



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής & Εξελικτικής Βιολογίας

Η επίδραση των συνθηκών εκτροφής στην οντογένεση μυϊκών
γονιδίων στο μαγιάτικο (*Seriola dumerili*)

The effect of rearing conditions on the ontogenesis of muscle genes
in greater amberjack (*Seriola dumerili*)



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΤΣΟΥΓΙΑ ΕΛΕΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ, 2019

Τριμελής επιτροπή

Μούτου Αικατερίνη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών -
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας - Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σαραφίδου Θεολογία, Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Οργανισμών - Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας – Πανεπιστήμιο
Θεσσαλίας

Σταμάτης Κωνσταντίνος, Μέλος εργαστηριακού διδακτικού προσωπικού
(Ε.ΔΙ.Π) – Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας – Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της κ. Κατερίνας Μούτου την οποία θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποτελέσω μέλος του εργαστηρίου, για την συνεργασία της καθώς και για την πολύτιμη βοήθειά της.

Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υποψήφιο διδάκτορα Ανδρέα Τσιπουρλιάνο, όσο και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για την συνεχή στήριξη και βοήθεια που μου προσέφεραν.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της τριμελούς επιτροπής κ. Θεολογία Σαραφίδου και κ. Σταμάτη Κωνσταντίνο.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) είναι ένα ψάρι το οποίο εμφανίζει παγκόσμια κατανομή και ισχυρή παρουσία στη Μεσόγειο. Το μαγιάτικο παρουσιάζει χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό για την εκτροφή του σε περιβάλλον ιχθυοκαλλιέργειας, ενώ η δράση αυτή επιφέρει οφέλη στην οικονομία. Η αποδοτική εκτροφή προϋποθέτει την δημιουργία των κατάλληλων συνθηκών οι οποίες θα ευνοήσουν την ανάπτυξη των ατόμων στην ιχθυοκαλλιέργεια.

Μια από τις συνθήκες που εφαρμόζονται στην ιχθυοκαλλιέργεια και θα μπορούσε να επιδράσει στην αποτελεσματικότητα της διαδικασίας, είναι το χρώμα της δεξαμενής στην οποία εκτρέφονται τα άτομα του είδους. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η πιθανή επίδραση τριών χρωμάτων στην ανάπτυξη των ατόμων. Πιο συγκεκριμένα, τα χρώματα τα οποία μελετήθηκαν ήταν το πράσινο, το λευκό και το μαύρο χρώμα.

Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης των χρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στις δεξαμενές εκτροφής του μαγιάτικου, στην μυϊκή ανάπτυξη. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκε η επίδραση των χρωμάτων στην έκφραση των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b, τα οποία είναι γονίδια που κωδικοποιούν την ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης. Η μελέτη της έκφρασης των δύο αυτών παραλόγων γονιδίων πραγματοποιήθηκε σε συγκεκριμένα στάδια κατά την πρώιμη ανάπτυξη των ατόμων και πιο συγκεκριμένα στην 3^η, 5^η, 17^η, 25^η και 30^η ημέρα μετά την εκκόλαψη. Η μελέτη γονιδιακής έκφρασης πραγματοποιήθηκε μέσω της τεχνικής Real-Time PCR, ενώ για την αξιοποίηση των δεδομένων που λήφθηκαν από αυτή, έγινε αναζήτηση και ταυτοποίηση ιδιοστατικών γονιδίων και χρήση των τεσσάρων πιο σταθερών από αυτά (ELF1, FAU, RPS18, RPL13).

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι πράγματι το χρώμα επιδρά στην έκφραση των δύο αυτών μυϊκών γονιδίων, με τις σχετικές εκφράσεις αυτών στις τρεις διαφορετικές χρωματικές συνθήκες να παρουσιάζουν διαφορετικές πορείες. Στην λευκή δεξαμενή κατά την 25^η ημέρα, παρατηρήθηκε η μείωση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου MYLPF-b με την ταυτόχρονη αύξηση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου MYLPF-a, κάτι το οποίο βιολογικά σηματοδοτεί την έναρξη και υπερίσχυση της διαδικασίας της μυϊκής υπερτροφίας, έναντι της μυϊκής υπερπλασίας, κάτι το οποίο ερμηνεύεται ως επιτάχυνση της μυϊκής ανάπτυξης.

Τέλος, πραγματοποιήθηκε φυλογενετική ανάλυση μέσω της οποίας διαπιστώθηκε ότι τα γονίδια MYLPF-a και MYLPF-b τα οποία είναι παράλογα, έχουν προκύψει από τον τρίτο γύρο διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος που αφορά τους τελεόστεους.

ABSTRACT

Greater Amberjack (*Seriola dumerili*) is a fish with a worldwide distribution and intense presence in the Mediterranean. Greater Amberjack exhibits some traits that make it ideal to be reared in a fish farming environment, and this process is extremely beneficial to the economy. Efficient rearing requires the establishment of the right conditions which will favor the development of the individuals in aquaculture.

One parameter regarding the rearing conditions that could affect the effectiveness of the whole process is the colour of the tank in which the fish is reared. In this current study was analyzed the possible impact of three different colours on the development of the individuals. More specifically, the colours studied were the green, white and black.

The aim of the present study was to analyze the effect of the colors used in the rearing tanks in which Greater Amberjack developed, on muscle growth. More specifically, the effect of these three colours on the expression of the MYLPF-a and MYLPF-b genes, which are genes encoding the regulatory light chain of myosin, was investigated. The study of the expression of these two paralogs was carried out at specific stages during the early development of the individuals and in particular on the 3rd, 5th, 17th, 25th and 30th days after hatching. The gene expression analysis conducted with the Real-Time PCR analysis, while in order the data of this analysis to be used, we searched and identified some housekeeping genes, and utilized the four of them which show the highest stability (ELF1, FAU, RPS18, RPL13).

The results indicated that the colour actually affects the expression of the two muscle genes, with their relative expression to present different patterns, in different colour conditions. In the white tank on the 25th day, the decrease in the relative expression of the MYLPF-b gene accompanied with the simultaneous increase in the relative expression of the MYLPF-a gene, which biologically signals the onset and prevalence of the muscle hypertrophy against muscle hyperplasia, which is interpreted as the acceleration of muscle growth.

Lastly, regarding the paralogs MYLPF-a and MYLPF-b the phylogenetic analysis showed that they are a result of the 3rd round of the whole genome duplication which refers to the teleost.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
ABSTRACT	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 Το μαγιάτικο	8
1.2 Ιχθυοκαλλιέργεια	9
1.3 Συνθήκες εκτροφής	10
1.4 Αναπαραγωγή και Ανάπτυξη	11
1.4.1 Η ανάπτυξη των μυών	15
1.4.2 Η εμβρυική μυϊκή ανάπτυξη	15
1.4.3 Μεταεμβρυική μυϊκή ανάπτυξη.....	16
1.5 Η μουσίνη	18
1.5.1 Οι ελαφριές ρυθμιστικές αλυσίδες της μουσίνης	19
1.6 Διπλασιασμός γονιδιώματος και παράλογα γονίδια.....	20
1.6.1 Ο πρώτος και ο δεύτερος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος στα σπονδυλωτά (1R & 2R).....	21
1.6.2 Ο τρίτος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος στους τελεόστεους (3R)	22
ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	24
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
2.1 Εξαγωγή Δεδομένων	25
2.2 Blast	25
2.3 Πολλαπλή στοίχιση	25
2.4 Φυλογενετική Ανάλυση.....	26
2.5 Συνταινικότητα	27
2.6 Δομή πρωτεΐνης	27
2.7 Γονιδιακή οργάνωση	27
2.8 Γονιδιακή έκφραση	28
2.8.1 Τα ιδιοστατικά γονίδια.....	28
2.8.2 Σχεδιασμός εκκινητών.....	29
2.8.3 Πρωτόκολλο αντίδρασης Real-Time PCR	29
2.8.4. Στατιστική ανάλυση.....	30
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	31
3.1 Φυλογενετική Ανάλυση.....	31
3.2 Ανάλυση συνταινικότητας.....	32
3.3 Δομή πρωτεϊνών.....	34

3.3.1 Δευτεροταγής δομή	34
3.3.2 Τριτοταγής δομή	35
3.4 Γονιδιακή δομή.....	36
3.5 Ιδιοστατικά γονίδια	37
3.5.1 Σχεδιασμός εκκινητών για τα ιδιοστατικά γονίδια	38
3.5.2 Σχεδιασμός εκκινητών για τα παράλογα γονίδια MYLPF-a και MYLPF-b	38
3.6 Αποδόσεις (E) των αντιδράσεων Real-Time που πραγματοποιήθηκαν	40
3.7 Κανονικοποίηση	41
3.8 Η έκφραση των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b	42
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	46
4.1 Η επίδραση του χρώματος της δεξαμενής.....	46
4.2 Διακύμανση των τιμών σχετικής έκφρασης των γονιδίων	47
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	48
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το μαγιάτικο

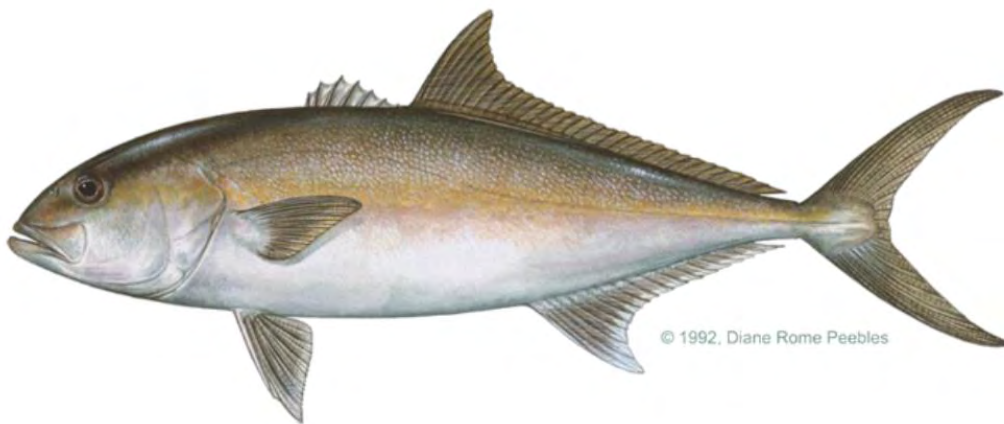
Το μαγιάτικο είναι ένα ψάρι το οποίο ανήκει στην οικογένεια των Carangidae (Πίνακας 1).

Το μαγιάτικο χαρακτηρίζεται από ένα σώμα ατρακτοειδούς σχήματος, πλευρικά συμπιεσμένου. Φέρει μυτερή κεφαλή, σχετικά μικρούς οφθαλμούς και μεγάλο στόμα, με το οπίσθιο τμήμα της άνω γνάθου να φτάνει στο μέσο του οφθαλμού. Τα δόντια του είναι μικρά και εκτείνονται σε μια ευρεία ζώνη τόσο στην άνω όσο και στην κάτω γνάθο. Τέλος, το σχήματος V ουραίο πτερύγιο είναι στρογγυλό ή σε σχήμα φεγγαριού, κάτι το οποίο το καθιστά αποτελεσματικό για γρήγορο κολύμπι κατά την αναζήτηση θηραμάτων (FAO, 2016).

Πίνακας 1 Ταξινομική κατάταξη του μαγιάτικου (*Seriola dumerilii*)

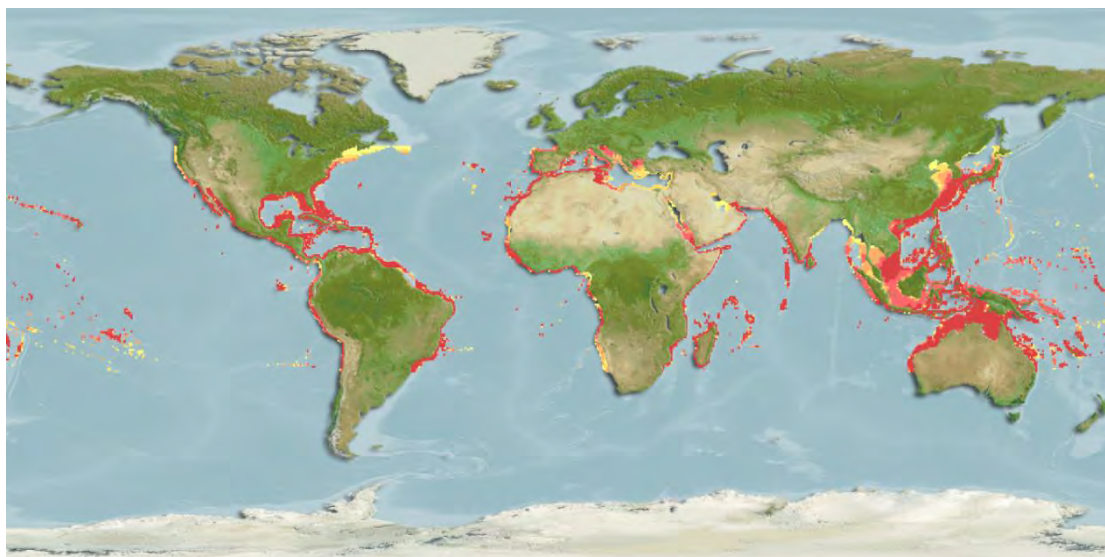
Βασίλειο	Φύλο	Υπόφυλο	Τάξη	Οικογένεια	Γένος
Ζώα	Χορδωτά	Σπονδυλωτά	Ακτινοπτερύγιοι	Carangidae	Seriola

Το μαγιάτικο έχει μια καφέ ή γαλαζοπράσινη ραχιαία πλευρά και μια ασημένια-λευκή κοιλιακή πλευρά. Διαθέτει μια πορτοκαλί λωρίδα τοποθετημένη στο μέσο της πλευρικής επιφάνειας του σώματός του. Τέλος, το μαγιάτικο έχει επίσης μια σκούρα «μάσκα» που εκτείνεται από την άνω γνάθο μέχρι το πρώτο ραχιαίο πτερύγιο (Βλ. Εικόνα 1) (FAO, 2016).



Εικόνα 1 Το μαγιάτικο (Property of the International Game Fish Association)

Απαντάται σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές του Ατλαντικού, του Ινδικού και του Ειρηνικού Ωκεανού. Το μαγιάτικο έχει έντονη παρουσία στην Μεσόγειο, ενώ η εξάπλωσή του εκτείνεται από την Βραζιλία, στην Αυστραλία και την Χαβάη (Εικόνα 2).



