εικόνα 29).



Εικόνα 28: Διαγράμματα τύπου boxplots αναπτυξιακών σταδίων ανά γκρουπ της αναλογίας έκφρασης ανιονικής θρυψίνης 1/ θρυψίνης τύπου 3. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns>0,05$, $*<0,01$, $**<0,001$, $***<0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το FL στάδιο ανάπτυξης, με μουσταρδί το ELR και με κεραμιδί το στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (MM). Τα 4 group που φαίνονται είναι το 20C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 20R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με τροχόζωα), 24C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 24R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με τροχόζωα).

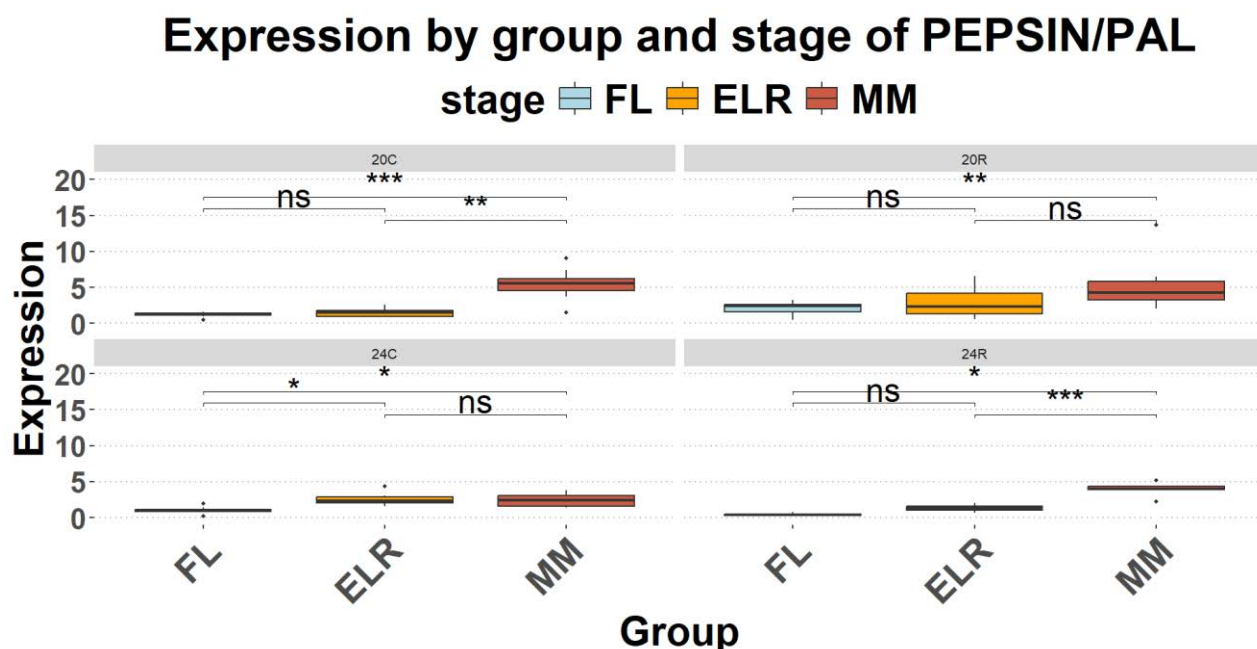


Εικόνα 29: Διαγράμματα τύπου boxplots ομάδων εκτροφής ανά στάδιο ανάπτυξης του λόγου της έκφρασης του γονιδίου της ανιονικής θρυψίνης Α/θρυψίνη τύπου 3. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns>0,05$, $*<0,01$, $**<0,001$, $***<0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το γκρουπ προνυμφών που τράφηκαν με κωπήποδα και εκκολάφθηκαν στους 20°C, με μπλε το γκρουπ που τράφηκε με τροχόζωα και οι προνύμφες του εκκολάφθηκαν στους 20°C, με πορτοκαλί το γκρουπ των 24°C τα άτομα του οποίου τράφηκαν με κωπήποδα και τέλος με κοραλλί φαίνονται οι προνύμφες εκκόλαψης στους 24°C με τροφή ανάπτυξης τα τροχόζωα.

4.12 Αναλογία γονιδιακής έκφρασης πεψίνης/ πεψίνης τύπου A

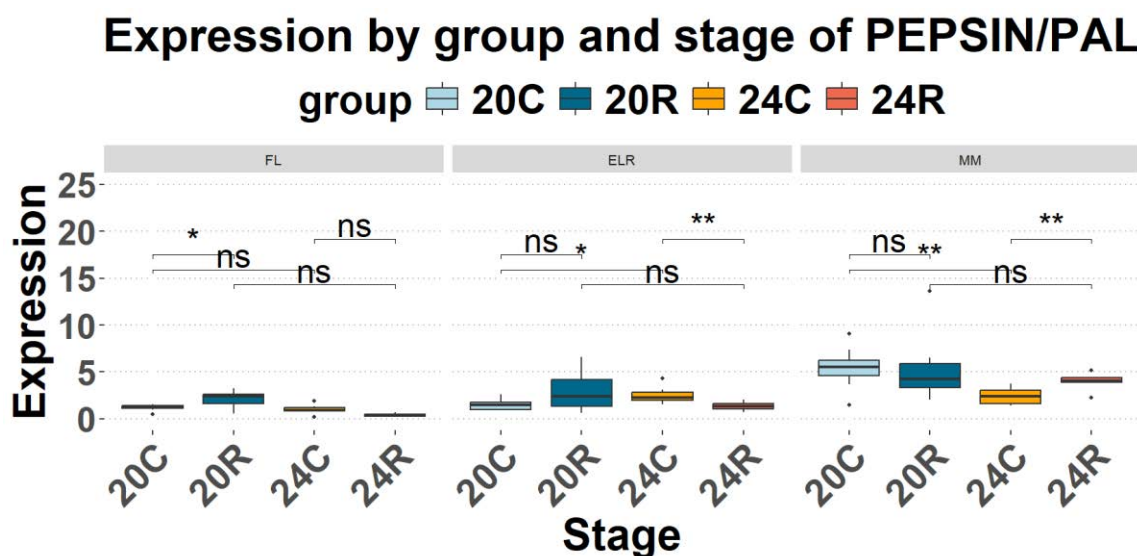
Στο γκρουπ των 20C εμφανίζεται παρόμοια έκφραση στα 2 πρώτα στάδια με τιμή του λόγου κοντά στο 1, δείχνοντας ότι τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων είναι παρόμοια, ενώ στο στάδιο MM φαίνεται απότομη αύξηση του λόγου. Στο γκρουπ των 20R παρατηρείται σταδιακή αύξηση στην τιμή των λόγων. Στα γκρουπ των 24°C παρατηρούνται χαμηλότερες τιμές του λόγου συγκριτικά με τους 20°C. Στην ομάδα των 24C φαίνεται πως ο λόγος της έκφρασης σταθεροποιείται, με ελάχιστη μείωση, στο στάδιο MM, ενώ στην ομάδα των 24R παρατηρείται σταδιακή αύξηση του λόγου (Εικόνα 30).

Στα στάδια FL και ELR, η μεγαλύτερη τιμή εμφανίζεται στο γκρουπ 20R, στο οποίο η έκφραση του PEPSIN υπερσχύει έναντι του PAL, ενώ η χαμηλότερη σε αυτό των 24R. Στο στάδιο ELR, οι λόγοι της έκφρασης των γονιδίων φαίνεται να αυξάνονται ελάχιστα. Οι τιμές του λόγου στα γκρουπ 20R, 24C έχουν παρόμοια τιμή ενώ επίσης και οι τιμές των ομάδων 20C, 24R εμφανίζουν ίδιο λόγο έκφρασης. Στο στάδιο MM φαίνεται ο λόγος στην ομάδα 24C να παραμένει συγκριτικά με τα προηγούμενα στάδια σχεδόν σταθερός ενώ σε όλες τις άλλες ομάδες η αναλογία έκφρασης αλλάζει σημαντικά. Ο λόγος αυξάνεται αρκετά στα γκρουπ 20C, 24R και ελάχιστα στο γκρουπ των 20R (Εικόνα 31).



Εικόνα 30: Διαγράμματα τύπου boxplots αναπτυξιακών σταδίων ανά γκρουπ της αναλογίας έκφρασης πεψίνης/ πεψίνης τύπου A. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns > 0,05$, $* < 0,01$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το FL στάδιο ανάπτυξης, με μουσταρδί το ELR και με κεραμιδί το στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης (MM). Τα 4 group που φαίνονται είναι το 20C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 20°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 20R (άτομα που εκκολάφθηκαν

στους 20°C και τράφηκαν με τροχόζωα), 24C (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με κωπήποδα), 24R (άτομα που εκκολάφθηκαν στους 24°C και τράφηκαν με τροχόζωα).



Εικόνα 31: Διαγράμματα τύπου boxplots ομάδων εκτροφής ανά στάδιο ανάπτυξης του λόγου της έκφρασης του γονιδίου της πεψίνης προς την πεψίνη τύπου A. Απεικονίζονται τα επίπεδα σημαντικότητας ($ns > 0,05$, $* < 0,01$, $** < 0,001$, $*** < 0,0001$). Με γαλάζιο φαίνεται το γκρουπ προνυμφών που τράφηκαν με κωπήποδα και εκκολάφθηκαν στους 20°C, με μπλε το γκρουπ που τράφηκε με τροχόζωα και οι προνύμφες του εκκολάφθηκαν στους 20°C, με πορτοκαλί το γκρουπ των 24°C τα άτομα του οποίου τράφηκαν με κωπήποδα και τέλος με κοραλλί φαίνονται οι προνύμφες εκκόλαψης στους 24°C με τροφή ανάπτυξης τα τροχόζωα.

4.13 Γονίδιο αλανυλ-αμινοπεπτιδάσης 1

Το γονίδιο της αλανυλ-αμινοπεπτιδάσης 1 ήταν ένα από τα υποψήφια υπό μελέτη γονίδια, το οποίο δεν χρησιμοποιήθηκε διότι δεν παρουσίαζε έκφραση σε κανένα από τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν. Αυτό πιθανόν δηλώνει ότι πρόκειται για παράλογο το οποίο εκφράζεται στην ενήλικη ζωή του *Seriola dumerili*, σε αντίθεση με το δεύτερο παράλογο του γονιδίου (ALAAMI_2) το οποίο εμφανίζει έκφραση στα προνυμφικά στάδια του είδους.