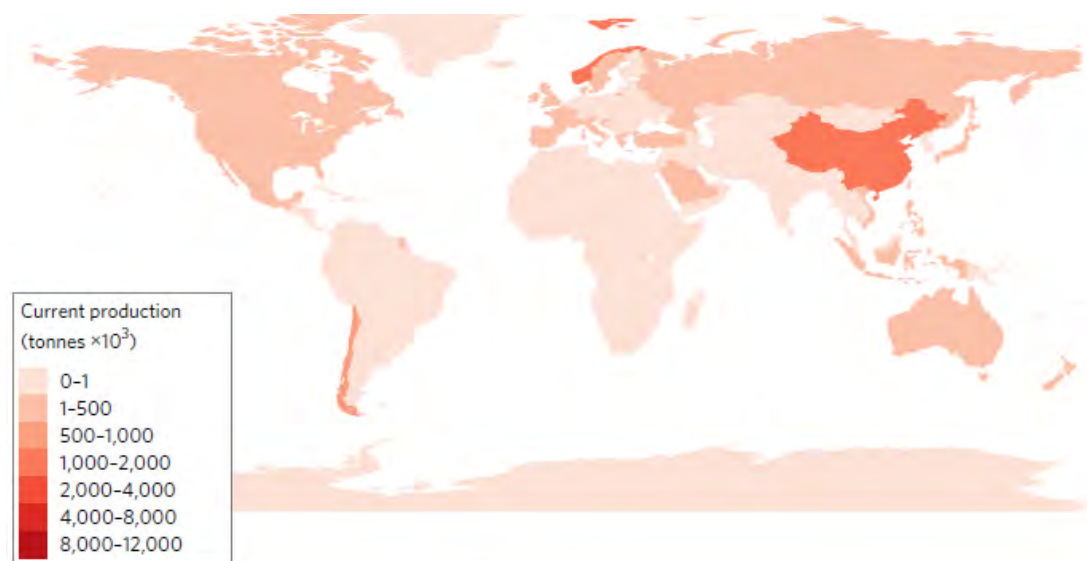
Εικόνα 2 Χάρτης της παγκόσμιας κατανομής για το Μαγιάτικο (*Seriola dumerili*) www.aquamaps.org, version of Aug. 2016.

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization, FAO) των Ηνωμένων Εθνών, το μαγιάτικο ανήκει στα πελαγικά και επιβενθικά είδη ψαριών, αφού κατοικεί τόσο σε υφάλους κοντά στην ακτή, όσο και στην ανοιχτή θάλασσα. Συνήθως εντοπίζεται σε βάθος 18 έως 360 μέτρων. Το μαγιάτικο τρέφεται με πληθώρα θηραμάτων τα οποία ποικίλουν ανάλογα με το στάδιο ζωής του θηρευτή. Τα νεαρά άτομα με μήκος μικρότερο των 8 εκατοστών τρέφονται με ζωοπλαγκτόν, όταν φτάνουν τα 12 εκατοστά τρέφονται με βενθικούς οργανισμούς, ενώ όταν φτάσουν τα 20 εκατοστά εγκαταλείπουν την ανοιχτή θάλασσα και κατευθύνονται προς την ακτή, όπου τα ενήλικα άτομα τρέφονται με πελαγικά ψάρια και κεφαλόποδα (FAO, 2016).

1.2 Ιχθυοκαλλιέργεια

Σύμφωνα με το FAO ως υδατοκαλλιέργεια ορίζεται η εκτροφή υδρόβιων οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, των μαλακίων, των καρκινοειδών και των υδρόβιων φυτών. Η ιχθυοκαλλιέργεια συνεπάγεται κάποια μορφή παρέμβασης στη διαδικασία εκτροφής για την ενίσχυση της παραγωγής. Πιο συγκεκριμένα, η ιχθυοκαλλιέργεια αναφέρεται αποκλειστικά στην εκτροφή ιχθύων. Η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί μια τεχνική που χρησιμοποιείται από την αρχαιότητα και πλέον εφαρμόζεται παγκοσμίως (Εικόνα 3).

Το 43% των αλιευμάτων που καταναλώθηκαν το 2007 αποτέλεσαν προϊόντα υδατοκαλλιέργειας και το ποσοστό αναμένεται να αυξηθεί περαιτέρω για να καλύψει τη μελλοντική ζήτηση (Bostock et al., 2010).



Εικόνα 3 Σύγχρονη παραγωγή ιχθύων μέσω της υδατοκαλλιέργειας (Gentry et al., 2017).

Το μαγιάτικο φέρει χαρακτηριστικά τα οποία το καθιστούν ιδανικό για την ιχθυοκαλλιέργεια. Εμφανίζει ταχύ ρυθμό αύξησης, φτάνοντας τα 6 kg σε 2,5 χρόνια σε καθεστώς καλλιέργειας, εξαιρετική ποιότητα σάρκας και αυξημένη παγκόσμια ζήτηση. Επίσης, έχει αναφερθεί ότι προσαρμόζεται εύκολα στο περιβάλλον αιχμαλωσίας, αλλά η αναπαραγωγή του έχει αποδειχθεί δύσκολη (Parandroulakis et al., 2005). Το γονιδίωμα του Μαγιάτικου αποτελείται από 678 εκατομμύρια ζεύγη βάσεων, ενώ ο αριθμός των κωδικοποιητικών του γονιδίων είναι 23.287. Τα γονίδια αυτά είναι αποτέλεσμα ιδιαίτερα σημαντικών εξελικτικών γεγονότων (Hunt et al., 2018).

1.3 Συνθήκες εκτροφής

Το μαγιάτικο είναι ένα είδος με αυξημένη εμπορική σημασία λόγω των χαρακτηριστικών του που αναφέρθηκαν προηγουμένως, όπως η παγκόσμια κατανομή, η ταχύτατη ανάπτυξή του καθώς και η καλής ποιότητας παραγόμενη μυϊκή του μάζα. Επίσης, μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την παραγωγή καινούργιων προϊόντων εξαιτίας του μεγάλου του μεγέθους, αφού μπορεί να πωληθεί είτε ολόκληρο, είτε ως επεξεργασμένο προϊόν. Όλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα την συνεχή πραγματοποίηση προσπάθειών ώστε τα άτομα του είδους να εκτραφούν σε υδατοκαλλιέργειες, υπό τις βέλτιστες για τα ίδια, συνθήκες.

Στην ιχθυοκαλλιέργεια η εκτροφή των ψαριών πραγματοποιείται σε τεχνητό περιβάλλον το οποίο μπορεί να επηρεάσει τόσο την συμπεριφορά όσο και την φυσιολογία των ατόμων (Eslamloo et al., 2015). Χρησιμοποιούνται δεξαμενές ποικίλων σχεδίων, με το χρώμα της δεξαμενής να αποτελεί έναν παράγοντα που επηρεάζει την ανάπτυξη και την πρόσληψη τροφής του εκάστοτε είδους. Δεδομένου ότι τα διάφορα είδη απαιτούν διαφορετικά περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά κατά τη διάρκεια της ζωής τους, η επιλογή του κατάλληλου χρώματος δεξαμενής προσφέρει στο ψάρι ένα λιγότερο στρεσογόνο περιβάλλον, το οποίο ενδεχομένως να είναι και διαφορετικό από το φυσικό του περιβάλλον.

Έχουν πραγματοποιηθεί πολυάριθμες προσπάθειες για να διερευνηθούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις του χρώματος της δεξαμενής ή οι συνθήκες φωτισμού στην οπτική ανίχνευση του θηράματος σε προνύμφες ψαριών, ειδικά σε πελαγικούς θηρευτές όπως το μαγιάτικο. Γενικά, μια καλή χρωματική αντίθεση μεταξύ της λείας και της δεξαμενής προτείνεται για την καλύτερη ανάπτυξη των προνυμφών (Kesbiş et al. 2016). Για παράδειγμα, σύμφωνα με τον Howell, το μαύρο χρώμα ήταν καταλληλότερο για την ανάπτυξη προνυμφών του είδους *Scophthalmus maximus* (Howell 1979), ενώ για τα άτομα του είδους *Perca fluviatilis* L. παρατηρήθηκε καλύτερη ανάπτυξη τόσο με μέγεθος όσο και σε μήκος σε δεξαμενές με λευκό χρώμα (Tamazouzt et al. 2000).

Οι αποκρίσεις στο χρώμα της δεξαμενής ποικίλουν ανάλογα με το είδος του ιχθύος και το στάδιο της ζωής του. Εξαιτίας των σημαντικών επιπτώσεων παραμέτρων όπως η πυκνότητα των ατόμων στη δεξαμενή, ο τύπος της τροφής, η φωτοπερίοδος, η ένταση του φωτός, στην ανάπτυξη των διαφορετικών ειδών ψαριών είτε ακόμη και εντός του ίδιου είδους, δεν υπάρχουν ξεκάθαρα αποτελέσματα για το βέλτιστο χρώμα δεξαμενής κατά την εκτροφή. Το γεγονός αυτό ίσως σχετίζεται με την άμεση επίδραση του χρώματος της δεξαμενής στην οποία εκτρέφονται τα άτομα, σε ορμονικές διεργασίες ή λειτουργίες του νευρικού συστήματος, στην συμπεριφορά, στην κατανάλωση της τροφής, ή σε όλα τα παραπάνω (Papoutsoglou et al. 2005).

Η κατανάλωση τροφής, η αποτελεσματική ανάπτυξη και η υγεία του ψαριού μπορεί να επηρεαστεί αρνητικά σε στρεσογόνες καταστάσεις. Οι συμπεριφορικές και φυσιολογικές αποκρίσεις στο στρες είναι διαδικασίες που απαιτούν την σπατάλη μεγάλων ποσών ενέργειας από τον οργανισμό, μειώνοντας έτσι την ικανότητα του να αναπτυχθεί και να τραφεί κατά την εκτροφή του (Strand et al. 2007).

1.4 Αναπαραγωγή και Ανάπτυξη

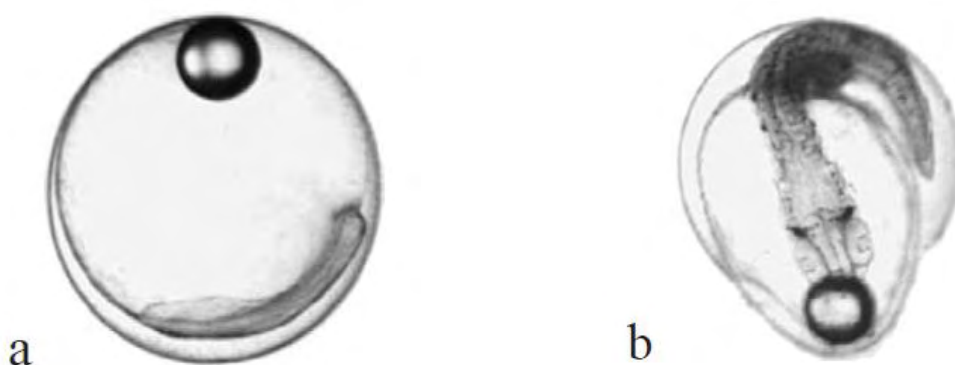
Το μαγιάτικο είναι ένα γονοχωριστικό είδος και επομένως δεν παρουσιάζει σεξουαλικό διμορφισμό. Σύμφωνα με το FAO στη Μεσόγειο, η σεξουαλική διαφοροποίηση εμφανίζεται σε μήκος 24-26 εκατοστών (σε ηλικία 4-5 μηνών) και

φτάνει σε σεξουαλική ωρίμανση στην ηλικία των 4 και 5 χρόνων (περίπου 109 και 113 cm σε μήκος) σε αρσενικά και θηλυκά, αντίστοιχα. Η περίοδος ωοτοκίας διαφοροποιείται μεταξύ των διαφόρων περιοχών. Στη Μεσόγειο, οι ενήλικες γεννιούνται από τον Μάιο μέχρι τον Ιούλιο (FAO, 2016).

Τα θηλυκά φέρουν συγχρονική ωοθήκη με τουλάχιστον δύο ομάδες ωοκυττάρων να αναπτύσσονται και πελαγικά αυγά να απελευθερώνονται αρκετές φορές κατά τη διάρκεια της ίδιας περιόδου ωοτοκίας. Το μέγεθος των αυγών είναι περίπου 1,1 mm και η γονιμότητα είναι αντίστοιχα υψηλή (15-50 εκατομμύρια αυγά ανά θηλυκό άτομο στον Ατλαντικό, 4-9 εκατομμύρια στη Μεσόγειο και 1-4 εκατομμύρια στον Ειρηνικό) (FAO, 2016).

Τα αυγά των περισσότερων ψαριών γονιμοποιούνται εξωτερικά και πλέουν κοντά στην επιφάνεια της θάλασσας (FAO, 2016). Σε ένα γενικευμένο πλαίσιο η ανάπτυξη του οργανισμού μπορεί να διακριθεί σε τρία βασικά στάδια. Πρώτο είναι το στάδιο του αυγού στο οποίο εντοπίζεται η περίοδος από την γονιμοποίηση μέχρι την εκκόλαψη, το αμέσως επόμενο στάδιο είναι εκείνο της προνύμφης που αφορά την περίοδο μεταξύ της εκκόλαψης και της μεταμόρφωσης, και τελευταίο αποτελεί το στάδιο του ιχθυδίου, δηλαδή η έναρξη της μεταμόρφωσης και το εφηβικό στάδιο του οργανισμού μέχρι την επίτευξη αναπαραγωγικής ωριμότητας ως ενήλικο άτομο (Kendall et al., 1984).

Σε πειραματικές διαδικασίες εκτροφής του μαγιάτικου, περίπου 10 ώρες μετά τη γονιμοποίηση πραγματοποιείται η εμφάνιση του εμβρύου (Εικόνα 4), ενώ η εκκόλαψη παρατηρήθηκε στις 30-34 ώρες μετά την γονιμοποίηση (Parandroulakis et al. 2004).



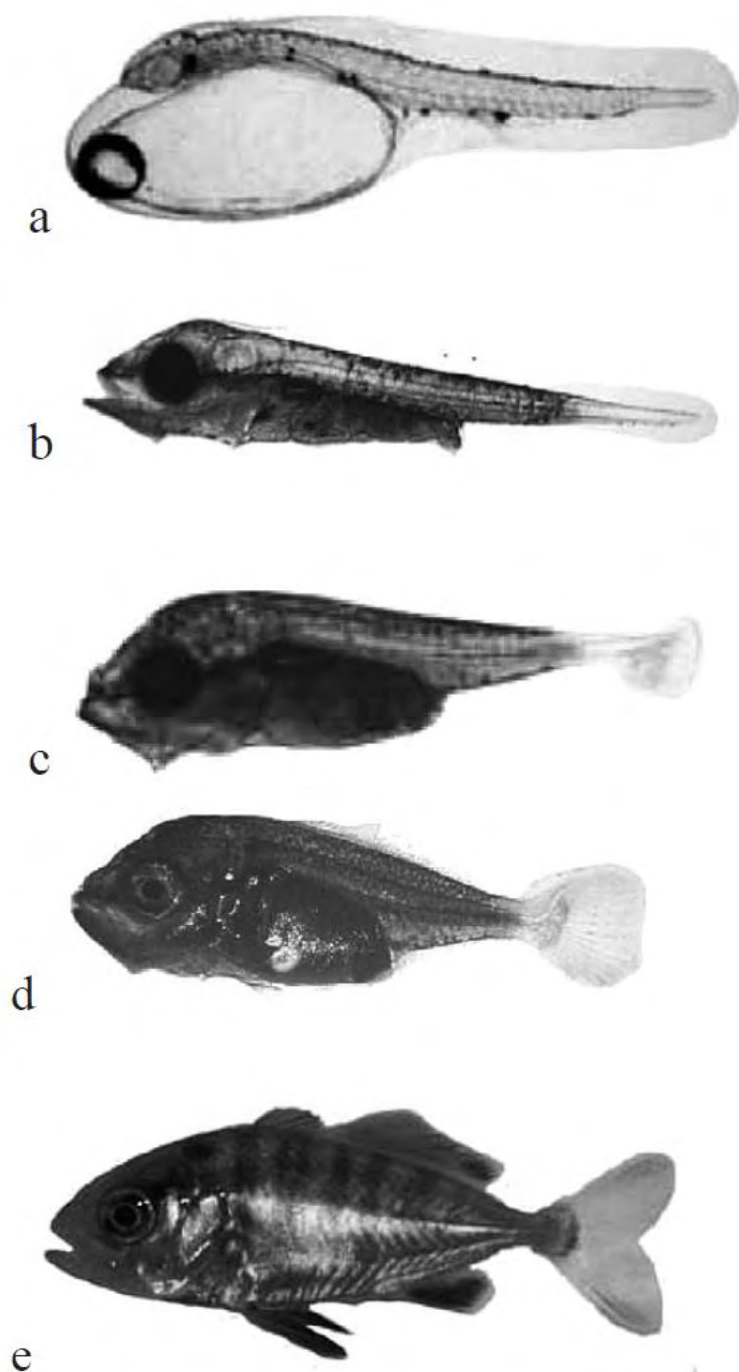
Εικόνα 4 Ανάπτυξη στο μαγιάτικο. (α) Η εμφάνιση του εμβρύου, (b) η εκκόλαψη (Parandroulakis et al. 2004).

Τα αυγά εκκολάπτονται σε προνύμφες λεκιθικού σάκου οι οποίες κολυμπούν ελάχιστα και βασίζουν την θρέψη τους στην λέκιθό τους. Μετά την εξάντληση του λεκιθικού περιεχομένου, οι προνύμφες αναπτύσσουν παροδικούς χαρακτήρες ενώ παράλληλα σχηματίζονται σταδιακά όλο και περισσότερα χαρακτηριστικά του ενήλικου ατόμου. Με την πάροδο του σταδίου της ανάπτυξης, οι προνύμφες μεταβαίνουν μέσω μιας απότομης μεταμόρφωσης στο στάδιο του ιχθυδίου (Kendall et al. 1984).

Πιο συγκεκριμένα το αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης παρουσιάζει τις εξής διακριτές υποκατηγορίες (Kendall et al. 1984):

- A. Προνύμφη λεκιθικού σάκου: αναφέρεται στον οργανισμό κατά το διάστημα μεταξύ της εκκόλαψης και της εξάντλησης του λεκιθικού σάκου.
- B. Προνύμφη προ-κάμψης: αφορά το χρονικό διάστημα από την εξάντληση του λεκιθικού σάκου μέχρι την ανοδική κάμψη της νωτοχορδής.
- Γ. Προνύμφη κάμψης: αντιπροσωπεύεται χρονικά από την ολοκλήρωση της κάμψης της νωτοχορδής μέχρι τα πλευρικά οστά να φτάσουν στην κατακόρυφη θέση.
- Δ. Προνύμφη μετά-κάμψης: αναφέρεται στον σχηματισμό του ουραίου πτερυγίου και την εμφάνιση εξωτερικών χαρακτηριστικών όπως το ακτινωτό πτερύγιο.

Οι μορφολογικές αλλαγές στα επιμέρους στάδια της ανάπτυξης της προνύμφης στο μαγιάτικο παρουσιάζονται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5 Αλλαγές στην μορφολογία του μαγιάτικου (*Seriola dumerili*) κατά το στάδιο της προνύμφης. (a) Προνύμφη αμέσως μετά την εκκόλαψη (συνολικό μήκος 2.87 ± 0.17 mm), (b) Προνύμφη προ-κάμψης (5 ημερών) (συνολικό μήκος 3.87 ± 0.23 mm), (c) προνύμφη στο στάδιο της κάμψης (12 ημερών) (συνολικό μήκος 5.29 ± 0.24 mm), (d) Προνύμφη στο στάδιο που έπεται της κάμψης (20 ημερών) (συνολικό μήκος 8.55 ± 0.83 mm), (e) Ιχθύδιο μαγιάτικου 40 ημέρες μετά την εκκόλαψη (35.63 ± 6.52 mm) (Papandroulakis et al. 2004).

1.4.1 Η ανάπτυξη των μυών

Ο σκελετικός μυς προέρχεται από τους σωμαίτες, και αποτελεί το 40-60% της μυϊκής μάζας του ψαριού (Valente et al., 2013). Το μυοτόμιο των ιχθύων αποτελείται από ταχείες (λευκές) μυϊκές ίνες και από αργές μυϊκές ίνες οι οποίες είναι διατεταγμένες σε διακριτά στρώματα και υποστηρίζονται από αναερόβια (υδρόλυση φωσφοκρεατίνης, γλυκόλυση) και αερόβια μεταβολικά μονοπάτια, αντιστοίχως. Ανάμεσα στα στρώματα των αργών και των ταχειών μυϊκών ινών εντοπίζονται μυϊκές ίνες με ενδιάμεση αερόβια ικανότητα και ταχύτητα σύσπασης, αλλά με αυξημένη αναερόβια γλυκόλυση. Οι ίνες αυτές πρωτοεμφανίζονται στο στάδιο της προνύμφης ή στην πρώιμη φάση του ιχθυδίου (Valente et al., 2013).

Ο σχηματισμός μυών στους τελεόστεους περιλαμβάνει την παραγωγή και μετέπειτα διεύρυνση των μυϊκών ινών. Η μυογένεση είναι κοινή σε όλα τα σπονδυλωτά και αποτελείται από μια σειρά γεγονότων που περιλαμβάνει τον καθορισμό, τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση, τη μετανάστευση και τη σύντηξη προδρομικών κυττάρων για να σχηματίσουν πολυπύρηνες μυϊκές ίνες (Johnston, 2006). Μπορούν να αναγνωριστούν τρεις διαφορετικές φάσεις παραγωγής ινών. Η πρώτη φάση είναι η εμβρυϊκή, στην οποία δημιουργούνται δύο μορφολογικά και λειτουργικά διαφορετικοί τύποι μυών που σχηματίζουν το πρώιμο μυοτόμιο. Η δεύτερη φάση που εκτείνεται από το στάδιο του εμβρύου έως και τα πρώτα προνυμφικά στάδια περιλαμβάνει την παραγωγή νέων μυϊκών ινών σε διακριτές ζώνες (στρωματοποιημένη υπερπλασία). Η τρίτη φάση ξεκινά στο στάδιο της προνύμφης και συνεχίζει στην ενήλικη φάση. Κατά τη φάση αυτή διεξάγεται νέα παραγωγή ινών σε ολόκληρο το μυοτόμο, δημιουργώντας ένα μωσαϊκό από ίνες διαφορετικών διαμέτρων (μωσαϊκή υπερπλασία) (Valente et al., 2013). Στα διάφορα είδη που έχουν σημασία για την υδατοκαλλιέργεια, η μωσαϊκή υπερπλασία είναι η κύρια φάση που συμβάλλει στην ανάπτυξη μυών (Johnston, 2006).

1.4.2 Η εμβρυϊκή μυϊκή ανάπτυξη

Η μυογένεση ξεκινά σε πιο πρώιμο στάδιο ανάπτυξης στα έμβρυα των ψαριών απ' ότι στα πτηνά και θηλαστικά. Αυτό πιθανότατα αντανακλά την ανάγκη του οργανισμού να αποκτήσει άμεσα την ικανότητα κολύμβησης εξαιτίας της εξωτερικής γονιμοποίησης (Johnston et al. 2011). Όλες οι εμβρυϊκές μυϊκές ίνες αναπτύσσονται σε κυτταρικά διαμερίσματα που ονομάζονται σωμαίτες, οι οποίοι εντοπίζονται σε ζεύγη κατά μήκος του άξονα του σώματος και διαχωρίζονται από τη νωτοχορδή και τον νευρικό σωλήνα (Johnston et al. 2011). Οι σωμαίτες σχηματίζονται από το παραξονικό μεσόδερμα με ραχιο-κοιλιακή κατεύθυνση και αποτελούν το 40-60% της μυϊκής μάζας των ιχθύων (Valente et al., 2013). Τα κύτταρα του σωμαίτη διαφοροποιούνται σε ένα μυοτόμιο με τέσσερις κύριους τύπους μυϊκών ινών, τους πρωτοπόρους μύες, τον αργό, τον γρήγορο και τον μέσο μυ. Ο καθορισμός της μοίρας των κυττάρων σε κάθε μία από αυτές τις κυτταρικές γενεαλογίες εξαρτάται από τα

μέλη μιας οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων που ονομάζονται ρυθμιστικοί παράγοντες της μυογένεσης (MRFs) (*myoD*, *myf5*, *myf4*). Ένας τέταρτος μεταγραφικός παράγοντας κατά τη μυογένεση είναι η μυογενίνη, η οποία λειτουργεί σε συμφωνία με άλλους μεταγραφικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένου του *myoD* για να επάγει και να διατηρήσει τη διαφοροποίηση και την έναρξη της έκφρασης ειδικών για τους μύες γονιδίων (Johnston et al. 2011).

Τα πρόδρομα μυογενή κύτταρα για τον αργό και τον ταχύ μυ διαχωρίζονται πριν τον σχηματισμό των σωματιών, κατά τη γαστριδίωση. Ένας πληθυσμός μονοκύτταρων πρόδρομων μυογενών κυττάρων τα οποία ονομάζονται παραξονικά κύτταρα, εντοπίζονται παρακείμενα της νωτοχορδής και είναι τα πρόδρομα του αργού μύος και των πρωτοπόρων μυικών κυττάρων (Johnston et al. 2011). Η εξειδίκευση των παραξονικών κυττάρων και των μέσων μυικών ινών απαιτεί τη σηματοδότηση των πρωτεϊνών της οικογένειας *hedgehog* (*Hh*), που εκκρίνονται από τη νωτοχορδή (Valente et al., 2013). Τα πλέον καθορισμένης μοίρας παραξονικά κύτταρα επιμηκύνονται και μεταναστεύουν από τη νωτοχορδή για να σχηματίσουν τον αργό μυ (Johnston et al. 2011). Η διαδικασία εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από τον παροδικά εκφραζόμενο μεταγραφικό παράγοντα *Blimp-1*, ο οποίος επάγεται από τον *Hh* και λειτουργεί ως βασικός καταστολέας της έκφρασης γονιδίων τα οποία είναι ειδικά για τις ταχείες μυικές ίνες. Ακολούθως, οι εμβρυϊκές αργές ίνες σχηματίζονται ανεξάρτητα από τη σηματοδότηση *Hh* και εκφράζουν μία ξεχωριστή ισομορφή βαριάς αλυσίδας της μυοσίνης στα διαφοροποιημένα παραξονικά κύτταρα (Johnston et al. 2011).

Η μετανάστευση των παραξονικών κυττάρων προκαλεί τη διαφοροποίηση και τη μορφογένεση των κυριότερων κυττάρων του ταχέος μύος, που βρίσκονται στον οπίσθιο πλευρικό σωματίτη. Αυτά τα κύτταρα ξεκινούν την γονιδιακή έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων της μυογένεσης, διαφοροποιούνται, επιμηκύνονται και συντήκονται μεταξύ τους για να σχηματίσουν ίνες που καλύπτουν όλο το μήκος του μυοτομίου. Έχουν εντοπιστεί αρκετοί μεταγραφικοί παράγοντες που απαιτούνται για την έκφραση των ειδικών για τον ταχύ μυ γονιδίων, συμπεριλαμβανομένων των *Pbx* και *Six1a* (Johnston et al. 2011).

1.4.3 Μεταεμβρυϊκή μυϊκή ανάπτυξη

Ένα μοναδικό χαρακτηριστικό των ιχθύων είναι ότι νέες μυϊκές ίνες συνεχίζουν να παράγονται σχεδόν καθ' όλη την διάρκεια του κύκλου ζωής των ατόμων, σε αντίθεση με τα θηλαστικά στα οποία η φυσιολογική ανάπτυξη μετά τη γέννηση εξαρτάται αποκλειστικά στην υπερτροφία των μυϊκών ινών που σχηματίστηκαν κατά την εμβρυογένεση (Rescan, 2008).

Επειδή ο μυς είναι ένας πολυπύρηνος, τελικά διαφοροποιημένος ιστός, για να λάβει χώρα η μετα-εμβρυϊκή ανάπτυξη απαιτείται η παρουσία μιας πηγής πολλαπλασιαζόμενων πρόδρομων μυογενών κυττάρων MPCs (Johnston et al. 2011). Στο zebrafish, πραγματοποιείται αναδιάταξη του σωματίτη κατά τη διάρκεια της μεταμέρειας. Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα κύτταρα από την πρόσθια περιοχή του σωματίτη τοποθετούνται εξωτερικά του αργού μυός, στο εξωτερικό στρώμα κυττάρων ECL, το οποίο έχει χαρακτηριστικά του δερμαμυοτομίου των αμνιωτών. Το ECL είναι πηγή πρωτογενών δερμικών ενδοθηλιακών κυττάρων και πολλαπλασιαστικών MPCs που μεταναστεύουν μέσω του σωματίτη για να σχηματίσουν ένα δεύτερο κύμα πλευρικών γρήγορων μυών στα μεταγενέστερα εμβρυϊκά στάδια και στο στάδιο της προνούμφης. Το ECL επίσης παρέχει έναν πληθυσμό κυττάρων τα οποία όταν ενεργοποιηθούν αποτελούν πηγή πολλαπλασιαστικών κυττάρων που απαιτούνται για την μυϊκή ανάπτυξη στα ενήλικα άτομα (Johnston et al. 2011).

Είναι πιθανό ότι τα MPCs περιλαμβάνουν ένα πληθυσμό βλαστοκυττάρων τα οποία αυτό-ανανεώνονται με τα θυγατρικά του κύτταρα να δεσμεύονται στην τελική διαφοροποίηση. Η ισορροπία μεταξύ των μονοπατιών μεταγωγής σήματος ευνοώντας, είτε τον πολλαπλασιασμό ή τη διαφοροποίηση, θα μπορούσε να μεταβάλει τον αριθμό των MPCs και συνεπώς τη δυναμική της ανάπτυξης μυών σε κάθε στάδιο του κύκλου ζωής και υπό διαφορετικές περιβαλλοντικές καταστάσεις (Johnston et al. 2011). Όταν πραγματοποιηθεί η τελική διαφοροποίηση, τα MPCs ή μύοβλαστες έχουν μία από τις δύο τύχες: είτε απορροφώνται σε αναπτυσσόμενες ίνες καθώς αναπτύσσονται σε μήκος και διάμετρο ή συμβάλλουν στο σχηματισμό επιπλέον μυο-ινιδίων (Johnston et al. 2011). Όταν τα μυο-ινίδια σχηματιστούν ξεκινά η διαδικασία της μυο-ινό-γένεσης κατά την οποία γίνεται η ωρίμανση σε μυϊκές ίνες (Johnston, 2006).