5.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σε αυτήν την μελέτη εξετάστηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και των διατροφικών επιλογών των προνυμφών του *S. dumerili* στην ανάπτυξη και ωρίμανση του πεπτικού συστήματος σε συνθήκες εκτροφής. Οι δύο αυτοί επιγενετικοί παράγοντες έχουν μεγάλη συμβολή, ο καθένας με τον δικό του τρόπο, στην ανάπτυξη των προνυμφών όπως φάνηκε από τα αποτελέσματα στο πλαίσιο αυτής της εργασίας τα οποία έρχονται σε συμφωνία με αντίστοιχες μελέτες (Loufi et al. 2024; Pérez et al. 2020b; Ribeiro et al. 2008). Συγκεκριμένα, στην μελέτη των (Loufi et al. 2024) τα αποτελέσματα έδειξαν πως η εκτροφή με κωπήποδα είχε θετική επίδραση σε προνύμφες *S. dumerili*, ενώ στην έρευνα των (Ribeiro et al. 2008) στο είδος *Pagellus bogaraveo* φαίνεται πως η διατροφή με τροχόζωα πιθανόν είχε αρνητική επίδραση στη δραστικότητα μεταβολικών ενζύμων όπως η θρυψίνη. Κατά την διαδικασία της οντογένεσης του πεπτικού συστήματος συμβαίνουν πολυάριθμες αλλαγές στην μορφολογία του πεπτικού σωλήνα, στα γονίδια που εκφράζονται και στα ένζυμα που κωδικοποιούνται. Σύμφωνα με τα δεδομένα που απεικονίζονται στην Εικόνα 11, η εκτροφή στους 20°C με την χρήση κωπήποδων εμφανίζει την πιο γρήγορη ανάπτυξη συγκριτικά με τις υπόλοιπες πειραματικές συνθήκες, φτάνοντας πρώτη στο στάδιο της μεταμόρφωσης, ενώ αντίθετα, η ομάδα των 20R έχει την πιο αργή ανάπτυξη, με την μετάβαση μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων να διαρκεί περισσότερο από οποιαδήποτε ομάδα. Η αντίθεση αυτή πιθανότατα έγκειται στην διαφορετική τροφή με την οποία πραγματοποιήθηκε η εκτροφή των προνυμφών. Τα κωπήποδα αποτελούν μέρος της φυσικής διατροφής των ιχθυδίων στο περιβάλλον, είναι πλουσιότερα σε πολύ-ακόρεστα λιπαρά οξέα με μεγαλύτερα ποσοστά απαραίτητων λιπαρών και διαθέτουν περισσότερα εύπεπτα ελεύθερα αμινοξέα, τα οποία συμβάλλουν στην πεπτική ικανότητα των ψαριών συγκριτικά με τα τροχόζωα (Malzahn et al. 2022). Για τους λόγους αυτούς, αποτελούν μια πιο εύπεπτη τροφική επιλογή η οποία πιθανότατα προσφέρει πιο άμεση απόδοση ενέργειας για την καλύτερη και γρηγορότερη ανάπτυξη. Στην ομάδα των 20R οι προνύμφες φαίνεται πως πιθανότατα δεν λαμβάνουν τα απαραίτητα ενεργειακά ποσά για να μεταβούν στα επόμενα αναπτυξιακά στάδια εγκαίρως. Όπως αναφέρθηκε, η θερμοκρασία επηρεάζει επίσης τους αναπτυξιακούς ρυθμούς των προνυμφών με αυτές που εκκολάφθηκαν στους 24°C να περνούν γρηγορότερα στο στάδιο της εξωγενούς τροφοληψίας υποδεικνύοντας πως η κατανάλωση του λεκιθικού αποθέματος επήλθε νωρίτερα. Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώνονται και από μελέτες σε άλλα είδη,

όπως το *Pagellus bogaraveo* (Brunnich 1768) όπου παρατηρείται πως σε μεγαλύτερες αναπτυξιακές θερμοκρασίες εμφανίζονται αυξημένοι αναπτυξιακοί ρυθμοί και ενζυμικές δραστηριότητες (Ribeiro et al. 2008). Η ταχύτερη κατανάλωση του λεκιθικού αποθέματος ενδέχεται να σχετίζεται με την ανάγκη για αυξημένο ρυθμό ανάπτυξης. Ωστόσο, δεν αποκλείεται το αντίστροφο ενδεχόμενο, δηλαδή η πρώιμη εξάντληση της λέκιθου να αποτελεί αιτία της επιτάχυνσης του αναπτυξιακού ρυθμού. Στην Εικόνα 11 παρατηρείται πως στην ομάδα 24C το στάδιο FF διήρκεσε την μικρότερη χρονική περίοδο συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες ομάδες, γεγονός που δείχνει πως πιθανότατα ο συνδυασμός της αυξημένης θερμοκρασίας και των κωπηπόδων ευνόησε την ταχύτερη μετάβαση στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο. Ωστόσο, παρατηρείται πως στην συνέχεια οι αναπτυξιακοί ρυθμοί της ομάδας αυτής μειώθηκαν και οι προνύμφες παρέμειναν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο στάδιο FL. Αυτό πιθανόν εξηγείται διότι αν και σε υψηλές θερμοκρασίες η αύξηση του μεγέθους μπορεί να έρχεται αναλογικά γρηγορότερα, η συνολική οργανογένεση και ωρίμανση των συστημάτων του σώματος που πραγματοποιούνται στο FL στάδιο καθυστερεί, αφού το μεγαλύτερο μέρος των ενεργειακών πηγών καταναλώνεται στην αύξηση. Αυτό το φαινόμενο της μειωμένης ωρίμανσης συστημάτων εις βάρος της γρήγορης αύξησης παρατηρείται στην ανάπτυξη και άλλων συστημάτων των προνυμφών *Seriola dumerili* όπως φαίνεται στην έρευνα των (Angelakopoulos et al., 2025 in preparation) σχετικά με την ανάπτυξη του μυϊκού συστήματος. Έτσι, αν και οι προνύμφες περνούν γρηγορότερα στο επόμενο αναπτυξιακό στάδιο, μπορεί να μην είναι επαρκής η ωρίμανση του πεπτικού σωλήνα με αποτέλεσμα την ανικανότητα καταβολισμού των πολύπλοκων οργανικών μορίων της τροφής.

Η ομάδα 24R αν και καθυστερεί να μεταβεί στο FL στάδιο από την στιγμή που περνά στο στάδιο αυτό και μετά εμφανίζει αυξημένους αναπτυξιακούς ρυθμούς. Αυτό επιβεβαιώνεται και από τα υπόλοιπα αποτελέσματα της ομάδας αυτής όπου παρουσιάζονται τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων που κωδικοποιούν για βασικά πεπτικά ένζυμα και φαίνεται πως συγκριτικά με όλες τις υπόλοιπες ομάδες τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων αυτής της ομάδας είναι μεγαλύτερα. Μία πιθανή εξήγηση για την καθυστέρηση στην μετάβαση από το FF στο FL αναπτυξιακό στάδιο που παρατηρείται και στις δύο ομάδες που τράφηκαν με τροχόζωα (20R, 24R) είναι πως οι προνύμφες δεν διαθέτουν ακόμη ένα αρκετά ώριμο πεπτικό σύστημα για να μπορέσουν να πέψουν αποτελεσματικά την τροφή και να

μπορέσουν να προσλάβουν ενέργεια από τον μεταβολισμό της. Τα τροχόζωα αν και διαθέτουν υψηλά ποσοστά αμινοξέων (28%-63% του DW) (Lubzens et al. 2003) που θεωρητικά θα μπορούσαν να προσφέρουν στην ανάπτυξη των προνυμφών, πιθανόν το ανώριμο πεπτικό τους σύστημα δεν μπορεί να τα μεταβολίσει οδηγώντας σε προσαρμογή των επιπέδων έκφρασης των πεπτικών γονιδίων. Τα δεδομένα αυτά συνάδουν με τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης των πεπτικών ενζύμων που παρατηρούνται στην ομάδα 24R συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως επειδή για την πέψη των τροχόζων απαιτείται η κατανάλωση μεγαλύτερου μέρους του συνολικού ενεργειακού αποθέματος των προνυμφών, η ανάπτυξη στην ομάδα αυτή δεν συνάδει με τα αυξημένα επίπεδα των πεπτικών ενζύμων που καταγράφονται. Με βάση τα πρότυπα έκφρασης των πεπτικών γονιδίων στις δύο ομάδες στους 24°C θα περιμέναμε αντίστοιχες διαφορές και στους αναπτυξιακούς χρονισμούς, γεγονός που δεν επιβεβαιώθηκε.

Γενικότερα, η εκτροφή με κωπήποδα έχει παρατηρηθεί πως έχει καλύτερο αντίκτυπο στην ανάπτυξη. Το γεγονός αυτό έχει συσχετιστεί με τα μεγαλύτερα επίπεδα λιπιδίων και ελεύθερων αμινοξέων όπως έχει ήδη αναφερθεί. Ωστόσο, μία αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ κωπήποδων και τροχόζων φαίνεται να είναι τα αυξημένα επίπεδα ιχνοστοιχείων και ιδιαίτερα ιωδίου που ανιχνεύονται στα κωπήποδα (Penglase et al. 2013). Συγκεκριμένα, τα τροχόζωα περιέχουν 6 έως 116 φορές χαμηλότερα επίπεδα ιωδίου συγκριτικά με τα κωπήποδα (Hamre et al. 2008). Το γεγονός αυτό μπορεί να επηρεάζει την πέψη τους άρα και την ενεργειακή τους απόδοση στις προνύμφες. Το ιώδιο είναι ένα απαραίτητο ιχνοστοιχείο για την παραγωγή των θυροειδικών ορμονών T3 και T4, οι οποίες ρυθμίζουν την ανάπτυξη των ιχθύων (Penglase et al. 2013), ωστόσο τόσο η περίσσεια όσο και το έλλειμα ιωδίου μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά την παραγωγή των θυροειδών ορμονών με την υπερσυσσώρευση ιωδίου στον οργανισμό να οδηγεί σε τοξικότητα (Penglase et al. 2013). Τα αυξημένα επίπεδα ιωδίου των κωπήποδων με τη διαδικασία της πέψης πιθανόν ενισχύουν τη παραγωγή θυροειδών ορμονών της προνύμφης, οι οποίες με την σειρά τους αυξάνουν την έκκριση άλλων ορμονών και άρα ενισχύουν τους αναπτυξιακούς ρυθμούς των προνυμφών. Σε πείραμα που χρησιμοποιήθηκαν τρεις πειραματικές τροφές (κωπήποδα, ενισχυμένα τροχόζωα με Ori-green (Skretting, Νορβηγία) και 60mg NaI, ενισχυμένα τροχόζωα με Ori-green (Skretting, Νορβηγία) και 12mg NaI) (Penglase et al. 2013) στο είδος *Gadus morhua* φάνηκε πως τα τροχόζωα που είχαν εμπλουτιστεί με ιώδιο αύξησαν τα