Μια εγκάρσια τομή στον κορμό ενήλικων ψαριών αποκαλύπτει ένα φάσμα διαφορετικών μεγεθών ινών, που αντικατοπτρίζουν την παραγωγή μυο-ινιδίων και την επακόλουθη υπερτροφία των παραγόμενων ινών. Η διαμέτρος των μεμονωμένων αργών και γρήγορων μυϊκών ινών φτάνει σε οριακή τιμή η οποία ορίζεται από τους περιορισμούς διάχυσης, οι οποίοι είναι σε μεγάλο βαθμό συνάρτηση της μάζας σώματος, της θερμοκρασίας και της μεταβολικής δραστηριότητας (Johnston et al. 2011). Καθώς οι ίνες επεκτείνονται σε διάμετρο και μήκος, ενσωματώνουν μυοβλάστες για να διατηρήσουν την πυρηνική και κυτταροπλασματική αναλογία εντός ορισμένων ορίων. Η μετα-εμβρυϊκή ανάπτυξη περιλαμβάνει τα κύρια βήματα που παρουσιάζονται και κατά τη διάρκεια της εμβρυϊκής μυογένεσης (Johnston et al., 2011).

Η στρωματοποιημένη υπερπλασία περιλαμβάνει την παραγωγή μυο-ινιδίων σε διακριτές στοιβάδες, που προέρχονται από τις βλαστικές ζώνες στο ραχιαίο και

κοιλιακό άκρο του μυοτομίου, με αποτέλεσμα την σταθερή αύξηση της διαμέτρου των ινών καθώς αυτές κινούνται προς το μέσο του μυοτομίου. Η στρωματοποιημένη υπερπλασία παράγει τόσο ταχείες όσο και αργές μυϊκές ίνες (Johnston et al. 2011). Η στρατολόγηση των μυϊκών ινών κατά το προνυμφικό στάδιο πραγματοποιείται κυρίως μέσω της στρωματοποιημένης υπερπλασίας. Στα μεγαλύτερα άτομα, μυο-ινίδια σχηματίζονται στην επιφάνεια των μυϊκών ινών μέσω της μωσαϊκής υπερπλασίας, η οποία συνεχίζεται μέχρι το ψάρι να φτάσει στο μισό από το συνολικό του μήκος. Όταν επιτευχθεί ο μέγιστος ανώτατος αριθμός ινών, ο σχηματισμός μυο-ινιδίων αναστέλλεται, ενώ ενεργοποιείται σε ενδεχόμενο μυϊκό τραυματισμό. Η μέγιστη τιμή των μυϊκών ινών ποικίλει ανάμεσα στα είδη και σχετίζεται τόσο με το μέγεθος του σώματος αλλά και με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Johnston et al. 2011).

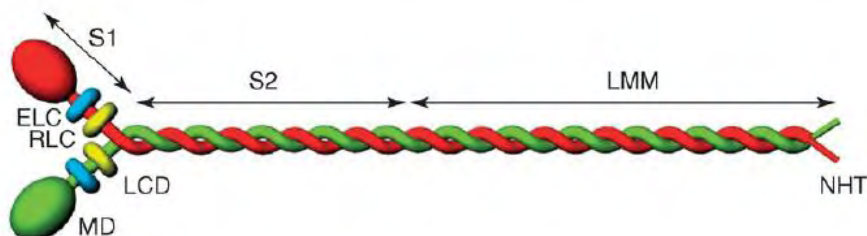
Στο μαγιάτικο τα μυοτόμια του κορμού και οι καρδιακοί μύες είναι ήδη διαφοροποιημένοι στην ημέρα 0 μετά την εκκόλαψη (0 DPH). Οι μύες που απαιτούνται ώστε τα άτομα να τραφούν αναπτύσσονται στο προνυμφικό στάδιο της προ-κάμψης, ενώ οι μύες των πτερυγίων που απαιτούνται για την κολύμβηση αναπτύσσονται μετά το στάδιο της προ-κάμψης (Uji et al., 2014).

1.5 Η μυοσίνη

Τα δομικά γονίδια που εκφράζονται στους σκελετικούς μύες μελετώνται για την πιθανή συσχέτιση τους με τα ποιοτικά και ποσοτικά χαρακτηριστικά της παραγόμενης μυϊκής μάζας. Η μυοσίνη τόσο ποσοτικά όσο και ποιοτικά, αποτελεί μία από τις πιο σημαντικές πρωτεΐνες στον μυϊκό ιστό, και είναι υπεύθυνη για την παραγωγή της δύναμης συστολής, και καταλαμβάνει το 40% της συνολικής πρωτεΐνης που εκφράζεται (Xu et al., 2013).

Η μυοσίνη αποτελεί μια σημαντική πρωτεΐνη στα παχιά νημάτια των λείων, σκελετικών και καρδιακών μυών και σε συνδυασμό με την ακτίνη διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην παραγωγή δύναμης. Το μόριο της μυοσίνης αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες (myosin heavy chain, MHC) και τέσσερις ελαφριές αλυσίδες (myosin light chain, MLC). Τόσο οι MHC όσο και οι MLC υπάρχουν σε πολλαπλές ισομορφές που εμφανίζουν εξειδίκευση σε επίπεδο ιστού και/ή εξειδικευμένη κατανομή ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο, και είναι γνωστό ότι η έκφρασή τους βρίσκεται κάτω από περιβαλλοντικό και ορμονικό έλεγχο (Moutou et al. 2003). Οι ελαφριές αλυσίδες χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, τις αλκαλικές και τις ελαφριές αλυσίδες αφαίρεσης με DTNB, οι οποίες ορίζονται ως MLC2 και επιτελούν ρυθμιστική δράση για την πρόσδεση Ca^{2+} (Moutou et al. 2003). Σε προηγούμενες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο είδος *Sparus aurata*, έγινε γνωστό ότι οι δύο ισομορφές της

ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLC2) Α και Β, αποτελούν δείκτες των διαδικασιών της υπερπλασίας και υπερτροφίας αντίστοιχα, με την MLC2B να αντικαθιστά την MLC2A κατά την μεταμόρφωση (Georgiou et al., 2014). Κάθε αμινοτελικό άκρο των βαριών αλυσίδων της μυοσίνης σχηματίζει μια σφαιρική επικράτεια, που ονομάζεται κεφαλή και περιλαμβάνει ένα ζεύγος ρυθμιστικής και βασικής ελαφριάς αλυσίδας (Εικόνα 6, Szczesna-Cordary, 2005).



Εικόνα 6 Μόριο μυοσίνης. Οι περιοχές S2 και LMM αποτελούν την ουρά του μορίου η οποία περιλαμβάνει τα καρβοξυτελικά άκρα των δύο βαριών αλυσίδων (πράσινο και κόκκινο). Η περιοχή S1 αποτελεί την κεφαλή της μυοσίνης όπου διακρίνονται οι βασικές ελαφριές αλυσίδες (μπλε) και οι ρυθμιστικές ελαφριές αλυσίδες (κίτρινο). (Craig & Woodhead, 2006)

1.5.1 Οι ελαφριές ρυθμιστικές αλυσίδες της μυοσίνης

Τόσο ο σκελετικός όσο και ο καρδιακός μυς ενεργοποιείται από την πρόσδεση του ασβεστίου στην τροπονίνη C και ρυθμίζεται από τις πρωτεΐνες του λεπτού νηματίου, την τροπομυοσίνη και την τροπονίνη. Σε αντίθεση με τους λείους μύες, οι ελαφριές ρυθμιστικές αλυσίδες της μυοσίνης στους μύες αυτούς δεν έχουν βασικό ρόλο και οι λειτουργίες τους δεν είναι πλήρως κατανοητές, ωστόσο θεωρείται ότι διαμορφώνουν τον μηχανισμό που ελέγχεται από την τροπονίνη για την παραγωγή δύναμης (Szczesna-Cordary, 2005). Οι ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης ανήκουν στην υπεροικογένεια πρωτεϊνών της τροπονίνης C, στην οποία εντάσσονται επίσης πρωτεΐνες οι οποίες προσδένουν Ca^{2+} , όπως η καλμοδουλίνη (Moutou et al. 2003). Η αμινοτελική περιοχή μιας ρυθμιστικής ελαφριάς αλυσίδας (RLC) περιλαμβάνει θέσεις δέσμευσης Ca^{2+} και Mg^{2+} , και όπως και η μυοσίνη του λείου μύος περιέχει και θέση φωσφορυλίωσης. Κατά τη διάρκεια της σύσπασης του μύος, η αύξηση της συγκέντρωσης του Ca^{2+} ενεργοποιεί την Ca^{2+} -καλμοδουλινο-εξαρτώμενη κινάση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης και οδηγεί στην φωσφορυλίωση της RLC. Τόσο η πρόσδεση του Ca^{2+} όσο και η φωσφορυλίωση είναι σημεία κλειδιά κατά τη μυϊκή σύσπαση (Szczesna-Cordary, 2005).

Οι ρυθμιστικές ελαφριές αλυσίδες των σκελετικών και των καρδιακών μυών κωδικοποιούνται από τρία γονίδια, το γονίδιο του ταχέως σκελετικού μύος (MYLPP), το σκελετικό κοιλιακό/αργό (MYL2), και το κοιλιακό (MYL7), τα οποία κωδικοποιούν

για τις πρωτεΐνες RLC-f, RLC-v/s και RLC-a (Wang et al., 2007). Παλαιότερα είχε ταυτοποιηθεί ότι η παρεμπόδιση έκφρασης του γονιδίου RLC στη δροσόφιλα οδήγησε στη δημιουργία ενός φαινοτύπου από τον οποίο απουσίαζε η ικανότητα πτήσης του εντόμου, ενώ η παρεμπόδιση της έκφρασης του MYL2 γονιδίου στον ποντικό είχε ως αποτέλεσμα τον θάνατο των εμβρύων που ήταν ομόζυγα για την απώλεια έκφρασης του γονιδίου (Wang et al., 2007).

Σύμφωνα με τον Wang και τους συνεργάτες του, η ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα του γρήγορου σκελετικού μυός είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη τόσο του γρήγορου όσο και του αργού μυός. Ο Wang πραγματοποίησε πειράματα με ποντικούς στους οποίους είχε αποσιωπηθεί το γονίδιο MYLPF. Τα αποτελέσματα των ερευνών τους υπέδειξαν ότι η πρωτεΐνη RLC-f (γονίδιο MYLPF) είναι η μοναδική ισομορφή η οποία εκφράζεται στους εμβρυικούς σκελετικούς μύες και η απώλεια έκφρασης της προκαλεί την πλήρη έλλειψη της ανάπτυξης σκελετικού μυός τόσο στους γρήγορους όσο και στους αργούς μύες. Γι' αυτό το λόγο η RLC-f φαίνεται να είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη όλων των μυϊκών τύπων κατά την εμβρυογένεση και δεν μπορεί να αντικατασταθεί από την RLC-v/s λόγω της έκφρασης της μετέπειτα στην ανάπτυξη (Wang et al., 2007). Να σημειωθεί ότι το σωματικό βάρος των νεογέννητων ποντικών με μηδενική έκφραση της RLC-f ήταν μειωμένο κατά 30% σε σχέση με τα φυσιολογικά ή τα ετερόζυγα άτομα (Wang et al., 2007).

Το γονίδιο MYLPF κωδικοποιεί την ρυθμιστική ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης, η οποία εκφράζεται στις ταχείες μυϊκές ίνες, ενώ η έκφραση του έχει συσχετιστεί με ποιοτικά χαρακτηριστικά της μυϊκής μάζας ως τροφή (Ryan et al., 2016).

Η έκφραση ομόλογων γονιδίων του MYLPF έχει μελετηθεί σε διάφορα είδη τελεόστεων. Στην περίπτωση της τσιπούρας (*Sparus aurata*) η έκφραση της MLC2 ακολουθεί την ανάπτυξη των μυών, με την έκφραση του MLC2A να είναι αυξημένη κατά το προνυμφικό στάδιο, σε αντίθεση με την έκφραση του MLC2B η οποία αυξάνεται κατά την ενηλικίωση, με τις δύο αυτές ισομορφές της MLC2 μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες της πρώιμης ανάπτυξης (Georgiou et al., 2014). Παράλληλα, σε πειράματα με διαγωνιδιακό σολομό (*Oncorhynchus kisuth*) έγινε γνωστό ότι η ενισχυμένη έκφραση της MLC2 συνοδεύεται από αυξημένους ρυθμούς μυϊκής υπερπλασίας (Hill et al., 2011).

1.6 Διπλασιασμός γονιδιώματος και παράλογα γονίδια

Πολλά από τα γονίδια που εντοπίζονται στους τελεόστεους εμφανίζουν περισσότερα αντίγραφα σε σχέση με αυτά των σπονδυλωτών. Ο αυξημένος αυτός αριθμός αντιγράφων μπορεί να είναι αποτέλεσμα μεμονωμένων γεγονότων γονιδιακών διπλασιασμών, είτε τα γονίδια αυτά να προέρχονται από γύρους διπλασιασμού

ολόκληρου του γονιδιώματος, ένα γεγονός το οποίο συνήθως αφορά περισσότερα από ένα είδη.