επίπεδα ιωδίου στις προνύμφες του βακαλάου, αν και αξίζει να σημειωθεί πως καθώς τα επίπεδα ιωδίου αυξάνονται στα τροχόζωα, οι αυξήσεις στα επίπεδα ιωδίου στις προνύμφες του βακαλάου γίνονται αναλογικά μικρότερες. Στο συγκεκριμένο πείραμα παρατηρήθηκε επίσης, πως οι προνύμφες που ταΐστηκαν με τροχόζωα εμπλουτισμένα με ιώδιο παρόμοιας ποσότητας με αυτό των κωπήποδων εμφάνιζαν τοξικότητα σε αυτό. Μία πιθανή εξήγηση στο γεγονός αυτό είναι πως το ιώδιο των κωπήποδων δεν προκαλεί τοξικότητα στις προνύμφες διότι τα κωπήποδα διαθέτουν έναν μηχανισμό αποτοξικοποίησης του μέσω της σύνδεσής του με άλλα ιχνοστοιχεία όπως για παράδειγμα η αλληλεπίδραση του με ανιόντα βρωμίου μέσω ενός μηχανισμού που δεν είναι γνωστός. Ο μηχανισμός αυτός έχει παρατηρηθεί σε ζώα όπως το κοτόπουλο (*Gallus gallus*, Baker 2004), ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι το Br⁻ μειώνει τη συσσώρευση ιωδίου στα θυρεοειδικά κύτταρα και αυξάνει την απέκκριση του μέσω των νεφρών σε είδη όπως ο αρουραίους (Pavelka et al. 2001).

Σχετικά με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων που μελετήθηκαν φαίνεται πως η αμυλάση παρουσιάζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης στο στάδιο της κάμψης της νωτοχορδής (FL) στο οποίο ακόμη ο πεπτικός σωλήνας δεν είναι ολοκληρωμένος. Το *S. dumerili* είναι ένα σαρκοφάγο είδος. Αυτό σημαίνει πως με την πάροδο της ανάπτυξής του μειώνονται τα επίπεδα υδατανθράκων που προσλαμβάνει και αυξάνονται τα επίπεδα πρωτεϊνών, γεγονός που εξηγεί την σταδιακή μείωση των επιπέδων έκφρασης του γονιδίου της αμυλάσης, αφού μειώνεται η ανάγκη δράσης του ενζύμου αυτού. Ωστόσο, τα αρχικά υψηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου υποδηλώνουν τις υψηλές ενεργειακές απαιτήσεις του οργανισμού στο πρώιμο αυτό αναπτυξιακό στάδιο με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη. Επίσης, φαίνεται η σημασία του ενζύμου αυτού στον μεταβολισμό και την ανάπτυξη στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια των προνυμφών (Rønnestad et al. 2013). Η αμυλάση είναι ένα γονίδιο που εκφράζεται στο έντερο, τα αυξημένα επίπεδά της στο αναπτυξιακό στάδιο FL δηλώνουν την λειτουργικότητα του εντερικού τμήματος του πεπτικού σωλήνα στο στάδιο αυτό και την ικανότητά του για τον μεταβολισμό του αμύλου σε γλυκόζη η οποία θα αποθηκευτεί με την μορφή γλυκογόνου στα ώριμα και λειτουργικά ηπατοκυττάρα. Στις ομάδες 20R και 24R τα αρχικά επίπεδα της αμυλάσης είναι αρκετά υψηλότερα συγκριτικά με τις ομάδες 20C και 24C. Αυτό μπορεί να δηλώνει την αυξημένη ανάγκη για ενέργεια των ομάδων που τρέφονται με τροχόζωα καθώς αναφέρθηκε πως τα τροχόζωα αποδίδουν λιγότερη ενέργεια από τα κωπήποδα. Έτσι μπορεί ο οργανισμός εκφράζοντας σε μεγαλύτερα επίπεδα την αμυλάση να

αποσκοπεί στην απόκτηση περισσότερης ενέργειας μέσω του μεταβολισμού. Η έκφραση του γονιδίου της αμυλάσης φαίνεται να επηρεάζεται από την θερμοκρασία εκκόλαψης, με τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στους 24°C να είναι μεγαλύτερα από τα αντίστοιχα στους 20°C. Πιθανόν η αυξημένη θερμοκρασία να αυξάνει τους αναπτυξιακούς ρυθμούς (Navarro-Guillén et al. 2025) άρα το γονίδιο της αμυλάσης να εκφράζεται σε μεγαλύτερα επίπεδα για να καλύψει τις ενεργειακές απαιτήσεις των προνυμφών.

Η έναρξη της δραστηριότητας της πεψίνης σηματοδοτεί την λειτουργική ωρίμανση του στομάχου. Στην μελέτη αυτή εξετάστηκαν τα επίπεδα έκφρασης δύο παραλόγων πεψίνης. Παρατηρήθηκε το ίδιο μοτίβο έκφρασης και στα δύο παράλογα του γονιδίου της πεψίνης, με την έκφραση να αυξάνεται σταδιακά από σχεδόν μηδενικά επίπεδα στο FL στάδιο σε ολοένα και μεγαλύτερα με την πάροδο της ανάπτυξης και την ωρίμανση του πεπτικού συστήματος στις περισσότερες ομάδες. Το μοτίβο αυτό δεν ακολουθείται για το γονίδιο *PAL* στις δύο ομάδες των 20°C όπου τα επίπεδα της έκφρασης του μειώθηκαν στο στάδιο MM, μετά από την μέγιστη έκφρασή του στο ELR στάδιο. Τα δεδομένα αυτά έρχονται σε συμφωνία με έρευνες που διερευνήθηκε η ενζυμική δραστικότητα της πεψίνης στο ίδιο είδος και φάνηκε πως η έκφρασή του εντοπίστηκε σε προχωρημένο αναπτυξιακό στάδιο (39 DPH) (Gamberoni et al. 2021). Ο λόγος της έκφρασης των δύο παραλόγων αυξάνεται σταδιακά σε όλες τις πειραματικές ομάδες (Εικόνα 30), αποτέλεσμα που είναι σύμφωνο με τα επίπεδα έκφρασης των δύο γονιδίων αφού το παράλογο *PEPSIN* (ENSSDUG00000009527) εκφράζεται σε μεγαλύτερες τιμές συγκριτικά με το παράλογο *PAL* (ENSSDUG00000008954). Δεδομένου ότι και τα δύο παράλογα εκφράζονται στα στάδια που μελετήθηκαν με αύξουσα τάση και στις δύο περιπτώσεις θα μπορούσαμε να υποθέσουμε πως είναι και τα δύο απαραίτητα για την πεπτική διαδικασία των πρωτεϊνών. Αυτό μπορεί να συμβαίνει λόγω των αυξημένων ενεργειακών αναγκών που απαιτούνται στα πρώιμα αυτά αναπτυξιακά στάδια και έτσι χρειάζεται η παραγωγή μεγαλύτερων ποσών ενζύμων ή λόγω της συνεργατικής δυναμικής σχέσης που εμφανίζουν τα δύο προϊόντα των παραλόγων αυτών γονιδίων, είναι πιθανό δηλαδή για την συνολική λειτουργικότητα της πεψίνης να απαιτούνται πεπτίδια που κωδικοποιούνται και από τα δύο αυτά παράλογα. Οι αρχικά πολύ χαμηλές τιμές έκφρασης των παραλόγων πεψίνης θα μπορούσαν να ερμηνευτούν διότι στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια μέχρι την ωρίμανση του στομάχου, υπεύθυνα μόρια για την πέψη των πρωτεϊνών είναι οι θρυψίνες. Δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη διαφορά στα πρότυπα έκφρασης των δύο

γονιδίων που να επηρεάζεται από την θερμοκρασία. Επίσης δεν παρατηρήθηκε κάποιο σταθερό μοτίβο επιρροής της έκφρασης των δύο γονιδίων από κάποιον τύπο τροφής.

Στην συνέχεια, εξετάστηκε η έκφραση των παραλόγων θρυψίνης. Η θρυψίνη είναι ένα από τα σημαντικότερα πεπτικά ένζυμα τα οποία σχετίζονται με την πεπτική λειτουργία στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των ιχθύων (Rønnestad et al. 2013), δίνοντας στις προνύμφες την δυνατότητα να πέπτουν πρωτεΐνες μετά το FF στάδιο ανάπτυξης. Είδη όπως το *Seriola lalandi* και το *Thunnus thynnus* χαρακτηρίζονται από ένα μοτίβο γρήγορης έκφρασης του γονιδίου της θρυψίνης, η οποία ακολουθείται από μείωση της έκφρασης της θρυψίνης, λόγω της γρήγορης ανάπτυξης του στομάχου και της μετάβασης στα ενήλικα πρότυπα πέψης (Chen et al. 2006; Miyashita et al. 1998). Αντίθετα, σύμφωνα με έρευνες σε είδη όπως το *Seriola rivoliana* η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου θρυψίνης επάγεται λίγο αργότερα μετά την έναρξη της εξωγενούς τροφοληψίας (Teles et al. 2019). Σύμφωνα με τις εικόνες 18,20 και 28, παρατηρείται μία διαφορά στα επίπεδα έκφρασης των δύο παραλόγων. Το παράλογο *AT1L* εμφανίζει μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια συγκριτικά με το παράλογο *T3L*. Η έκφραση του δεύτερου αν και δεν μειώνεται παραμένει ιδιαίτερα χαμηλή σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν ενώ η έκφραση του πρώτου αυξάνεται με την πάροδο της ανάπτυξης, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τον λόγο έκφρασης των δύο γονιδίων ο οποίος αυξήθηκε με την πρόοδο της ανάπτυξης. Η διαφορά αυτή που σημειώνεται στα επίπεδα έκφρασης των δύο παραλόγων μπορεί να είναι αποτέλεσμα του διαφορετικού χρονισμού των προτύπων έκφρασης των δύο γονιδίων. Το γονίδιο *AT1L* έχει υψηλότερη έκφραση στα αναπτυξιακά στάδια μετά την εκκόλαψη με σταδιακή αύξηση της έκφρασής του, συγκριτικά με το *T3L* υποδηλώνοντας πως πιθανότατα είναι παράλογο που εκφράζεται στην ενήλικη ζωή του ατόμου. Για το παράλογο *T3L* που εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στα αναπτυξιακά στάδια μετά την εκκόλαψη που μελετήθηκαν δεν υπάρχουν επιπλέον δεδομένα που θα μπορούσαν να ενισχύουν την θεωρία πως αποτελεί την εμβρυική ή ενήλικη μορφή του γονιδίου. Ο συλλογισμός αυτός υποστηρίζεται από την σταδιακή αύξηση του λόγου της έκφρασης των δύο γονιδίων. Σύμφωνα με μελέτες όπου εξετάστηκαν προνύμφες σε επιπλέον αναπτυξιακά στάδια από το συγκεκριμένο πείραμα φαίνεται πως η δραστηριότητα του ενζύμου της θρυψίνης μειώνεται σταδιακά μετά την μεταμόρφωση γεγονός που συνδυάζεται με την αύξηση της δραστηριότητας της πεψίνης, υποδηλώνοντας πως το στομάχι είναι πλέον λειτουργικό και

μπορεί να πέψει τις πρωτεΐνες σε είδη όπως το *Trachinotus ovatus* (Ma et al. 2014). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με αντίστοιχα για το είδος *Seriola lalandi* (Chen et al., 2006), όπου οι συγγραφείς θεώρησαν πως η θρυψίνη ήταν πιο δραστική στις προνύμφες των ψαριών, και ότι η δραστηριότητα της μειώθηκε μετά τον σχηματισμό των γαστρικών αδένων, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι προνύμφες του *Seriola rivoliana* ήταν πλέον ικανές να μεταβολίζουν πολύπλοκες πρωτεΐνες. Σύμφωνα με το δημοσίευμα των (Ribeiro et al. 2002) αλκαλικές πρωτεάσες, όπως η θρυψίνη, είναι υπεύθυνες για την πέψη των πρωτεϊνών μέχρι την πλήρη ανάπτυξη του στόμαχου. Η έκφραση του γονιδίου *T3L* φαίνεται να επηρεάζεται από την θερμοκρασία εκκόλαψης και την διατροφή των προνυμφών. Οι ομάδες εκτροφής των 24°C παρουσίασαν μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου στηρίζοντας τα δεδομένα περί αυξημένων αναπτυξιακών ρυθμών των δύο αυτών ομάδων. Η εκτροφή με τροχόζωα επίσης φαίνεται να έχει θετική επίδραση στην έκφραση του γονιδίου. Η έκφραση του δεύτερου παραλόγου, *AT1L*, δεν επηρεάστηκε ιδιαίτερα από την θερμοκρασία ή την διατροφή, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της έκφρασής του συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες στην ομάδα των 24R συμπληρώνοντας τα στοιχεία για την αυξημένη γονιδιακή έκφραση σε αυτή την ομάδα.

Το επόμενο γονίδιο που μελετήθηκε είναι αυτό της χυμοθρυψίνης, ένα γονίδιο το οποίο παρουσιάζει ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα έκφρασης υποδεικνύοντας τον καίριο ρόλο του στον μεταβολισμό. Τα δεδομένα αυτά συνάδουν με αντίστοιχα της έρευνας των (Gamberoni et al. 2021b), που δείχνουν πως η έκφραση του γονιδίου αυτού παρέμενε σε υψηλά επίπεδα καθ' όλη την πειραματική περίοδο δηλώνοντας την ανάγκη για μεταβολισμό πρωτεϊνών ακόμη και πριν την πλήρη ανάπτυξη του στόμαχου. Όπως φαίνεται στις εικόνες 22,23 τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου ήταν ιδιαίτερα αυξημένα στο στάδιο στο μέσο της μεταμόρφωσης (MM) σε όλες τις ομάδες εκτροφής, φανερώνοντας πως στο στάδιο αυτό η ανάγκη μεταβολισμού είναι αυξημένη δεδομένων των αλλαγών που πραγματοποιούνται στην φάση αυτή και των ενεργειακών απαιτήσεων που υπάρχουν. Στο στάδιο MM οι ιχθύες είναι πλέον αποκλειστικά σαρκοφάγοι οργανισμοί γεγονός που φαίνεται από την ανάγκη για μεταβολισμό των πρωτεϊνών για την απόκτηση της απαραίτητης ενέργειας. Η χυμοθρυψίνη δραστηριοποιείται στο μέσο και οπίσθιο έντερο συμπληρώνοντας την πλήρη υδρόλυση των πρωτεϊνών μαζί με την θρυψίνη (Gononi et. al., 1986). Σύμφωνα με έρευνες, ο λόγος της θρυψίνης/χυμοθρυψίνη μπορεί να υποδεικνύει τον βαθμό στον οποίο η χυμοθρυψίνη

ενεργοποιείται από τη θρυψίνη (Teles et al. 2019). Με τη σειρά του, αυτός ο λόγος μπορεί να υποδηλώνει το αναπτυξιακό δυναμικό των προνυμφών. Όσο υψηλότερος είναι ο λόγος θρυψίνης/χυμοθρυψίνης, τόσο υψηλότερος είναι ο ρυθμός απορρόφησης των απαραίτητων αμινοξέων για τη σύνθεση πρωτεϊνών και άρα το δυναμικό ανάπτυξης (Lazo et al. 2011). Κάποιοι ερευνητές έχουν προτείνει ο λόγος αυτός να χρησιμοποιείται ως διαγνωστικός δείκτης της διατροφικής κατάστασης των προνυμφών αφού μπορεί να αποτυπώνει το αναπτυξιακό δυναμικό του ιχθύος (Cara et al. 2007). Να σημειωθεί πως δεν παρατηρήθηκε κάποια ιδιαίτερη διαφορά στα πρότυπα έκφρασης του γονιδίου συγκριτικά με τις δύο διατροφικές επιλογές που χρησιμοποιήθηκαν πιθανόν διότι και οι δύο τροφές είναι ζωικής προέλευσης με τα κωπήποδα να έχουν έναν σχετικά μεγάλο αριθμό εύπεπτων αμινοξέων αλλά και τα τροχόζωα να διαθέτουν μεγάλο αριθμό αμινοξέων με την διαφορά να έγκειται στον βαθμό ανάπτυξης του πεπτικού συστήματος για να μπορούν να τα μεταβολίσουν, όπως αναφέρθηκε και σε αντίστοιχες έρευνες (Conceição et al. 2010).

Ένα ακόμη πεπτικό ένζυμο που συμβάλλει στην πέψη πρωτεϊνών είναι η αλανυλαμινοπεπτιδάση 2, η οποία αφαιρεί αμινοξέα από το αμινοτελικό άκρο των πρωτεϊνών. Στο πείραμα που διεξήχθη διαπιστώθηκε η έκφρασή της σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και ομάδες σε σταθερά χαμηλά επίπεδα, με την έκφραση να είναι παρόμοια τόσο μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων όσο και μεταξύ των πειραματικών ομάδων. Με δεδομένο ότι οι επιγενετικοί παράγοντες που εξετάστηκαν δεν επηρεάζουν ιδιαίτερα την έκφραση του γονιδίου αυτού πιθανόν να μπορούμε να συμπεράνουμε πως το γονίδιο αυτό υπόκειται σε αυστηρό έλεγχο της ρύθμισής του γεγονός που αποτρέπει την έκφρασή του από το να επηρεάζεται σημαντικά από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η λειτουργικότητα του ενζύμου που κωδικοποιείται από το γονίδιο αυτό εμφανίζεται στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια (Gamberoni et al. 2021) υποδεικνύοντας την λειτουργικότητα των εντεροκυττάρων. Η δράση της εντοπίζεται στο μέσο και οπίσθιο τμήμα του εντέρου (Gononi et al. 1986). Μελετήθηκε επίσης και το παράλογο γονίδιο της αλανυλαμινοπεπτιδάσης 1 για το οποίο δεν διαπιστώθηκε έκφραση σε κάποιο από τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν γεγονός που υποδεικνύει ότι ίσως πρόκειται για παράλογο που εκφράζεται στην ενήλικη ζωή, με τα δύο παράλογα να έχουν διαμερισματοποιήσει αναπτυξιακά την έκφρασή τους.

Τέλος, εξετάστηκε το γονίδιο της αλκαλικής φωσφατάσης, ενός ενζύμου που συμβάλλει στην αποφωσφορυλίωση πρωτεϊνών και αλκαλοειδών και δραστηριοποιείται σε όλο το μήκος του