Η πρόσφατη δημοσίευση του γονιδιώματος του μαγιάτικου (Sarrorouliou et al., 2017) κατέδειξε την ύπαρξη δύο γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b τα οποία είναι παράλογα, χωρίς ωστόσο να είναι γνωστό εάν τα δύο αυτά γονίδια προκύπτουν από έναν μεμονωμένο γονιδιακό διπλασιασμό, είτε έναν διπλασιασμό ο οποίος αφορά το σύνολο του γονιδιώματος του ψαριού. Τα γονίδια που προκύπτουν από διπλασιασμό ονομάζονται παράλογα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2 Οι ορισμοί των ομόλογων, ορθόλογων και παράλογων γονιδίων (Koonin, 2005)

Ομόλογα γονίδια	Γονίδια τα οποία εμφανίζουν σχέσεις κοινής καταγωγής, χωρίς ωστόσο να προσδιορίζεται περαιτέρω η εξελικτική τους σύνδεση
Ορθόλογα γονίδια	Γονίδια τα οποία προέρχονται από ένα κοινό προγονικό γονίδιο, το οποίο εντοπίζεται στον τελευταίο κοινό πρόγονο των συγκρινόμενων γονιδιωμάτων
Παράλογα γονίδια	Γονίδια τα οποία σχετίζονται μέσω διπλασιασμού

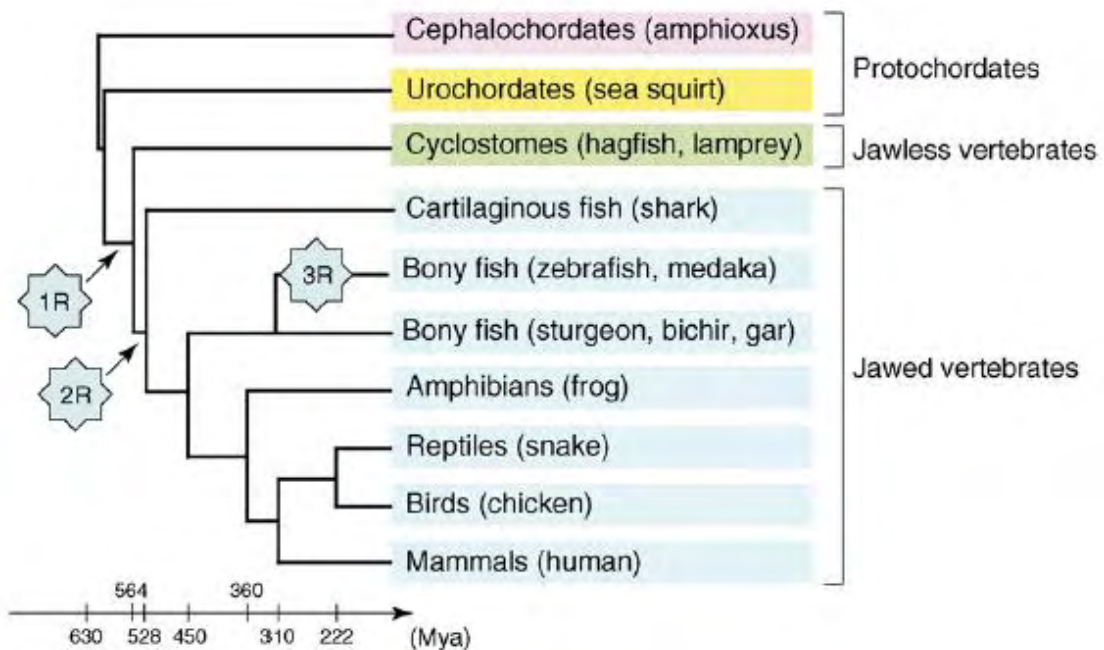
Τα δύο παραγόμενα γονίδια μπορούν να εμφανίσουν διαφορετικές πορείες. Είναι πιθανό, το ένα από τα δύο αντίγραφα που προκύπτουν να χαθεί. Επίσης, υπάρχει η δυνατότητα είτε και τα δύο γονίδια να διατηρήσουν αναλλοίωτη την λειτουργία τους, είτε τα δύο γονίδια να διαφοροποιηθούν με τέτοιο τρόπο, ώστε η λειτουργία του προγονικού γονιδίου να μοιραστεί ανάμεσα στα δύο αντίγραφα, ή τέλος ένα από τα αντίγραφα να αποκτήσει μια καινούργια λειτουργία (Glasauer & Neuhauss, 2014).

Στην περίπτωση της MLC2 στο ψάρι-ζέβρα, έχει δειχθεί ότι το παράλογο του γονιδίου MLC2, είναι υπεύθυνο για την έκφραση της MLC κατά την εμβρυική ανάπτυξη (Mugue & Ozernyuk, 2006), ενώ όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, στην τσιπούρα οι ισομορφές της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLC2) A και B, αποτελούν δείκτες των διαδικασιών της υπερπλασίας και υπερτροφίας αντίστοιχα, με την MLC2B να αντικαθιστά την MLC2A κατά την μεταμόρφωση (Georgiou et al., 2014).

1.6.1 Ο πρώτος και ο δεύτερος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος στα σπονδυλωτά (1R & 2R).

Ο κανόνας “1-2-4” είναι το πιο σύνηθες μοντέλο που χρησιμοποιείται για την περιγραφή της εξέλιξης του γονιδιώματος των σπονδυλωτών. Σύμφωνα με τον κανόνα αυτό πραγματοποιήθηκαν δύο γύροι διπλασιασμού οι οποίοι οδήγησαν το

προγονικό γονιδίωμα των δευτεροστόμιων σε δύο, μετά τον πρώτο διπλασιασμό, και έπειτα σε τέσσερα γονιδιώματα μετά τον δεύτερο πολλαπλασιασμό (Meyer & Schartl, 1999).



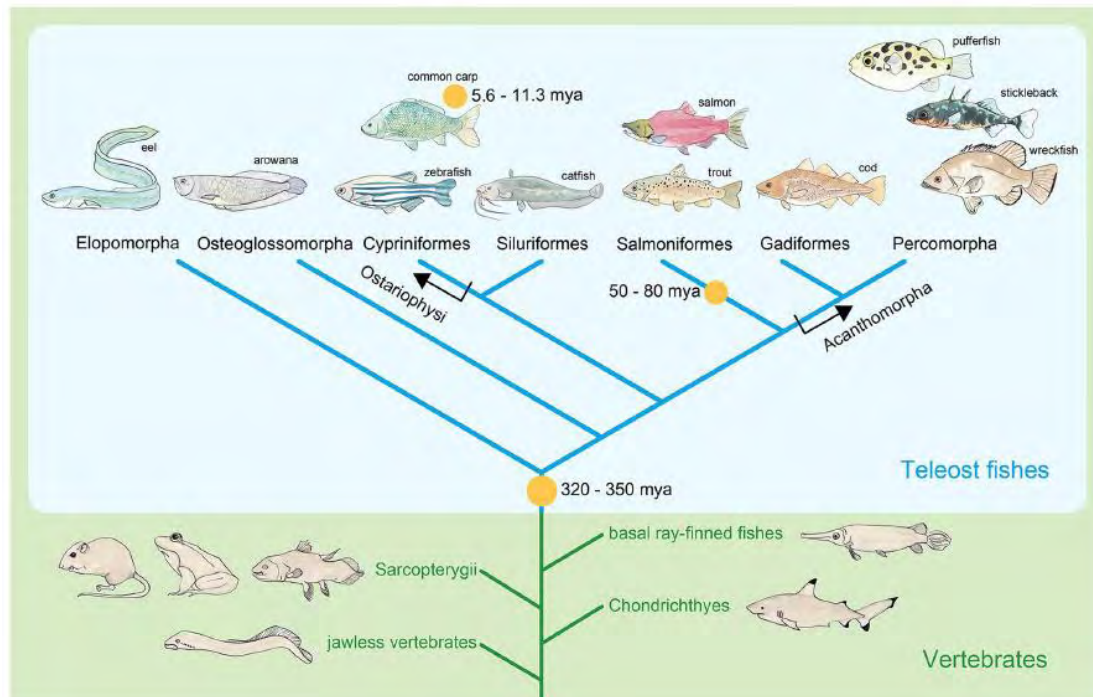
Εικόνα 7 Η υπόθεση του 2R. Η χρονική τοποθέτηση των δύο πρώτων διπλασιασμών ολόκληρου του γονιδιώματος 1R και 2R, με τον πρώτο να τοποθετείται χρονικά στα 564 εκατομμύρια χρόνια πριν και τον δεύτερο στα 528 εκατομμύρια χρόνια πριν (Kasahara, 2007).

Σύμφωνα με την τελευταία εκδοχή της υπόθεσης των 2R, οι δύο διπλασιασμοί πραγματοποιήθηκαν μετά την εμφάνιση των ουροχορδωτών και πριν την εξάπλωση των γναθοστομάτων. Πιο συγκεκριμένα, ο πρώτος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος (1R) τοποθετείται στον κοινό πρόγονο των γναθοστομάτων και των άγναθων, ενώ ο δεύτερος γύρος πολλαπλασιασμού (2R) στον πρόγονο των γναθοστομάτων (Εικόνα 7) (Kasahara, 2007).

1.6.2 Ο τρίτος γύρος διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος στους τελεόστεους (3R)

Οι πρώτες ενδείξεις για την ύπαρξη ενός επιπλέον γύρου διπλασιασμού ο οποίος αφορά αποκλειστικά τους τελεόστεους προέκυψε όταν παρατηρήθηκε ότι πολλά γονίδια των τετραπόδων εμφανίζουν δύο ορθόλογα στους τελεόστεους (Πίνακας 2). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτέλεσαν οι συστάδες των γονιδίων Hox, τα οποία είναι ιδιαίτερα σημαντικά κατά την εμβρυική ανάπτυξη. Παρατηρήθηκε ότι στα

ασπόνδυλα χορδωτά υπάρχει μια συστάδα γονιδίων Hox, ενώ στα σπονδυλωτά υπάρχουν τέσσερις συστάδες (κανόνας “1-2-4”), και στο ψάρι-ζέβρα εντοπίστηκαν επτά συστάδες γονιδίων Hox (Amores et al., 1998).



Εικόνα 8 Απλοποιημένη φυλογενετική πορεία των τελεόστεων. Η γενεαλογία των τελεόστεων διαχωρίζεται από την ομάδα των βασικών ακτινοπτερυγίων και άρχισε να αποκλίνει έπειτα από έναν γύρο διπλασιασμού ολόκληρου το γονιδιώματος, ο οποίος πραγματοποιήθηκε στα 320-350 εκατομμύρια χρόνια πριν (Glasauer & Neuhauss, 2014).

Η αλληλούχηση ολόκληρων των γονιδιωμάτων ενός μεγάλου αριθμού τελεόστεων, επιβεβαίωσε την ύπαρξη τουλάχιστον ενός επιπλέον γύρου διπλασιασμού σε ολόκληρη την γενεαλογία των τελεόστεων. Οι τελεόστεοι διαχωρίστηκαν από την ομάδα των βασικών ακτινοπτερυγίων και ο τρίτος γύρος διπλασιασμού, ο οποίος τους αφορά, πραγματοποιήθηκε στα 320-350 εκατομμύρια χρόνια πριν. Τέλος, επιπλέον γύροι διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος πραγματοποιήθηκαν στις ομάδες των Salmoniformes και σε έναν κοντινό πρόγονο του κυπρίνου (Εικόνα 8) (Glasauer & Neuhauss, 2014). Η γονιδιωματική πολυπλοκότητα των τελεόστεων, που είναι αποτέλεσμα όλων αυτών των γύρων διπλασιασμού, μπορεί να είναι ο λόγος της εξελικτικής τους επιτυχίας και της βιολογικής τους ποικιλίας (Sato & Nishida, 2010).

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το μαγιάτικο αποτελεί είδος το οποίο εμφανίζει παγκόσμια κατανομή και σημαντική παρουσία στη Μεσόγειο και στις ελληνικές θάλασσες. Παράλληλα αποτελεί ένα ψάρι μεγάλου μεγέθους το οποίο είναι ιδιαίτερα δημοφιλές στους καταναλωτές. Το μαγιάτικο εμφανίζει μια πληθώρα πλεονεκτημάτων τα οποία καθιστούν την εκτροφή του σε περιβάλλον ιχθυοκαλλιέργειας αποτελεσματική και επικερδή. Πρόδρομες μελέτες έχουν καταδείξει ότι το χρώμα της δεξαμενής επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό επιβίωσης στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια καθώς και τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της αυξητικής ορμόνης (GH) και των παραγόντων αύξησης της ινσουλίνης (IGFI και IGFI) (Tsalafouta et al., 2016).

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό την μελέτη της επίδρασης του χρώματος της δεξαμενής στην έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την μυϊκή ανάπτυξη σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια των προνυμφών του μαγιάτικου και έχουν αναδειχθεί δείκτες υπερπλασίας και υπερτροφίας στην τσιπούρα (Georgiou et al. 2014). Δεδομένης της σχετικά πρόσφατης δημοσίευσης του γονιδιώματος του μαγιάτικου (Sarroroulou et al. 2017), επιχειρείται και η φυλογενετική ανάλυση των γονιδίων στόχων MYLRF-a και MYLRF-b, για να διαπιστωθεί εάν αποτελούν προϊόντα του γονιδιακού διπλασιασμού που έλαβε χώρα στους τελεόστεους.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εξαγωγή Δεδομένων

Οι βιολογικές βάσεις δεδομένων αποτελούν βιβλιοθήκες που περιλαμβάνουν και αφορούν την γονιδιακή λειτουργία, τη γονιδιακή δομή, τον γονιδιακό εντοπισμό σε επίπεδο κυττάρου ή χρωμοσώματος, κλινικές επιδράσεις των μεταλλάξεων καθώς και ομοιότητες των βιολογικών ακολουθιών και δομών. Οι βάσεις δεδομένων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν η Ensembl και η βάση δεδομένων NCBI. Επίσης για την μελέτη του είδους *Dicentrarchus labrax* ανακτήθηκαν πληροφορίες από τον γονιδιωματικό περιηγητή UCSC (<http://seabass.mpiiz.mpg.de/>).

2.2 Blast

Η διερεύνηση της ύπαρξης ομόλογων γονιδίων των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b στα γονιδιώματα διαφόρων ειδών, συμπεριλαμβανομένου του μαγιάτικου, πραγματοποιήθηκε μέσω του εργαλείου αναζήτησης βασικής τοπικής στοίχισης (Basic Local Alignment Search Tool, Blast).

Έχοντας αντλήσει την αλληλουχία των γονιδίων του ενδιαφέροντος μας από την τσιπούρα (*Sparus aurata*) βάσει προηγούμενων μελετών, με τη χρήση του αλγορίθμου Blast έγιναν προσπάθειες ανεύρεσης των ομόλογων γονιδίων σε διάφορα είδη τα οποία παρουσιάζονται στον (Πίνακα 3). Αφού, εντοπίστηκαν τα ομόλογα γονίδια πραγματοποιήθηκε ανάκτηση των αμινοξικών και των κωδικών αλληλουχιών (CDS) σε μορφή FASTA και παράλληλα αντλήθηκαν πληροφορίες όπως η τοποθεσία του γονιδίου στο χρωμόσωμα, ο αριθμός εξωνίων τα οποία περιέχει το γονίδιο σε κάθε είδος, τα ονόματα που δίνει η βάση δεδομένων στα γονίδια ή στην πρωτεΐνη.

2.3 Πολλαπλή στοίχιση

Η πολλαπλή στοίχιση αλληλουχιών αποτελεί ένα βασικό εργαλείο για μια πληθώρα μοριακών βιολογικών αναλύσεων, από τον εντοπισμό σημαντικών λειτουργικών καταλοίπων έως την εξαγωγή συμπερασμάτων για την ιστορία της εξέλιξης μιας οικογένειας πρωτεϊνών (Kato et al., 2002). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα πολλαπλής στοίχισης MAFFT (Kato et al., 2017).

Αρχικά πραγματοποιήθηκε στοίχιση των πρωτεϊνικών αλληλουχιών οι οποίες ωστόσο εμφάνισαν μειωμένο φυλογενετικό σήμα κατά την φυλογενετική ανάλυση. Αυτό οφείλεται στο μικρό μήκος των πρωτεϊνών καθώς και στο γεγονός ότι οι

πρωτεΐνες αυτές εμφανίζουν μεγάλη συντήρηση. Έπειτα αξιοποιήθηκαν οι αντίστοιχες κωδικές αλληλουχίες.