εντερικού σωλήνα. Όπως παρατηρείται στις εικόνες 26, 27 τα επίπεδα της έκφρασης του γονιδίου παραμένουν ιδιαίτερα χαμηλά σε όλα τα υπό μελέτη αναπτυξιακά στάδια όλων των πειραματικών ομάδων. Εξαίρεση αποτελούν οι ομάδες των 24°C, οι οποίες στο στάδιο MM αυξάνουν την έκφραση του γονιδίου. Αυτό μπορεί να συμβαίνει διότι στο στάδιο αυτό απαιτούνται μεγάλα ποσά ενέργειας για την αύξηση των ατόμων, τα οποία λαμβάνονται από τον οργανισμό μέσω της πέψης. Η αυξημένη έκφραση του γονιδίου φανερώνει την λειτουργική ωρίμανση των εντεροκυττάρων και την ανάγκη για καταβολισμό πολύπλοκων πεπτιδικών μορίων τα οποία θα αποδώσουν ενέργεια. Η διαφορά που εμφανίζεται μεταξύ των 20 και 24°C θα μπορούσε να εξηγηθεί από το γεγονός του ότι στους 24°C παρατηρείται μία τάση για μεγαλύτερα επίπεδα έκφρασης όλων των υπό μελέτη γονιδίων, λόγω των αυξημένων ενεργειακών απαιτήσεων.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, και οι δύο παράγοντες που μελετήθηκαν επιδρούν στην οντογένεση του πεπτικού συστήματος ο καθένας σε διαφορετικό βαθμό. Η θερμοκρασία εκκόλαψης των 24°C προσφέρει αυξημένους αναπτυξιακούς ρυθμούς με τις πειραματικές ομάδες να περνούν γρηγορότερα στο στάδιο της εξωγενούς τροφοληψίας. Η ανάπτυξη ωστόσο, αποτελεί μια σφαιρική και ολιστική διαδικασία και έτσι αν και σε αυτές τις ομάδες σημειώνονται αυξημένοι αναπτυξιακοί ρυθμοί, δεν αντικατοπτρίζεται το ίδιο και στην συνολική ανάπτυξη των ατόμων με αποτέλεσμα οι προνύμφες να μην φτάνουν στο στάδιο της μέσης μεταμόρφωσης νωρίτερα συγκριτικά με τις υπόλοιπες ομάδες. Η ταχύτερη ανάπτυξη εμφανίζεται στην ομάδα των 20C, ενώ η πιο αργή σε αυτή των 20R γεγονός που φανερώνει την επίδραση της διατροφής στην οντογένεση του πεπτικού συστήματος και της συνολικής ανάπτυξης. Η επίδραση των επιγενετικών παραγόντων στην οντογένεση των γονιδίων του πεπτικού συστήματος εμφανίζει μεγάλη ποικιλία με άλλα γονίδια να επηρεάζονται από την αύξηση της θερμοκρασίας έχοντας υψηλότερα επίπεδα έκφρασης (*amyl*, *chym*, *T3L*, *alph*) και άλλα να εμφανίζουν σταθερή έκφραση (*AT1L*, *pepsin*, *alaami_2*, *PAL*). Η διατροφή αποτελεί τον δεύτερο επιγενετικό παράγοντα που μελετήθηκε και φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη. Τα γονίδια *amyl*, *T3L* επάγονται από την χρήση τροχόζων ενώ τα υπόλοιπα δεν εμφανίζουν ιδιαίτερη ανταπόκριση στον τύπο της διατροφής. Η ομάδα των 24R εμφανίζει αυξημένα επίπεδα έκφρασης όλων των γονιδίων συγκριτικά με τις άλλες ομάδες, αν και αυτό δεν αντικατοπτρίζεται στον αναπτυξιακό ρυθμό της ομάδας, αφού οι προνύμφες της ομάδας 24C φτάνουν στην μέση μεταμόρφωση ταυτόχρονα με αυτές της 24R.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής θα μπορούσαν σε συνδυασμό με μελέτη που θα αφορούσε τις ενζυμικές δραστηριότητες γονιδίων του πεπτικού συστήματος να παρέχουν μια ολοκληρωμένη σφαιρική εικόνα για τις καταλληλότερες συνθήκες εκτροφής των προνυμφών μαγιάτικου. Τα δεδομένα αυτά πιθανόν να φανούν χρήσιμα σε εταιρίες που εδραιώνονται στην ιχθυοκαλλιέργεια. Η μελέτη της θερμοκρασίας ως έναν επιγενετικό παράγοντα θα μπορούσε να φανεί χρήσιμη ειδικά υπό τα σενάρια της κλιματικής αλλαγής, αναπτύσσοντας βιοδείκτες σχετικούς με την θερμοκρασιακή καταπόνηση των προνυμφών. Συνδυαστικά, η μελέτη της διατροφής θα μπορούσε να αποφέρει ανάπτυξη εξειδικευμένων διατροφικών

πρωτοκόλλων με βάση τα ζητούμενα κάθε φορά χαρακτηριστικά των ιχθύων που καλλιεργούνται.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abatzopoulos*, Theodore J., Bo Zhang, and Patrick Sorgeloos. 1998. "Artemia Tibetiana: Preliminary Characterization of a New Artemia Species Found in Tibet (People's Republic of China). International Study on Artemia. LIX." *International Journal of Salt Lake Research* 1998 7:1 7(1):41–44. doi:10.1023/A:1009073111231.
- Ahyong, S., C. B. Boyko, J. Bernot, S. N. Brandão, M. Daly, S. De Grave, N. J. de Voogd, S. Gofas, F. Hernandez, L. Hughes, T. A. Neubauer, G. Paulay, S. van der Meij, B. Boydens, W. Decock, S. Dekeyser, M. Goharimanesh, L. Vandepitte, B. Vanhoorne, R. Adlard, S. Agatha, K. J. Ahn, M. V Alonso, B. Alvarez, K. Alves, M. R. W. Amler, V. Amorim, A. Anderberg, S. Andrés-Sánchez, Y. Ang, D. Antić, L. S. .. Antonietto, C. Arango, T. Artois, S. Atkinson, K. Auffenberg, N. Bailly, B. G. Baldwin, R. Bank, A. Barber, R. L. Barrett, I. Bartsch, D. Bellan-Santini, N. Bergh, C. Bernard, F. J. Berrios Ortega, A. Berta, T. N. Bezerra, P. Bhandari, R. Bieler, S. Blanco, I. Blasco-Costa, M. Blazewicz, L. A. Bledzki, P. Bock, M. Bonifacino, R. Böttger-Schnack, P. Bouchet, N. Boury-Esnault, R. Bouzan, G. Boxshall, C. Bradshaw, R. Bray, A. L. Brito Seixas, J. Browning, N. L. Bruce, J. J. Bruhl, A. Bruneau, N. Budaeva, J. Bueno-Villegas, J. Calvo Casas, P. Cárdenas, E. Carstens, A. B. G. D. Carvalho, T. Cedhagen, B. K. Chan, T. Y. Chan, A. Chernyshev, H. Choong, M. Christenhusz, M. Churchill, E. Cole, A. G. Collins, G. E. Collins, K. Collins, L. Consorti, D. Copilaș-Ciocianu, L. Corbari, R. Cordeiro, S. M. Costa, V. M. d. M. Costa, P. H. Costa Corgosinho, M. Coste, K. A. Crandall, F. Cremonte, T. Cribb, S. Cutmore, F. Dahdouh-Guebas, M. Daneliya, J. C. Dauvin, P. Davie, C. De Broyer, P. de Lima Ferreira, V. de Mazancourt, L. de Moura Oliveira, P. Decker, D. Defaye, H. Dekker, R. DeSalle, I. Di Capua, S. Dippenaar, M. Dohrmann, J. Dolan, D. Domning, R. D'Onofrio, R. Downey, N. Dreyer, U. Eisendle, M. Eitel, M. Eleaume, T. Elliott, H. Enghoff, J. Epler, P. Esquete Garrote, N. L. Evenhuis, C. Ewers-Saucedo, M. Faber, D. Figueroa, C. Fišer, B. A. Ford, K. A. Ford, E. Fordyce, W. Foster, C. Fransen, S. Freire, S. Fujimoto, H. Furuya, M. Galbany-Casals, A. Gale, H. Galea, T. Gao, P. García-Moro, R. Garic, S. Garnett, S. Gaviria-Melo, S. Gebauer, S. Gerken, D. Gibson, R. Gibson, A. Gil, J. Gil, A. Gittenberger, C. Glasby, H. Glenner, A. Glover, P. Goetghebeur, S. E. Gómez-Noguera, G. O. Gonçalves, A. I. Gondim, B. C. Gonzalez, M. d. S. González-Elizondo, L. González-Gallego, D. González-Solís, C. Goodwin, M. Gostel, M. Grabowski, M. Grossi, J. M. .. Guerra-García, J. M. Guerrero, R. Guidetti, M. D. Guiry, D. Gutierrez, K. A. Hadfield, E. Hajdu, K. Halanych, J. Hallermann, B. W. Hayward, T. A. Hegna, G. Heiden, E. Hendrycks, D. Hennen, D. Herbert, A.

Herrera Bachiller, A. L. Hipp, M. Hodda, J. Høeg, B. Hoeksema, O. Holovachov, M. D. Hooge, J. N. Hooper, T. Horton, R. Houart, Z. Hroudová, R. Huys, M. Hyžný, L. F. M. Iniesta, T. Iseto, M. Iwataki, R. Janssen, D. Jaume, K. Jazdzewski, C. D. Jersabek, P. Jiménez-Mejías, X. F. Jin, P. Jóźwiak, M. Jung, A. Kabat, H. Kajihara, K. Kakui, Y. Kantor, I. Karanovic, B. Karapunar, B. Karthick, J. Kathirithamby, L. Katinas, N. Kilian, S. Kim, Y. H. Kim, R. King, P. M. Kirk, M. Klautau, J. P. Kociolek, F. Köhler, K. Konowalik, A. Kotov, Z. Kovács, A. Kremenetskaia, R. M. Kristensen, A. Kroh, M. Kulikovskiy, S. Kullander, E. Kupriyanova, É. Lacroix-Carignan, A. Lamaro, G. Lambert, I. Larridon, D. Lazarus, F. Le Coze, M. Le Roux, S. LeCroy, D. Leduc, E. J. Lefkowitz, R. Lemaitre, É. Léveillé-Bourret, M. Licher, I. H. Lichter-Marck, S. C. Lim, D. Lindsay, Y. Liu, B. Loeuille, R. Lois, A. N. Lörz, Y. F. Lu, M. Luceño Garcés, m. Ludwig, N. Lundholm, J. Maciel Silva, E. Macpherson, C. Mah, T. Mamos, R. Manconi, M. Mańko, G. Mapstone, N. Marco Rosado, P. E. Marek, K. Marhold, K. Markello, J. I. Márquez-Corro, B. Marshall, D. J. Marshall, P. Martin, S. Martín-Bravo, P. Martinez Arbizu, S. Maslakova, C. McFadden, S. J. McInnes, R. McKenzie, J. Means, J. Mees, H. H. Mejía-Madrid, K. Meland, K. L. Merrin, A. Mesterházy, M. Míguez, J. Miller, C. Mills, Ø. Moestrup, V. Mokievsky, T. Molodtsova, R. Mooi, A. Morales-Alonso, A. C. Morandini, R. da Rocha, J. Morel, L. D. Moreyra C., L. Moritz, C. Morrow, J. Mortelmans, M. A. Muasya, A. Müller, A. R. Muñoz Gallego, P. Muñoz Schüler, L. Musco, R. F. C. Naczi, J. B. Nascimento, G. Nesom, M. d. S. Neto Silva, E. Neubert, B. Neuhaus, P. Ng, A. D. Nguyen, C. Nielsen, S. Nielsen, T. Nishikawa, J. Norenburg, C. Nunes, T. O'Hara, D. Opresko, M. Osawa, H. J. Osigus, Y. Ota, B. Páll-Gergely, J. L. Panero, A. Parra-Gómez, D. Patterson, M. Pedram, P. Pelser, R. Peña Santiago, G. Perbiche-Neves, J. d. S. .. Pereira, P. H. M. Pereira, S. G. G. Pereira, L. Pereira-Silva, M. Perez-Losada, I. Petrescu, T. Pfingstl, W. Piasecki, D. Pica, B. Picton, J. Pignatti, J. F. Pilger, U. Pinheiro, A. B. Pisera, B. Poatskievick Pierezan, D. Polhemus, G. C. Poore, M. Potapova, R. A. Praxedes, V. Půža, F. Rasaminirina, G. Read, M. Reich, J. D. Reimer, H. Reip, V. Resende Bueno, M. Reuscher, J. W. Reynolds, A. A. Reznicek, I. Richling, F. Rimet, G. Rink, P. Ríos, M. Rius, E. Rodríguez, D. C. Rogers, N. Roque, G. Rosenberg, K. Rützler, H. A. B. .. Sá, M. Saavedra, L. M. Sabater, K. Sabbe, R. Sabroux, J. Saiz-Salinas, S. Sala, K. Samimi-Namin, N. Sánchez Santos, R. Sánchez-Villegas, S. Santagata, S. Santos, S. G. Santos, M. A. B. d. Santos Filho, M. Sanz Arnal, E. Sar, T. Saucède, L. Schärer, B. Schierwater, E. Schilling, A. Schmidt-Lebuhn, L. Schneider, S. Schneider, C. Schönberg, J. Schrével, P. Schuchert, C. Schweitzer, J. C. Semple, A. R. Senna, A. Sennikov, C. Serejo, S. Shaik, S. Shamsi, J. Sharma, W. A. Shear, N. Shenkar, M. Short, J. Sicinski, P. Sierwald, M. L. C. N. Silva, P. J. da Silva Filho, E. Simmons, D. A. Simpson, F. Sinniger, C. Sinou, D. Sivell, H. Smit, N. Smit, N. Smol, M. V Sørensen, J. F. .. Souza-Filho, D. Spalink, J. Spelda, J. R. Starr, W. Sterrer, H. M. Steyn, P. Stoev, S. Stöhr, E. Suárez-Morales, A. Susanna, C. Suttle, B. J. Swalla, K. T. Takahashi, M. Tanaka, A. H. Tandberg, D. Tang, M. Tasker, J. Taylor, J. Taylor, K.