Πίνακας 3 Τα ομόλογα των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b στα είδη *Latimeria chalumnae*, *Mus musculus*, *Homo sapiens*, *Xiphophorus maculatus*, *Takifugu rubripes*, *Tetraodon nigroviridis*, *Poecilia formosa*, *Gasterosteus aculeatus*, *Oreochromis niloticus*, *Gadus morhua*, *Sparus aurata*, *Dicentrarchus labrax*

Είδος	Αριθμός γονιδίων/Κωδικοί (Accession number)
<i>Latimeria chalumnae</i>	1 / ENSLACG00000001791
<i>Mus musculus</i>	1 / ENSMUSG00000030672
<i>Homo sapiens</i>	1 / ENSG00000180209
<i>Xiphophorus maculatus</i>	2 / ENSXMAG00000024962, ENSXMAG00000021883
<i>Takifugu rubripes</i>	2 / ENSTRUG00000008394, ENSTRUG00000004965
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	2 / ENSTNIG00000014927, ENSTNIG00000000835
<i>Poecilia formosa</i>	2 / ENSPFOG00000013531, ENSPFOG00000007547
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	2 / ENSGACG00000013640, ENSGACG00000007182
<i>Oreochromis niloticus</i>	2 / ENSONIG00000009843, ENSONIG00000011532
<i>Gadus morhua</i>	2 / ENSGMOG00000013719, ENSGMOG00000005541
<i>Sparus aurata</i>	2 / MLC2A AF150904, MLC2B
<i>Dicentrarchus labrax</i>	2 / DLAgN 00101680, DLAgN 00193180

2.4 Φυλογενετική Ανάλυση

Η φυλογενετική ανάλυση είναι η μελέτη των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών, με τις φυλογενετικές αναλύσεις να αποτυπώνονται συχνά με διακλαδιζόμενα (δενδροειδή) διαγράμματα που αντιπροσωπεύουν το γενεαλογικό δένδρο των κληρονομικών σχέσεων μεταξύ μορίων ή οργανισμών. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) το οποίο πραγματοποιεί στατιστική ανάλυση της μοριακής εξέλιξης και κατασκευή φυλογενετικών δένδρων (Kumar et al., 2018).

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του φυλογενετικού δένδρου είναι η Neighbor Joining (NJ). Ο αλγόριθμος NJ εφαρμόζεται στην κατασκευή δένδρων βάσει απόστασης. Η κατασκευή δένδρων ακολουθεί την πολλαπλή στοίχιση των ακολουθιών. Αφού, κατασκευάστηκε το δένδρο, ακολούθησε η τοποθέτηση

ρίζας στο σημείο όπου το δένδρο συνδέεται σε μια ταξινομική μονάδα αναφοράς (outgroup). Η εγκυρότητα του δένδρου που προέκυψε εκτιμήθηκε στατιστικά μέσω της μεθόδου bootstrap, μία μέθοδος αξιολόγησης της οποίας το αποτέλεσμα είναι ένας αριθμός αντιστοιχισμένος σε έναν ορισμένο κλάδο του φυλογενετικού δένδρου. Η επιλογή του κατάλληλου δένδρου για το γονίδιο βασίζεται στην κατάλληλη στοίχιση που προηγήθηκε, στο αν οι εξελικτικές σχέσεις που εμφανίζονται πάνω στο δένδρο συμβαδίζουν με την εξελικτική πορεία των ειδών, και την τιμή bootstrap (Hillis & Bull, 1993).

2.5 Συνταινικότητα

Η συνταινικότητα αφορά την ομολογία μεταξύ των χρωμοσωμικών περιοχών στα διαφορετικά είδη. Πιο συγκεκριμένα, μέσω της συνταινικότητας μπορεί να πραγματοποιηθεί σύγκριση των χρωμοσωμικών περιοχών εκατέρωθεν του γονιδίου ενδιαφέροντος. Για την συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τόσο η διαδικτυακή πλατφόρμα Genomicus (Louis et al., 2015) όσο και η βάση δεδομένων Ensembl Biomart (Hunt et al., 2018).

Η συντηρημένη συνταινικότητα των γονιδίων MYLPF διερευνήθηκε στα γονιδιώματα των ακολούθων ειδών: *Seriola dumerili*, *Xiphophorus maculatus*, *Tetraodon nigrovidis*, *Homo sapiens*. Χρησιμοποιήθηκαν 9 γονίδια ώστε να χαρακτηριστεί η γενωμική τοποθέτηση των γονιδίων MYLPF-a, MYLPF-b και MYLPF.

2.6 Δομή πρωτεΐνης

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών ανάμεσα στα εξής είδη: *Seriola dumerili*, *Xiphophorus maculatus*, *Homo sapiens*. Οι πρωτεΐνες και των τριών ειδών μοντελοποιήθηκαν βάσει του γονιδίου MYLPF στον άνθρωπο. Οι προβλέψεις της δευτεροταγούς και τριτοταγούς δομής προέκυψαν από το πρόγραμμα SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018). Το SWISS-MODEL αποτελεί ένα περιβάλλον συγκριτικής μοντελοποίησης πρωτεϊνών (Peitsch, 1997).

2.7 Γονιδιακή οργάνωση

Η δομή του γονιδίου, η οποία ορίζεται από τον αριθμό και τις θέσεις των εξωνίων, των ιντρονίων, το μέγεθος αυτών, καθώς και από την έκταση και την τοποθέτηση των 3' και 5' αμετάφραστων περιοχών, αποτελεί σημαντικό στοιχείο σύγκρισης και άντλησης συμπερασμάτων για την εξέλιξη του γονιδίου δια-ειδικά.

Η γονιδιακή δομή κατασκευάστηκε με τη χρήση δεδομένων που ανακτήθηκαν από την βάση δεδομένων ENSEMBL (Hunt et al., 2018)

Πραγματοποιήθηκε σύγκριση της δομής των γονιδίου MYLPF του ανθρώπου και των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b στα είδη *Seriola dumerili* και *Xiphophorus maculatus*. Οι γραφικές απεικονίσεις που παρατίθενται στην παράγραφο των αποτελεσμάτων δημιουργήθηκαν μέσω της χρήσης του προγράμματος Exon-Intron Graphic Maker (<http://wormweb.org/exonintron>).

2.8 Γονιδιακή έκφραση

Τα επίπεδα έκφρασης των MYLPF-a και MYLPF-b προσδιορίστηκαν σε διαφορετικά στάδια μαγιάτικου που είχαν εκτραφεί σε δεξαμενές με διαφορετικό χρώμα, λευκό, πράσινο ή μαύρο. Η εκτροφή πραγματοποιήθηκε στο Ελληνικό Κέντρο Θαλασσιών Ερευνών (ΕΛΚΕΘΕ) στην Κρήτη. Προνύμφες μαγιάτικου συλλέχθηκαν στις 3 μέρες μετά την εκκόλαψη και στη συνέχεια κατανεμήθηκαν σε δεξαμενές με διαφορετικό χρώμα. Δείγματα προνυμφών συλλέχθηκαν τις ημέρες 5, 17, 25, και 30 μετά την εκκόλαψη από κάθε χρώμα. Η εξαγωγή ολικού RNA και η σύνθεση cDNA πραγματοποιήθηκε από το ΕΛΚΕΘΕ σύμφωνα με καθιερωμένα πρωτόκολλα. Δείγματα cDNA έφτασαν στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας για περαιτέρω ανάλυση. Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων προσδιορίστηκαν με Real-Time PCR.

Η Real-Time PCR είναι μια μέθοδος ποσοτικοποίησης νουκλεϊκών οξέων. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην αξιόπιστη ανίχνευση και καταμέτρηση των προϊόντων κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου μιας κλασσικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), τα οποία είναι ευθέως ανάλογα της αρχική ποσότητας του νουκλεϊκού οξέος, και στην συγκεκριμένη περίπτωση των mRNA των παράλογων γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b, πριν την έναρξη της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Arya et al., 2005). Η ανίχνευση αυτή πραγματοποιείται μέσω της δράσης μια χρωστικής, της Sybr Green. Η χρωστική αυτή προσδένεται στο δίκλωνο προϊόν της PCR, μέσω μιας διαδικασίας η οποία είναι ανεξάρτητη της αλληλουχίας και εκπέμπει φθορισμό (Ponchel et al., 2003).

Η ποσοτικοποίηση των επιπέδων των μεταγράφων μπορεί να είναι είτε απόλυτη είτε σχετική. Στην παρούσα πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σχετική ποσοτικοποίηση. Η σχετική ποσοτικοποίηση μετρά τη σχετική μεταβολή στα επίπεδα έκφρασης του mRNA. Καθορίζει τις αλλαγές στη σταθερότητα του mRNA ενός γονιδίου σε πολλαπλά δείγματα και τις εκφράζει σε σχέση με τα επίπεδα ενός άλλου RNA (Michael W Pfaffl, 2004).

2.8.1 Τα ιδιοστατικά γονίδια

Η έκφραση των γονιδίων ενδιαφέροντος συγκρίθηκε με την έκφραση ιδιοστατικών γονιδίων. Ως ιδιοστατικά ορίζονται γονίδια τα οποία εκφράζονται σε σταθερά,

θεωρητικά, επίπεδα στους διάφορους ιστούς και αναπτυξιακά στάδια και τα επίπεδα έκφρασης τους παραμένουν σχετικά σταθερά σε ποικίλες πειραματικές συνθήκες (Arya et al., 2005). Στις πειραματικές διαδικασίες, οι οποίες πραγματοποιούνται μέσω της qPCR εισάγονται σφάλματα εξαιτίας της μικρής διαφοράς στην αρχική ποσότητα του RNA, στην ποιότητά του, είτε εξαιτίας διαφορών στην αποδοτικότητα της σύνθεσης του cDNA και στην ενίσχυση μέσω της PCR με αποτέλεσμα να εμφανίζονται διακυμάνσεις ανάμεσα στα δείγματα (Arya et al., 2005). Τα ιδιοστατικά γονίδια ενισχύονται όπως το RNA στόχος, και λειτουργούν ως μια εσωτερική αναφορά σύμφωνα με την οποία κανονικοποιούνται οι τιμές έκφρασης που προκύπτουν από την Real-Time PCR (Arya et al., 2005).

Με γνώμονα την υπάρχουσα βιβλιογραφία για τα ιδιοστατικά γονίδια αλλά και τα δεδομένα που αφορούν τα ιδιοστατικά γονίδια συγγενικών του μαγιάτικου ειδών προχωρήσαμε στην επιλογή πιθανών γονιδίων με ιδιοστατικά χαρακτηριστικά και πραγματοποιήσαμε σε αυτά αναλύσεις Real Time PCR.

2.8.2 Σχεδιασμός εκκινητών

Το πρώτο βήμα για την πραγματοποίηση της Real-Time PCR τόσο για τα γονίδια ενδιαφέροντος όσο και για τα ιδιοστατικά γονίδια απαιτεί τον σχεδιασμό εκκινητών, οι οποίοι θα επιτρέψουν την ενίσχυση των επιθυμητών γονιδίων μέσω της δράσης του ενζύμου της πολυμεράσης.

Ο σχεδιασμός πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των προγραμμάτων Primer3 (Untergasser et al., 2012) και BeaconDesigner. Με την εισαγωγή στα παραπάνω προγράμματα των αλληλουχιών των γονιδίων, τα προγράμματα προχώρησαν στην απόδοση ζευγών ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία αποτελούσαν πιθανούς εκκινητές για το εκάστοτε γονίδιο.

2.8.3 Πρωτόκολλο αντίδρασης Real-Time PCR

Κάθε μία από τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν είχε τελικό όγκο 20μl.

Τα συστατικά κάθε αντίδρασης ήταν τα εξής:

- Sybr Green 2x (10μl)
- cDNA με αραιώση 1/25
- Εκκινητές των οποίων οι συγκεντρώσεις παρατίθενται στους πίνακες 2 και 3, όπως και οι αλληλουχίες τους.

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του μηχανήματος CFX Manager 3.1 της εταιρίας Bio-rad.

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε κάθε αντίδραση είναι η εξής:

1. Προετοιμασία του μηχανήματος στους 95.0 °C για 3:00'
2. Αποδιάταξη των δίκλωνων τμημάτων στους 95.0 °C για 0:15'
3. Υβριδοποίηση των εκκινητών και δράση της πολυμεράσης στους 95.0 °C για 0:40'
4. Τα βήματα 2 και 3 επαναλαμβάνονται άλλες 39 φορές για να συμπληρωθούν 40 κύκλοι της διαδικασίας σε κάθε αντίδραση.
5. Για την δημιουργία της καμπύλης αποδιάταξης πραγματοποιείται αύξηση της θερμοκρασίας κατά 0,5 °C, με αφετηρία τη θερμοκρασία των 65°C η οποία θα καταλήξει στην τερματική τιμή των 95°C και η διαδικασία αυτή έχει τη διάρκεια των 0:05'.

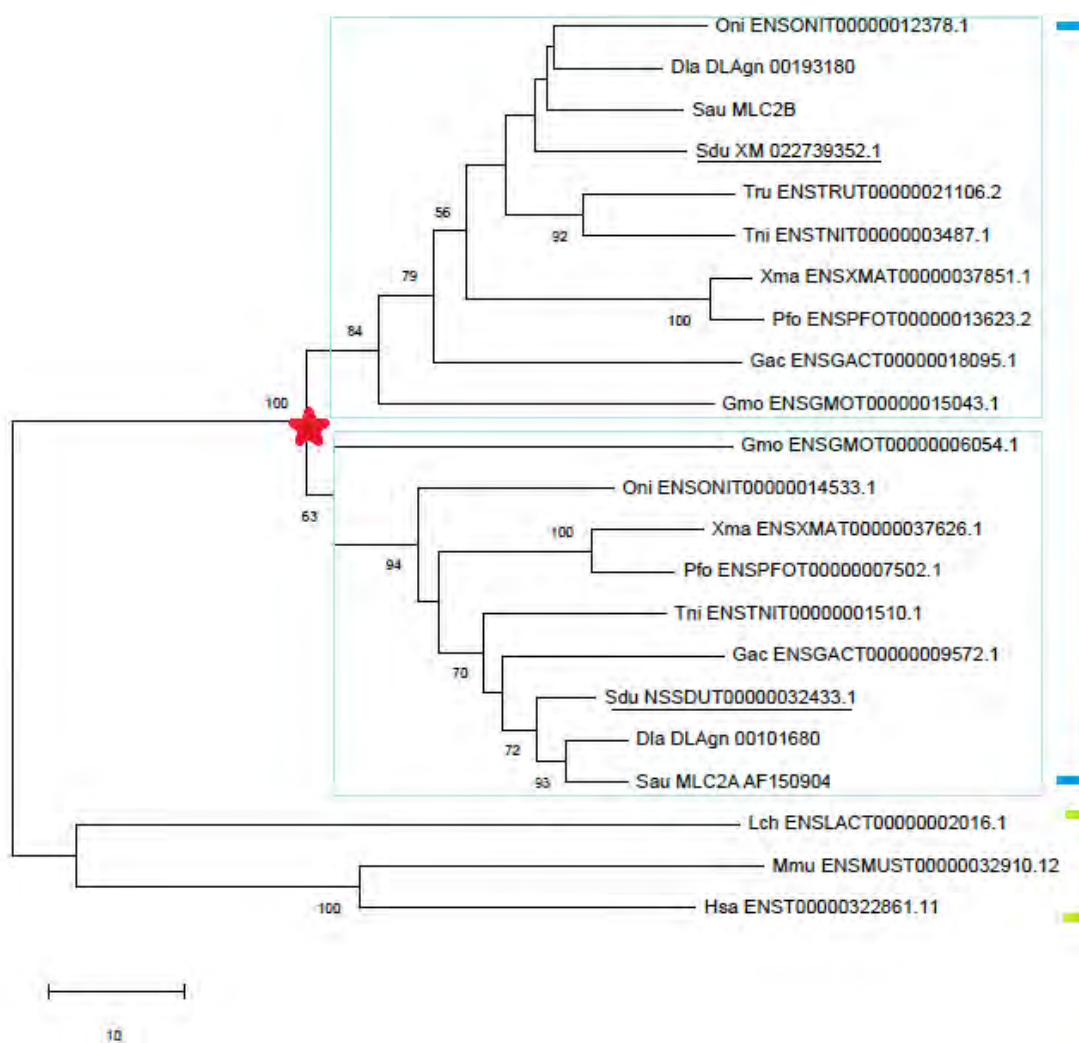
2.8.4. Στατιστική ανάλυση

Στην παρούσα μελέτη η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της two-way analysis of variance (ANOVA), στην οποία πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης των δύο παραλόγων γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b, η οποία αποτελεί την εξαρτημένη μεταβλητή δύο συναρτήσεων, του αναπτυξιακού σταδίου (5, 17, 25, 30 dph) και του χρώματος της δεξαμενής (λευκό, πράσινο, μαύρο), και t-test για την σύγκριση ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Φυλογενετική Ανάλυση

Μέσω του προγράμματος Mega X κατασκευάστηκε το φυλογενετικό δένδρο που παρουσιάζεται στην Εικόνα 9. Η διάταξη του δένδρου αποκαλύπτει ότι τα γονίδια MYLPF-a και MYLPF-b που απαντώνται στους τελεόστεους είναι παράλογα, με ομόλογο το γονίδιο MYLPF των τετραπόδων και της κοιλάκανθου. Το γονίδιο MYLPF-a στο μαγιάτικο απεικονίζεται με τον κωδικό (Sdu XM_022739352.1) ενώ το γονίδιο MYLPF-b με τον κωδικό (Sdu NSSDUT00000032433.1).



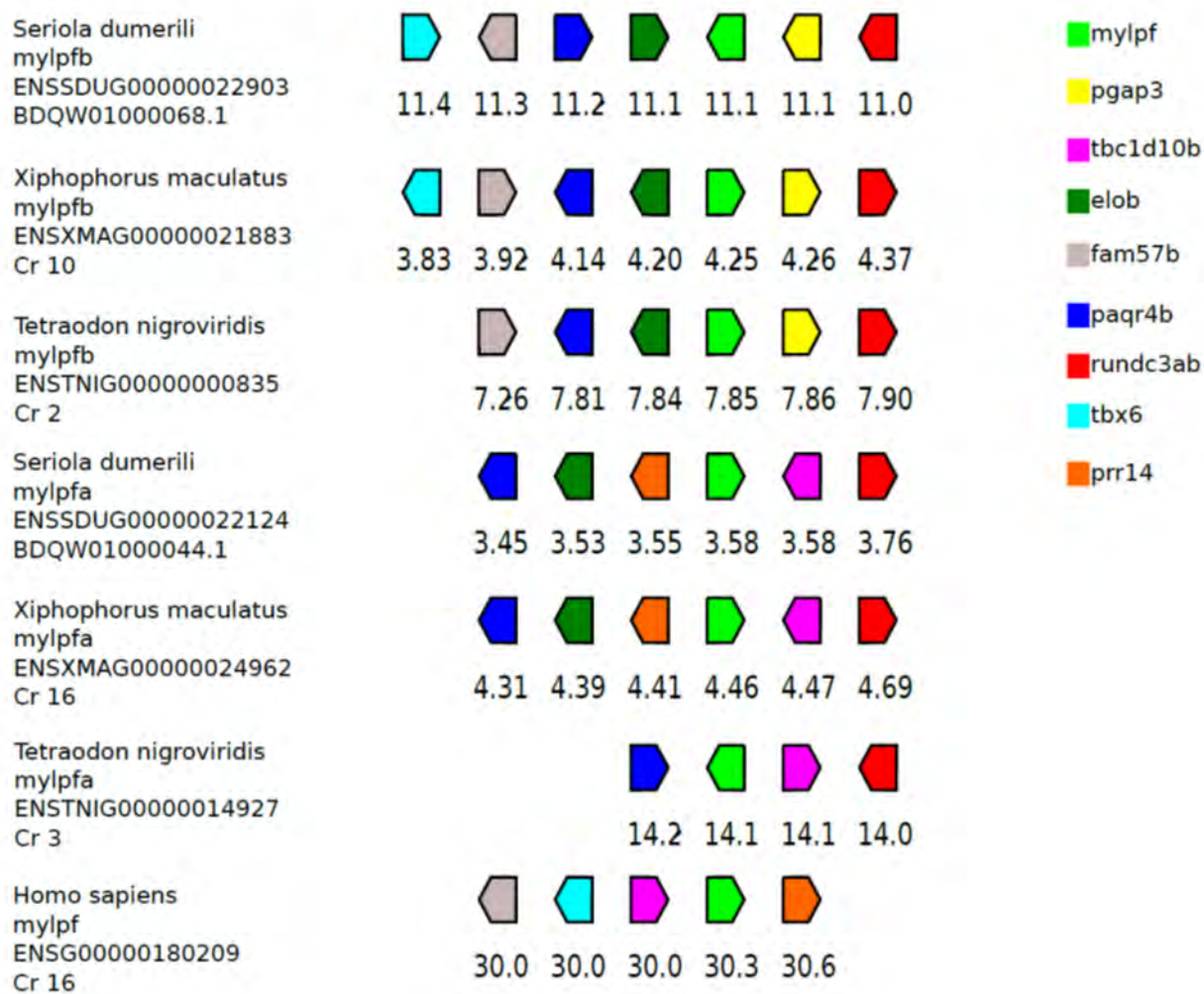
Εικόνα 9 Το φυλογενετικό δένδρο για τα ομόλογα του MYLPF γονίδια που σχεδιάστηκε με τη μέθοδο *neighbor joining*, όπου παρατηρείται ο τρίτος γύρος διπλασιασμού που συνέβη στον κόμβο που τοποθετείται το κόκκινο αστέρι. Με το μπλε χρώμα σημειώνονται τα γονίδια MYLPF-a και MYLPF-b στους τελεόστεους, ενώ με πράσινο στα τετράποδα και την κοιλάκανθο. Τέλος, τα δύο γαλάζια πλαίσια πλαισιώνουν το καθένα ένα από τα δύο παράλογα γονίδια σε κάθε τελεόστεο, ενώ τα δύο παράλογα γονίδια MYLPF-a και MYLPF-b στο μαγιάτικο είναι υπογραμμισμένα.

Η εξω-ομάδα, δηλαδή η ομάδα με τη μεγαλύτερη γενετική απόσταση (συμβολίζεται με πράσινη γραμμή), αποτελείται από το γονίδιο MYLPF στον άνθρωπο (Hsa ENTS00000322861.11), στον ποντικό (Mmu ENSMUST00000032910.12), και στην κοιλάκανθο (Lch ENSLACT00000002016.1).

Στην Εικόνα 9 παρατηρείται ένας κόμβος διπλασιασμού, ο οποίος συμβολίζεται με ένα αστέρι. Κάθε γαλάζιο πλαίσιο περιλαμβάνει ένα από τα δύο παράλογα των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b σε κάθε είδος που ανήκει στους τελεόστεους (σημειώνονται με την μπλε γραμμή). Εφόσον τα διπλασιασμένα γονίδια αντιστοιχούν στα είδη που ανήκουν στην ομάδα των τελεοστέων, ισχυροποιείται η υπόθεση ότι τα γονίδια είναι αποτέλεσμα του 3R διπλασιασμού. Τέλος, οι εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των γονιδίων που παρατηρούνται στο παραπάνω δένδρο, ακολουθούν το πρότυπο εξέλιξης των αντίστοιχων ειδών.

3.2 Ανάλυση συνταινικότητας

Από την συγκριτική μελέτη των συνταινικών περιοχών μεταξύ των ομόλογων γονιδίων MYLPF, MYLPF-a, MYLPF-b παρουσιάζονται οι συντηρημένες περιοχές μεταξύ του μαγιάτικου (*Seriola dumerili*), του ανθρώπου (*Homo sapiens*) και των δύο τελεόστεων *Xiphophorus maculatus* και *Tetraodon nigroviridis*.



Εικόνα 10 Ανάλυση συνταϊνικών περιοχών για τα γονίδια MYLPF, MYLPF-a και MYLPF-b των ειδών *Seriola dumerili*, *Xiphophorus maculatus*, *Tetraodon nigroviridis*, *Homo sapiens*.

Στην Εικόνα 10 απεικονίζονται τα γονίδια PGAP3, TBC1D10B, ELOB, FAM57B, PAQR4B, RUNC3AB, TBX6 και PRR14, και το γονίδιο MYLPF στον άνθρωπο, και τα παράλογα γονίδια MYLPF-a και MYLPF-b στους τρεις τελεόστεους *Seriola dumerili*, *Xiphophorus maculatus*, *Tetraodon nigroviridis*. Όσον αφορά το γονίδιο MYLPF-b, η παράθεση των γονιδίων εκατέρωθεν αυτού διατηρείται πανομοιότυπη και στους τρεις ακτινοπτερυγίους με μόνη διαφορά την έλλειψη του TBX6 σε έναν από αυτούς. Αντίστοιχη εικόνα επικρατεί και για το παράλογο γονίδιο MYLPF-a. Η παράταξη των γονιδίων διατηρεί ένα μοτίβο δια-ειδικά, με πολλά από τα γονίδια εκατέρωθεν και των δύο παραλόγων, ενισχύοντας την υπόθεση ότι τα παράλογα γονίδια MYLPF-a και

MYLPF-b αποτελούν αποτέλεσμα του τρίτου γύρου πολλαπλασιασμού του γονιδιώματος (3R).

Αξίζει να τονιστεί ότι η γονιδιακή περιοχή εκατέρωθεν του γονιδίου MYLPF-a των *Seriola dumerili*, *Xiphophorus maculatus* και *Tetraodon nigrovindis* εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιότητα με την περιοχή εκατέρωθεν του γονιδίου MYLPF στον άνθρωπο, σε σχέση με αυτή του γονιδίου MYLPF-b.

3.3 Δομή πρωτεϊνών

3.3.1 Δευτεροταγής δομή

Πραγματοποιήθηκε ανάλυση της δομής των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονίδιο MYLPF στον άνθρωπο, καθώς και των πρωτεϊνών των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b στα είδη *Seriola dumerili* και *Xiphophorus maculatus*.

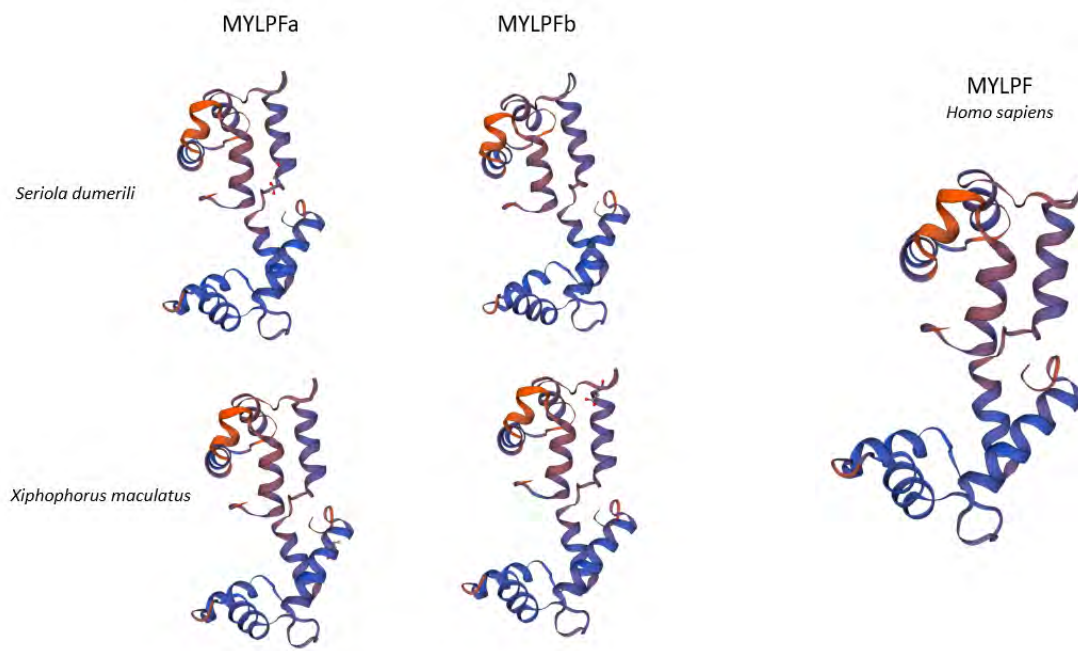


Εικόνα 11 Η δευτεροταγής δομή των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονίδιο MYLPF σε *Homo sapiens*, και τα γονίδια MYLPFa και MYLPFb σε *Seriola dumerili* και *Xiphophorus maculatus*. Με γαλάζιο επισημαίνονται οι α-έλικες.

Στο γονίδιο MYLPF του ανθρώπου (Εικόνα 11) παρατηρούνται εννέα α-έλικες. Ο αριθμός των α-ελίκων παραμένει ο ίδιος και στα δύο παράλογα γονίδια MYLPF-a και MYLPF-b και στους δύο τελεόστεους *Seriola dumerili* και *Xiphophorus maculatus*. Οι εννέα αυτές α-έλικες που σχηματίζονται σε κάθε πρωτεΐνη που παράγεται από τα παραπάνω ομόλογα γονίδια, παρουσιάζει την μεγάλη συντήρηση στις αμινοξικές αλληλουχίες των πρωτεϊνών.

3.3.2 Τριτοταγής δομή

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η απεικόνιση των τριτοταγών δομών των πρωτεϊνών των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b σε *Seriola dumerili* και *Xiphophorus maculatus* και του γονιδίου MYLPF του ανθρώπου.