- Taylor, A. Tchesunov, E. Temereva, H. ten Hove, J. J. ter Poorten, K. Thirouin, J. D. Thomas, W. W. Thomas, E. V Thuesen, M. Thurston, B. Thuy, J. T. Timi, A. Todaro, J. Todd, G. C. Tucker, X. Turon, S. Tyler, P. Uetz, L. Urbatsch, J. Uribe-Palomino, E. Urtubey, S. Utevsky, M. Uy, J. Vacelet, W. Vader, R. Väinölä, A. Valdés-Flórido, G. Valls Domedel, B. de Vijver, T. van Haaren, R. W. van Soest, A. Vanreusel, B. Vázquez-García, V. Venekey, T. Verhoeff, F. Verloove, T. Villaverde, M. Vinarski, R. Vonk, C. Vos, A. A. Vouilloud, G. Walker-Smith, T. C. Walter, L. Watling, M. Wayland, T. Wesener, C. E. Wetzel, C. Whipps, K. White, U. Wieneke, D. M. Williams, G. Williams, N. Williams, K. L. Wilson, R. Wilson, J. Witkowski, M. Xanthos, J. Xavier, K. Xu, O. Yano, J. Zanol, W. Zeidler, S. Zhang, Z. Zhao, and A. Zullini. 2025. "World Register of Marine Species (WoRMS)."
- Andaloro, Franco, and Carlo Pipitone. 1997. *Food and Feeding Habits of the Amberjack, Seriola Dumerili in the Central Mediterranean Sea during the Spawning Season*. Vol. 3.
- Angelakopoulos, Rafael, Andreas Tsipourlianos, Nikos Mitrizakis, Nikos Papandroulakis, and Katerina A. Moutou. n.d. *THE INFLUENCE OF REARING TEMPERATURES AND LIVE FEEDS ON WHITE MUSCLE 1 DEVELOPMENT IN GREATER AMBERJACK 2*.
- Aral, Faruk, Erdinc Sahnoz, and Zafer Dogu. 2011. "Embryonic and Larval Development of Freshwater Fish." in *Recent Advances in Fish Farms*. InTech.
- Araújo, J. E., D. Madeira, R. Vitorino, T. Repolho, R. Rosa, and M. Diniz. 2018. "Negative Synergistic Impacts of Ocean Warming and Acidification on the Survival and Proteome of the Commercial Sea Bream, Sparus Aurata." *Journal of Sea Research* 139:50–61. doi:10.1016/j.seares.2018.06.011.
- Arya, M. ., Shergill, I. S. ., Williamson, M. ., Gommersall, L. ., Arya, N. ., & Patel, H. R. 2005. "Basic Principles of Real-Time Quantitative PCR." *Expert Review of Molecular Diagnostics* 5(2):209–19.
- Badalamenti, F. ., D'Anna, G. ., Lopiano, L. ., Scilipoti, D. ., & Mazzola, A. 1995. "Feeding Habits of Young-of-the-Year Greater Amberjack Seriola Dumerili (Risso, 1810) along the N/W Sicilian Coast." 59.
- Baker, David H. 2004. *MINIREVIEW Iodine Toxicity and Its Amelioration*. Vol. 229.
- Barany, Andre, Neda Gilannejad, María Alameda-López, Liliana Rodríguez-Velásquez, Antonio Astola, Gonzalo Martínez-Rodríguez, Javier Roo, Jose Luis Muñoz, and Juan Miguel Mancera. 2021. "Osmoregulatory Plasticity of Juvenile Greater Amberjack (Seriola Dumerili) to Environmental Salinity." *Animals* 11(9). doi:10.3390/ani11092607.

- Bauchot M.L., M. + Schneider, and +. 1987. "Poissons Osseux, Fiches FAO d'identification Pour Les Besoins de La Pêche." *Fiches FAO d'identification Pour Les Besoins de La Pêche (Rev.1)* 2:891–1421.
- Bela Szecsi, Pal. 2013. "Pepsin B." *Handbook of Proteolytic Enzymes* 1:36–37. doi:10.1016/B978-0-12-382219-2.00004-1.
- Cara, B., F. J. Moyano, J. L. Zambonino, and C. Fauvel. 2007. "Trypsin and Chymotrypsin as Indicators of Nutritional Status of Post-Weaned Sea Bass Larvae." *Journal of Fish Biology* 70(6):1798–1808. doi:10.1111/j.1095-8649.2007.01457.x.
- Chen, Ben N., Jian G. Qin, Martin S. Kumar, Wayne G. Hutchinson, and Steven M. Clarke. 2006. "Ontogenetic Development of Digestive Enzymes in Yellowtail Kingfish *Seriola Lalandi* Larvae." *Aquaculture* 260(1–4):264–71. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.06.021.
- Cikoš, Štefan, Alexandra Bukovská, and Juraj Koppel. 2007. "Relative Quantification of mRNA: Comparison of Methods Currently Used for Real-Time PCR Data Analysis." doi:10.1186/1471-2199-8-113.
- Conceição, Luís E. C., Manuel Yúfera, Pavlos Makridis, Sofia Morais, and Maria Teresa Dinis. 2010a. "Live Feeds for Early Stages of Fish Rearing." *Aquaculture Research* 41(5):613–40.
- Conceição, Luís E. C., Manuel Yúfera, Pavlos Makridis, Sofia Morais, and Maria Teresa Dinis. 2010b. "Live Feeds for Early Stages of Fish Rearing." *Aquaculture Research* 41(5):613–40.
- Dragan, A. I., R. Pavlovic, J. B. McGivney, J. R. Casas-Finet, E. S. Bishop, R. J. Strouse, M. A. Schenerman, and C. D. Geddes. 2012. "SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA." *Journal of Fluorescence* 22(4):1189–99. doi:10.1007/s10895-012-1059-8.
- Dunn, Ben M., and Su Hwi Hung. 2000. "The Two Sides of Enzyme–Substrate Specificity: Lessons from the Aspartic Proteinases." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477(1–2):231–40. doi:10.1016/S0167-4838(99)00275-7.
- Durrieu de Madron, X., C. Guieu, R. Sempéré, P. Conan, D. Cossa, F. D'Ortenzio, C. Estournel, F. Gazeau, C. Rabouille, L. Stemmann, S. Bonnet, F. Diaz, P. Koubbi, O. Radakovitch, M. Babin, M. Baklouti, C. Bancon-Montigny, S. Belviso, N. Bensoussan, B. Bonsang, I. Bouloubassi, C. Brunet, J. F. Cadiou, F. Carlotti, M. Chami, S. Charmasson, B. Charrière, J. Dachs, D. Doxaran, J. C. Dutay, F. Elbaz-Poulichet, M. Eléaume, F. Eyrolles, C. Fernandez, S. Fowler, P. Francour, J. C. Gaertner, R. Galzin, S. Gasparini, J. F. Ghiglione, J. L. Gonzalez, C. Goyet, L. Guidi,

K. Guizien, L. E. Heimbürger, S. H. M. Jacquet, W. H. Jeffrey, F. Joux, P. Le Hir, K. Leblanc, D. Lefèvre, C. Lejeusne, R. Lemé, M. D. Loÿe-Pilot, M. Mallet, L. Méjanelle, F. Mélin, C. Mellon, B. Mérigot, P. L. Merle, C. Migon, W. L. Miller, L. Mortier, B. Mostajir, L. Mousseau, T. Moutin, J. Para, T. Pérez, A. Petrenko, J. C. Poggiale, L. Prieur, M. Pujo-Pay, Pulido-Villena, P. Raimbault, A. P. Rees, C. Ridame, J. F. Rontani, D. Ruiz Pino, M. A. Sicre, V. Taillandier, C. Tamburini, T. Tanaka, I. Taupier-Letage, M. Tedetti, P. Testor, H. Thébault, B. Thouvenin, F. Touratier, J. Tronczynski, C. Ulses, F. Van Wambeke, V. Vantrepotte, S. Vaz, and R. Verney. 2011. "Marine Ecosystems' Responses to Climatic and Anthropogenic Forcings in the Mediterranean." *Progress in Oceanography* 91(2):97–166. doi:10.1016/J.POCEAN.2011.02.003.

EUROPEAN PATENT SPECIFICATION • FOSS R D ET AL: "Effects of Fixative and Fixation Time on the Extraction and Polymerase Chain Reaction Amplification of RNA From Paraffin-embedded Tissue Comparison of Two Housekeeping Gene mRNA Controls." 2010.

Gamberoni, P., M. Yúfera, V. de las Heras, I. Siguero, N. Gilannejad, G. Martínez-Rodríguez, and C. Navarro-Guillén. 2021a. "Ontogeny and Diurnal Patterns of Molecular Gene Expression and Activity of Digestive Enzymes in Developing Greater Amberjack." *Aquaculture* 534:736330. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2020.736330.

Gamberoni, P., M. Yúfera, V. de las Heras, I. Siguero, N. Gilannejad, G. Martínez-Rodríguez, and C. Navarro-Guillén. 2021b. "Ontogeny and Diurnal Patterns of Molecular Gene Expression and Activity of Digestive Enzymes in Developing Greater Amberjack." *Aquaculture* 534. doi:10.1016/j.aquaculture.2020.736330.

Glasauer, Stella M. K., and Stephan C. F. Neuhauss. 2014. "Whole-Genome Duplication in Teleost Fishes and Its Evolutionary Consequences." *Mol Genet Genomics* 3:1045–60. doi:10.1007/s00438-014-0889-2.

Govoni', John J., George W. Boehlert², and Yoshirou Watanabe³. 1986. *The Physiology of Digestion in Fish Larvae*. Vol. 16. Dr W. Junk Publishers.

Gráf, László A., László A. Szilágyi, and István A. Venekei. 2013. "Chymotrypsin." *Handbook of Proteolytic Enzymes* 3:2626–33. doi:10.1016/B978-0-12-382219-2.00582-2.

Hamasaki, Katsuyuki, Koya Tsuruoka, Kazuhisa Teruya, Hiroshi Hashimoto, Kazuhisa Hamada, Takuro Hotta, and Keiichi Mushiake. 2009. "Feeding Habits of Hatchery-Reared Larvae of Greater Amberjack *Seriola Dumerili*." *Aquaculture* 288(3–4):216–25. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2008.11.032.

- Hamre, K., A. Srivastava, I. Rønnestad, A. Mangor-Jensen, and J. Stoss. n.d. "Several Micronutrients in the Rotifer *Brachionus* Sp. May Not Fulfil the Nutritional Requirements of Marine Fish Larvae." doi:10.1111/j.1365-2095.2007.00504.x.
- Heda Rajiv, Fadi Toro, and Claudio R Tombazzi. 2019. "Physiology, Pepsin. [Updated 2023 May 1] ."
- Jan Vos, and Nympha L. de la Rosa. 1980. "MANUAL ON ARTEMIA PRODUCTION IN SALT PONDS IN THE PHILIPPINES." <https://www.fao.org/4/AC062E/AC062E01.htm>.
- Jesús-De La Cruz, Kristal, · Carlos, Alfonso Álvarez-González, · Emyr Peña, · José, Antonio Morales-Contreras, and · Ángela Ávila-Fernández. 2023. "Fish Trypsins: Potential Applications in Biomedicine and Prospects for Production." 1:186. doi:10.1007/s13205-018-1208-0.
- Kasahara, Masanori. 2007. "The 2R Hypothesis: An Update." *Current Opinion in Immunology* 19(5):547–52. doi:10.1016/j.coi.2007.07.009.
- Kimmel, Charles B., William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, and Thomas F. Schilling. 1995a. "Stages of Embryonic Development of the Zebrafish." *Developmental Dynamics* 203(3):253–310. doi:10.1002/AJA.1002030302.
- Kimmel, Charles B., William W. Ballard, Seth R. Kimmel, Bonnie Ullmann, and Thomas F. Schilling. 1995b. "Stages of Embryonic Development of the Zebrafish." *Developmental Dynamics* 203(3):253–310. doi:10.1002/aja.1002030302.
- Lallès, Jean Paul. 2020. "Intestinal Alkaline Phosphatase in the Gastrointestinal Tract of Fish: Biology, Ontogeny, and Environmental and Nutritional Modulation." *Reviews in Aquaculture* 12(2):555–81. doi:10.1111/RAQ.12340.
- Larsen, Am, HH Mohammed, CR Arias, and Correspondence R. Cova Arias. 2014. "Characterization of the Gut Microbiota of Three Commercially Valuable Warmwater Fish Species." doi:10.1111/jam.12475.
- Lazo, Juan Pablo, Maria J. Darias, and Enric Gisbert. 2011. "Ontogeny of the Digestive Tract." *Larval Fish Nutrition* 3–46. doi:10.1002/9780470959862.CH1,.
- Lesser M. P. 2006. "Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. ." *Annual Review of Physiology* 68:253–78.
- Loufi, Katerina, Ioannis E. Papadakis, and Pavlos Makridis. 2024. "The Use of *Acartia tonsa* Nauplii during the First Days of Feeding on the Ontogeny of the Digestive System of Greater Amberjack (*Seriola Dumerili* Risso, 1810)." *Aquaculture Nutrition* 2024. doi:10.1155/2024/1826300.

- Loufi, Katerina, Ioannis E Papadakis, and Pavlos Makridis. 2024. "The Use of Acartia Tonsa Nauplii during the First Days of Feeding on the Ontogeny of the Digestive System of Greater Amberjack (*Seriola Dumerili* Risso, 1810)." doi:10.1155/2024/1826300.
- Lubzens, Esther, and Odi Zmora. 2003. "Production and Nutritional Value of Rotifers." *Live Feeds in Marine Aquaculture* 17–64. doi:10.1002/9780470995143.CH2,.
- Ma, Zhenhua, Huayang Guo, Panlong Zheng, Long Wang, Shigui Jiang, Jian G. Qin, and Dianchang Zhang. 2014. "Ontogenetic Development of Digestive Functionality in Golden Pompano *Trachinotus Ovatus* (Linnaeus 1758)." *Fish Physiology and Biochemistry* 40(4):1157–67. doi:10.1007/s10695-014-9912-0.
- Madeira, Diana, Catarina Vinagre, and Mário S. Diniz. 2016. "Are Fish in Hot Water? Effects of Warming on Oxidative Stress Metabolism in the Commercial Species *Sparus Aurata*." *Ecological Indicators* 63:324–31. doi:10.1016/j.ecolind.2015.12.008.
- Malzahn, Arne M., Deni Ribičić, Bjørn Henrik Hansen, Antonio Sarno, Elin Kjørsvik, Anna Sigrd Norberg Aase, Luciana Alves Musialak, Laura García-Calvo, and Andreas Hagemann. 2022. "First Feed Matters: The First Diet of Larval Fish Programmes Growth, Survival, and Metabolism of Larval Ballan Wrasse (*Labrus Bergylta*)." *Aquaculture* 561. doi:10.1016/j.aquaculture.2022.738586.
- Marcogliese, D. J. 2008. *The Impact of Climate Change on the Parasites and Infectious Diseases of Aquatic Animals*. Vol. 27.
- Maulu, Sahya, Oliver J. Hasimuna, Lloyd H. Haambiya, Concillia Monde, Confred G. Musuka, Timothy H. Makorwa, Brian P. Munganga, Kanyembo J. Phiri, and Jean Da Mascene Nsekanabo. 2021. "Climate Change Effects on Aquaculture Production: Sustainability Implications, Mitigation, and Adaptations." *Frontiers in Sustainable Food Systems* 5.
- Mazzola, Antonio, Eugenia Favalaro, and Gianluca Sarà. 2000. "Cultivation of the Mediterranean Amberjack, *Seriola Dumerili* (Risso, 1810), in Submerged Cages in the Western Mediterranean Sea." *Aquaculture* 181(3–4):257–68. doi:10.1016/S0044-8486(99)00243-4.
- Milián-Sorribes, Maria Consolación, Silvia Martínez-Llorens, David S. Peñaranda, Ignacio Jauralde, Miguel Jover-Cerdá, and Ana Tomás-Vidal. 2024. "Growth, Survival, and Intestinal Health Alterations in Mediterranean Yellowtail (*Seriola Dumerili*) Due to Alternatives to Fishmeal and Fish Oil." *Current Issues in Molecular Biology* 46(1):753–72. doi:10.3390/CIMB46010049.

- Miyashita, Shigeru, Keitaro Kato, Yoshifumi Sawada, Osamu Murata, Yutaka Ishitani, Kiyokazu Shimizu, Shinji Yamamoto, and Hidemi Kumai. 1998. *Development of Digestive System and Digestive Enzyme Activities of Larval and Juvenile Bluefin Tuna, Thunnus Thynnus, Reared in the Laboratory*. Vol. 46.
- Munilla-Mordn, R., and F. Saborido-Rey. 1996. *Digestive Enzymes in Marine Species. II. Amylase Activities in Gut from Seabream (Sparus Aurata), Turbot (Scophthalmus Maximus) and Redfish (Sebastes Mentella)*. Vol. 113.
- Navarro-Guillén, C., E. Perera, D. Pérez-Hilario, J. A. Martos-Sitcha, L. Molina-Roque, S. F. Gregorio, F. Fonseca, J. Fuentes, and M. Yúfera. 2025. "Digestive and Metabolic Consequences of On-Growing Greater Amberjack (*Seriola Dumerili*) Juveniles at Different Temperatures. In-Vivo and Ex-Vivo Assessment." *Aquaculture* 598:742011. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2024.742011.
- Navarro-Guillén, Carmen, Manuel Yúfera, and Erick Perera. 2022. "Biochemical Features and Modulation of Digestive Enzymes by Environmental Temperature in the Greater Amberjack, *Seriola Dumerili*." *Frontiers in Marine Science* 9. doi:10.3389/fmars.2022.960746.
- Papandroulakis, N., C. C. Mylonas, E. Maingot, and P. Divanach. 2005. "First Results of Greater Amberjack (*Seriola Dumerili*) Larval Rearing in Mesocosm." *Aquaculture* 250(1–2):155–61. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.02.036.
- Paralika, Vasiliki, Fotini Kokou, Stelios Karapanagiotis, and Pavlos Makridis. 2023. "Characterization of Host-Associated Microbiota and Isolation of Antagonistic Bacteria from Greater Amberjack (*Seriola Dumerili*, Risso, 1810) Larvae." *Microorganisms* 11(8). doi:10.3390/microorganisms11081889.
- Pavelka, Stanislav, Arno Št Babick ýbabick ý, Miloslav Vobeck ý, Vobeck ý Vobeck ý, and Jaroslav Lener. 2001. *High Bromide Intake Affects the Accumulation of Iodide in the Rat Thyroid and Skin***. Vol. 133.
- Pavlidis, M., E. Karantzali, E. Fanouraki, C. Barsakis, S. Kollias, and N. Papandroulakis. 2011. "Onset of the Primary Stress in European Sea Bass *Dicentrarchus Labrax*, as Indicated by Whole Body Cortisol in Relation to Glucocorticoid Receptor during Early Development." *Aquaculture* 315(1–2):125–30. doi:10.1016/J.AQUACULTURE.2010.09.013.
- Paxton, J. R., D.F. Hoese, G.R. Allen, and J.E. Hanley. 1989. "Pisces. Petromyzontidae to Carangidae. ." *Zoological Catalogue of Australia* 7:665.
- Penglase, S., T. Harboe, Ø. Saele, S. Helland, A. Nordgreen, and K. Hamre. 2013. "Iodine Nutrition and Toxicity in Atlantic Cod (*Gadus Morhua*) Larvae." doi:10.7717/peerj.20.

- Pérez, José A., Ioannis E. Papadakis, Nikos Papandroulakis, Lorenzo Cruces, Efthimia Cotou, Enric Gisbert, Antonio Lorenzo, Constantinos C. Mylonas, and Covadonga Rodríguez. 2020a. "The Ontogeny of Greater Amberjack Digestive and Antioxidant Defence Systems under Different Rearing Conditions: A Histological and Enzymatic Approach." *Aquaculture Nutrition* 26(6):1908–25. doi:10.1111/anu.13128.
- Pérez, José A., Ioannis E. Papadakis, Nikos Papandroulakis, Lorenzo Cruces, Efthimia Cotou, Enric Gisbert, Antonio Lorenzo, Constantinos C. Mylonas, and Covadonga Rodríguez. 2020b. "The Ontogeny of Greater Amberjack Digestive and Antioxidant Defence Systems under Different Rearing Conditions: A Histological and Enzymatic Approach." *Aquaculture Nutrition* 26(6):1908–25. doi:10.1111/ANU.13128.
- R Core Team (2020) R A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. - References - Scientific Research Publishing. n.d. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=2938122>.
- Remen, Mette, Marit A. J. Nederlof, Ole Folkedal, Grethe Thorsheim, Ariadna Sitjà-Bobadilla, Jaume Pérez-Sánchez, Frode Oppedal, and Rolf Erik Olsen. 2015. "Effect of Temperature on the Metabolism, Behaviour and Oxygen Requirements of *Sparus Aurata*." *Aquaculture Environment Interactions* 7(2):115–23. doi:10.3354/aei00141.
- Ribeiro, L., J. L. Zambonino-Infante, C. Cahu, and M. T. Dinis. 2002. *Digestive Enzymes Profile of Solea Senegalensis Post Larvae Fed Artemia and a Compound Diet*. Vol. 27.
- Ribeiro, Laura, Ana Couto, Mercedes Olmedo, Blanca Álvarez-Blázquez, Fátima Linares, and Luísa M. P. Valente. 2008. "Digestive Enzyme Activity at Different Developmental Stages of Blackspot Seabream, *Pagellus Bogaraveo* (Brunnich 1768)." *Aquaculture Research* 39(4):339–46. doi:10.1111/J.1365-2109.2007.01684.X.
- Rodríguez J. L. 2022. "Physiological Differences in Digestion between Carnivorous Fishes and Omnivorous Fishes." <https://www.veterinariadigital.com/en/articulos/physiological-differences-in-digestion-between-carnivorous-fishes-and-omnivorous-fishes/>.
- Rønnestad, I., S. K. Tonheim, H. J. Fyhn, C. R. Rojas-García, Y. Kamisaka, W. Koven, R. N. Finn, B. F. Terjesen, Y. Barr, and L. E. C. Conceição. 2003. "The Supply of Amino Acids during Early Feeding Stages of Marine Fish Larvae: A Review of Recent Findings." Pp. 147–64 in *Aquaculture*. Vol. 227. Elsevier.

- Rønnestad, Ivar, Manuel Yúfera, Bernd Ueberschär, Laura Ribeiro, Øystein Sæle, and Clara Boglione. 2013. "Feeding Behaviour and Digestive Physiology in Larval Fish: Current Knowledge, and Gaps and Bottlenecks in Research." *Reviews in Aquaculture* 5(SUPPL.1). doi:10.1111/RAQ.12010.
- Sae-Lim, Panya, Antti Kause, Marie Lillehammer, and Han A. Mulder. 2017. "Estimation of Breeding Values for Uniformity of Growth in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*) Using Pedigree Relationships or Single-Step Genomic Evaluation." *Genetics Selection Evolution* 49(1). doi:10.1186/s12711-017-0308-3.
- Samat, Nur Amalina, Fatimah Md Yusoff, Nadiah W. Rasdi, and Murni Karim. 2020. "Enhancement of Live Food Nutritional Status with Essential Nutrients for Improving Aquatic Animal Health: A Review." *Animals : An Open Access Journal from MDPI* 10(12):2457. doi:10.3390/ANI10122457.
- Schreiber, Milena Arias, Miguel Ñiquen, and Marilú Bouchon. 2011. "Coping Strategies to Deal with Environmental Variability and Extreme Climatic Events the Peruvian Anchovy Fishery." *Sustainability* 3(6):823–46. doi:10.3390/su3060823.
- Smith-Vaniz, W. F. 1984. "Western Indian Ocean Fishing Area 51." 1.
- Tang, Jordan. 2013. "Pepsin A." *Handbook of Proteolytic Enzymes* 1:27–35. doi:10.1016/B978-0-12-382219-2.00003-X.
- Teles, Andressa, Joan Salas-Leiva, Carlos Alfonso Alvarez-González, and Dariel Tovar-Ramírez. 2019a. "Changes in Digestive Enzyme Activities during Early Ontogeny of *Seriola Rivoliana*." *Fish Physiology and Biochemistry* 45(2):733–42. doi:10.1007/s10695-018-0598-6.
- Teles, Andressa, Joan Salas-Leiva, Carlos Alfonso Alvarez-González, and Dariel Tovar-Ramírez. 2019b. "Changes in Digestive Enzyme Activities during Early Ontogeny of *Seriola Rivoliana*." *Fish Physiology and Biochemistry* 45(2):733–42. doi:10.1007/s10695-018-0598-6.
- The UniProt Consortium. 2025. "UniProt: The Universal Protein Knowledgebase in 2025." *Nucleic Acids Research* 53:609–17. doi:10.1093/nar/gkae1010.
- Tian, Yali, Hang Li, Dongying Zhang, Chen Wang, Ruijuan Hao, Xiaoying Ru, Qin Hu, Yang Huang, and Chunhua Zhu. 2024. "Effect of Marine Heatwaves on Juvenile Greater Amberjack (*Seriola Dumerili*)." *Marine Environmental Research* 193. doi:10.1016/j.marenvres.2023.106302.
- Tlak Gajger, Ivana, Srebrenka Nejedli, Zvonimir Kozarić, and Josipa Vlainić. 2024. "Histochemical Analysis and Distribution of Digestive Enzymes in the Gastrointestinal System of the European Barracuda *Sphyrna Sphyrna*

- (Linnaeus, 1758).” *Animals : An Open Access Journal from MDPI* 14(19):2798.
doi:10.3390/ANI14192798.
- Trainer, Vera L., Stephanie K. Moore, Gustaaf Hallegraeff, Raphael M. Kudela, Alejandro Clement, Jorge I. Mardones, and William P. Cochlan. 2020. “Pelagic Harmful Algal Blooms and Climate Change: Lessons from Nature’s Experiments with Extremes.” *Harmful Algae* 91:101591. doi:10.1016/J.HAL.2019.03.009.
- Vandesompele, Jo, Katleen De Preter, ilip Pattyn, Bruce Poppe, Nadine Van Roy, Anne De Paepe, and rank Speleman. 2002. “Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes.”
- Yang, Sang Geun, Sang Woo Hur, Seung Cheol Ji, Sang Gu Lim, Bong Seok Kim, Minhwan Jeong, Chi Hoon Lee, and Young-Don Lee. 2016. “Morphological Development of Embryo, Larvae and Juvenile in Yellowtail Kingfish, *Seriola Lalandi*.” *Development & Reproduction* 20(2):131–40.
doi:10.12717/dr.2016.20.2.131.
- Yu, Daqi, Yandong Ren, Masahiro Uesaka, Alan J. S. Beavan, Matthieu Muffato, Jieyu Shen, Yongxin Li, Iori Sato, Wenting Wan, James W. Clark, Joseph N. Keating, Emily M. Carlisle, Richard P. Dearden, Sam Giles, Emma Randle, Robert S. Sansom, Roberto Feuda, James F. Fleming, Fumiaki Sugahara, Carla Cummins, Mateus Patricio, Wasiu Akanni, Salvatore D’Aniello, Cristiano Bertolucci, Naoki Irie, Cantas Alev, Guojun Sheng, Alex de Mendoza, Ignacio Maeso, Manuel Irimia, Bastian Fromm, Kevin J. Peterson, Sabyasachi Das, Masayuki Hirano, Jonathan P. Rast, Max D. Cooper, Jordi Paps, Davide Pisani, Shigeru Kuratani, Fergal J. Martin, Wen Wang, Philip C. J. Donoghue, Yong E. Zhang, and Juan Pascual-Anaya. 2024. “Hagfish Genome Elucidates Vertebrate Whole-Genome Duplication Events and Their Evolutionary Consequences.” *Nature Ecology & Evolution* 8(3):519.
doi:10.1038/S41559-023-02299-Z.
- Zhang, Feifei, and Richard E. Broughton. 2013. “Mitochondrial-Nuclear Interactions: Compensatory Evolution or Variable Functional Constraint among Vertebrate Oxidative Phosphorylation Genes?” *Genome Biology and Evolution* 5(10):1781–91.
doi:10.1093/GBE/EVT129,.
- Βουλτσιάδου Ε., Αμπατζόπουλος Θ., Αντωνοπούλου Ε., Γκάνιας Κ., Γκέλης Σ., Στάικου Α., and Τριανταφυλλίδης Α. 2015. “Υδατοκαλλιέργειες” – Ορισμοί, Συστήματα παραγωγής, προοπτικές Κεφάλαιο 3 Καλλιέργεια ιχθύων: διατροφή και θρέψη. Κάλλιπος. Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.