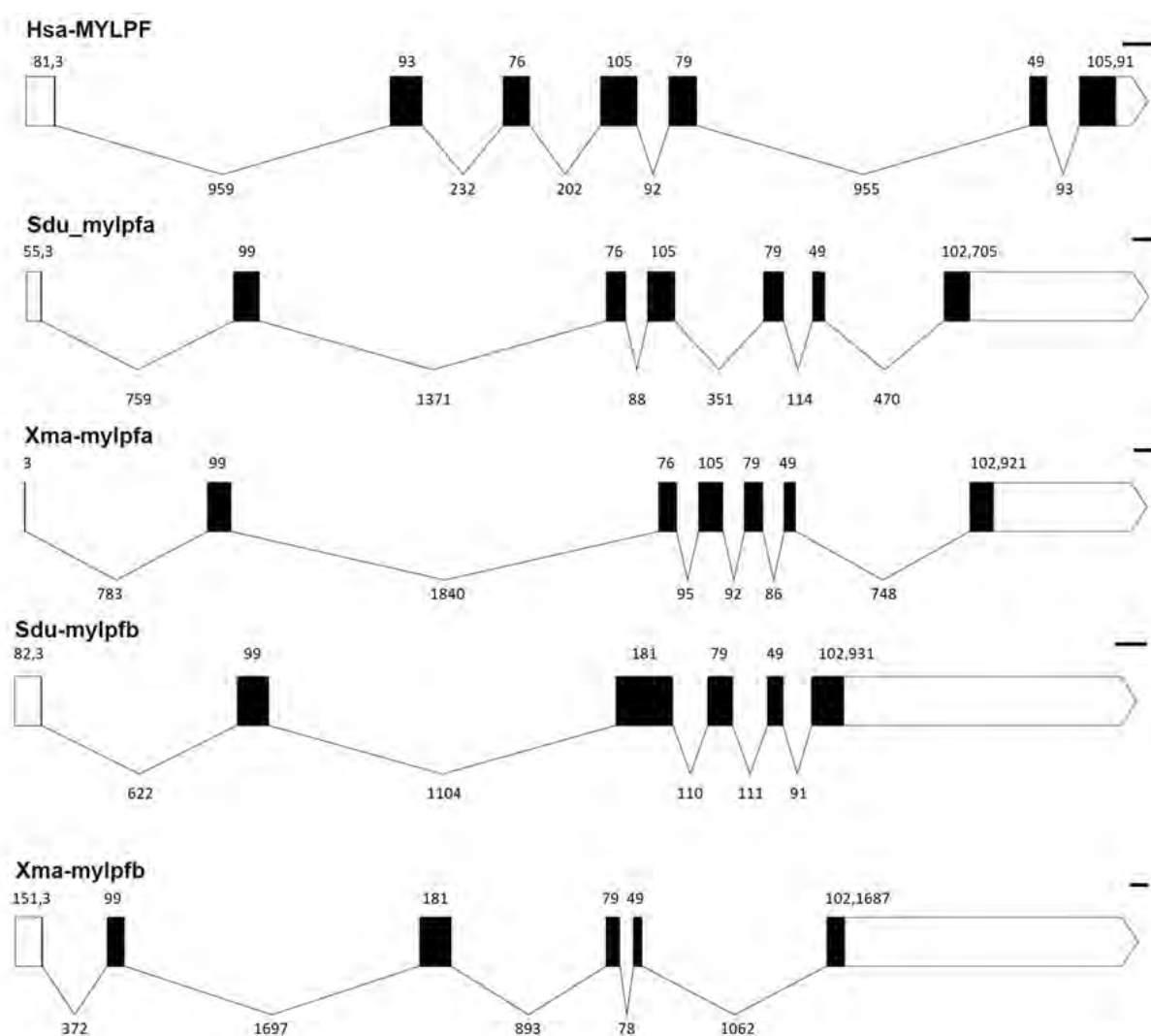


Εικόνα 12 Η τριτοταγής δομή των πρωτεϊνών που κωδικοποιούνται από το γονίδιο MYLPF του ανθρώπου και από τα γονίδια MYLPF-a και MYLPF-b των *Seriola dumerili* και *Xiphophorus maculatus*.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 12, οι τριτοταγείς δομές των πρωτεϊνών του γονιδίου MYLPF-a εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα, όπως και οι πρωτεΐνες του γονιδίου MYLPF-b, αλλά και οι πρωτεΐνες MYLPF-a και MYLPF-b σε κάθε είδος. Τέλος, οι πρωτεΐνες των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με αυτή του γονιδίου MYLPF στον άνθρωπο. Η ομοιότητα των τριτοταγών δομών συμβαδίζει με την ύπαρξη του ίδιου αριθμού α-ελικών σε κάθε πρωτεΐνη.

3.4 Γονιδιακή δομή

Ακολούθησε η ανάλυση της γονιδιακής δομής στο γονίδιο MYLPF στον άνθρωπο (*Homo sapiens*) και στα γονίδια MYLPF-a και MYLPF-b στα είδη *Seriola dumerili*, *Xiphophorus maculatus*.



Εικόνα 13 Απεικόνιση του πλήθους και του μεγέθους των ιντρονίων και του μεγέθους των αμετάφραστων περιοχών του γονιδίου MYLPF στον άνθρωπό και των ομόλογών του και μεταξύ τους παραλόγων γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b στα είδη *Seriola dumerili* και *Xiphophorus maculatus*.

Μέσω της ανάλυσης αυτής προκύπτει η Εικόνα 13, στην οποία απεικονίζονται ο αριθμός και το μέγεθος των ιντρονίων και των εξωνίων, καθώς και των αμετάφραστων περιοχών στα παραπάνω γονίδια.

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 13, το γονίδιο MYLPF στον άνθρωπο όπως και το γονίδιο MYLPF-a στα είδη *Seriola dumerili* και *Xiphophorus maculatus* αποτελούνται από επτά (7) εξώνια, ενώ το γονίδιο MYLPF-b αποτελείται από έξι (6) εξώνια. Η διαφορά στην ύπαρξη ενός παραπάνω εξωνίου για τα γονίδια MYLPF-MYLPF-a σε σχέση με το γονίδιο MYLPFb μπορεί να εξηγηθεί εύκολα από το γεγονός ότι το εξώνιο μεγέθους 181 ζευγών βάσεων του γονιδίου MYLPF-b προκύπτει από τη συνένωση των δύο εξωνίων με μέγεθος 76 και 105 ζευγών βάσεων.

Επίσης, όσον αφορά το γονίδιο MYLPF του ανθρώπου παρατηρείται ότι το μέγεθος του δεύτερου εξωνίου είναι μικρότερο σε σχέση με το αντίστοιχο εξώνιο στα γονίδια MYLPF-a των δύο άλλων ειδών. Ωστόσο, εφόσον η διαφορά αυτή (6 ζευγών βάσεων) είναι πολλαπλάσιο του αριθμού των νουκλεοτιδίων που συγκροτούν ένα εξώνιο, θεωρούμε ότι κωδικοποιούνται δύο λιγότερα αμινοξέα.

Τέλος, αξιοσημείωτη είναι η μεγάλη διαφορά στο μέγεθος της 3' αμετάφραστης περιοχής ανάμεσα σε όλα τα γονίδια.

3.5 Ιδιοστατικά γονίδια

Τα γονίδια τα οποία ελέχθηκαν ως προς τον ιδιοστατικό τους χαρακτήρα μέσω της παρούσας μελέτης είναι τα εξής:

- ACTB: Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μία από τις έξι διαφορετικές πρωτεΐνες ακτίνης. Οι ακτίνες είναι υψηλά συντηρημένες πρωτεΐνες και συμμετέχουν στην κυτταρική κινητικότητα, τη δομή και την ενδοκυτταρική σηματοδότηση.
- ELF1: Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια ισομορφή της άλφα υπομονάδας του συμπλόκου του παράγοντα επιμήκυνσης 1, το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενζυμική μεταφορά των αμινο-άκυλο tRNAs στο ριβόσωμα.
- FAU: Κωδικοποιεί την ριβοσωμική πρωτεΐνη S30 συντιγμένη με μια ubiquitin-like πρωτεΐνη. Η ριβοσωμική πρωτεΐνη S30 είναι συστατικό της 40S υπομονάδας του ριβωσώματος στο κυτόπλασμα.
- RPL13: Αυτό το γονίδιο κωδικοποιεί μια ριβοσωμική πρωτεΐνη η οποία είναι συστατικό της 60S υπομονάδας, ανήκει στην οικογένεια L13E των ριβοσωμικών πρωτεϊνών και εντοπίζεται στο κυτόπλασμα.
- RPS18: Κωδικοποιεί μια ριβοσωμική πρωτεΐνη η οποία είναι συστατικό της 40S υπομονάδας, ανήκει στην οικογένεια S13P των ριβοσωμικών πρωτεϊνών και εντοπίζεται επίσης στο κυτόπλασμα.

Οι πληροφορίες που αναφέρθηκαν παραπάνω έχουν αντληθεί από το Εθνικό Κέντρο Βιοτεχνολογικής Πληροφόρησης των ΗΠΑ (NCBI).

3.5.1 Σχεδιασμός εκκινητών για τα ιδιοστατικά γονίδια

Τα προγράμματα σχεδιασμού εκκινητών που αναφέρθηκαν και προηγουμένως παρουσιάζουν μια πληθώρα πληροφοριών για τα ολιγονουκλεοτίδια πέραν των αλληλουχιών τους, όπως τα σημεία τήξης τους και το κατά πόσο είναι εφικτό να υβρίζονται τόσο μεταξύ τους όσο και να υβριδοποιούνται νουκλεοτίδια εντός του ίδιου ολιγονουκλεοτιδίου με αποτέλεσμα των σχηματισμό διμερών δομών. Λαμβάνοντας υπόψιν όλες τις πληροφορίες που παρέχονται από τα προγράμματα προχωρήσαμε στην επιλογή των εκκινητών οι οποίοι εμφανίζουν τα βέλτιστα δυνατά χαρακτηριστικά και οδηγούν στην αποκλειστική ενίσχυση των επιθυμητών περιοχών.

Οι εκκινητές που επιλέχθηκαν καθώς και οι συγκεντρώσεις αυτών παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4 Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση έκφρασης των ιδιοστατικών γονιδίων

Γονίδιο	Αλληλουχία forward εκκινητή	Αλληλουχία Reverse εκκινητή	C forward (nM/μL)	C reverse (nM/μL)
ACTB	CCCAAAGCCAACAGGGAGAA	AGGCATACAGGGACAGCACA	150	150
ELF1	CACCCCAAGTTCGTCAAGTC	GACCAAGGGGAGCGTAGTTG	300	300
FAU	TGAGGGGACAGACACCCAAG	ACGTTCAAAAGCGCCTGTT	300	300
RPL13	TTGCCCCACAAAACCAAGAG	ACGTTCAAAAGCGCCTGTT	300	300
RPS18	ATCGCCTTCGCCATCACTG	GCTCCCAGCCCTCTTGTTG	150	100

3.5.2 Σχεδιασμός εκκινητών για τα παράλογα γονίδια MYLPF-a και MYLPF-b

Ο σχεδιασμός των εκκινητών για την ενίσχυση των δύο παραλόγων αυτών γονιδίων απαίτησε διαφορετική προσέγγιση. Λαμβάνοντας υπόψιν τη μεγάλη συντήρηση ανάμεσα στις αλληλουχίες δύο παραλόγων γονιδίων, ο σχεδιασμός των δύο ζευγών εκκινητών είχε ως στόχο της υβριδοποίηση τους σε μια όχι τόσο συντηρημένη περιοχή. Η περιοχή που επιλέχθηκε ήταν η 3'UTR, η οποία εμφανίζει επαρκούσα παραλλακτικότητα ανάμεσα στα δύο παράλογα γονίδια.

Τέλος, οι εκκινητές σχεδιάστηκαν ώστε να υβριδίζουν την νουκλεοτιδική αλληλουχία ανάμεσα στο κωδικόνιο λήξης και στο πρώτο σήμα πολύ-αδενυλίωσης (AATAAA). Αυτός ο σχεδιασμός είχε ως στόχο να μην επηρεαστεί η καταγραφόμενη έκφραση του κάθε γονιδίου από την ύπαρξη εναλλακτικών μεταγράφων με διαφορετικό μήκος

της 3'UTR. Παρακάτω παρατίθενται οι νουκλεοτιδικές και οι αντίστοιχες αμινοξικές κωδικοποιητικές περιοχές των δύο παραλόγων γονιδίων, ενώ στον Πίνακα 5 παρουσιάζονται οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν.

ENSSDUT00000032433.1 MYLPF protein coding

```
GGCTCCAATACTTACATGTCAGTCACATCGGCTTGGCGTAGGCTTCTCTTCTTGACCAACA
ACAACCCACAAAACCTTGAGAGATGCACCCAAGAAGGCCAAGAGGAGACAGCAGCAGGGT
M A P K K A K R R Q Q Q G
GAGGGTGGATCCTCCAATGTGTTCTCCATGTTTGAGCAGAGCCAGATCCAGGAGTACAAG
E G G S S N V F S M F E Q S Q I Q E Y K
GAGGCTTTACAATCATCGACCAGAACAGAGATGGCATCATCAGCAAGGACGACCTCAGG
E A F T I I D Q N R D G I I S K D D L R
GACGTGCTGGCCACCATGGGCCAACTGAATGTGAAGAATGAGGAGCTGGAGGCCATGGTG
D V L A T M G Q L N V K N E E L E A M V
AAGGAGGCCAGCGGCCCATCAACTTCACCGTCTTCCCTGACCATGTTTCGGCGAGAAGCTG
K E A S G P I N F T V F L T M F G E K L
AAGGGTGTGATCCCAGGACGTCATCGTGAGCGCTTTCAGGTCCTGGACCCCGAGGGC
K G A D P E D V I V S A F K V L D P E G
ACCGGCTCCATCAAGAAGGAATTCCTTGAGGAGCTCCTGACCACCCAGTGCACAGGTTTC
T G S I K K E F L E E L L T T Q C D R F
ACCGCTGAGGAGATGACCAACCTGTGGGCTGCTTCCCCCCTGATGTGGCTGGCAATGTG
T A E E M T N L W A A F P P D V A G N V
GACTACAAGAACATCTGCTACGTCATCACACACGGAGAGGACAAGGAGGAGTAAATATCC
D Y K N I C Y V I T H G E D K E E -
CTCTACCAAGATCTCTACCTCCGTTCAAACCCATACCCGCTCCACCATCTACTCACTCCC
TCTTCTCCAACACCGTGGCTTCCCTTGACACGCTCGCGCCCCGGCCCTTCTTTCCGCTT
GCCAGCTCACTACGAAAAGACTTGTCTCCTTTATTGAGATTGAGACACAGTGAGAGGACT
GAAGGCTGTGGGGGTGTTTGTGTGTGAGTACCAACAGGGGAACATGGGATTATTTTCAAT
AAAAATAATCTTGTGACACCGAAACACTCTCTCTATCTCTGTCCCTGCCTCTTGTTCCTC
CTCCTTTTCTCCCATCACTCATTCTGTCTTCTGTGTTGAGGCCAACAGTGCATGCATC
ATACCTACGCGCAGGTTGTATGCCTATGCAGTCCAGTGTATACAGCGGTCAGTCAAAAAA
AAAAAACTTCCCTTGGGTGCTGTGGTGCATGCACAGTCACTTGCTTGAAACAAGTAAGC
AGTCTGACCCAAGTGGTCTGTAGTCTTAACACGACACAGAGTGTTTAATGGATTTGTCC
CTTCGTTTGTATTGGAGAGGACTGCACAGTAAAAGAGTGGGGTACTGTACTATAATAGT
TTCCCTACCCCTCTCTTTTTTTTACATCTGTCTCTCACTCGCTTATACACAGGTAGAAAAG
GAAAAGTTGCAGTGAAAAGAGGAAAGCTTGGTTTTTTTTTAAAACCTTAAATCTTGTAATA
GAGAAAGAGATGGTGAAGATGGTGTGAGTGGGAGGCAGGAAAGAATAAAACAAAAGTAAAA
CAGCTTTGTTTTGGACTCTCCTTCCTCCTTCTCGCTGCTGTTTCTCTCCTGTTGTTGTGA
CTGTGTCTATGTCTCCACTGTAACAATAAAAGAAGCACAAATAAAATCCATTATCTTTTCG
TACGACACTGTGTCTGTTGGTTTAA
```

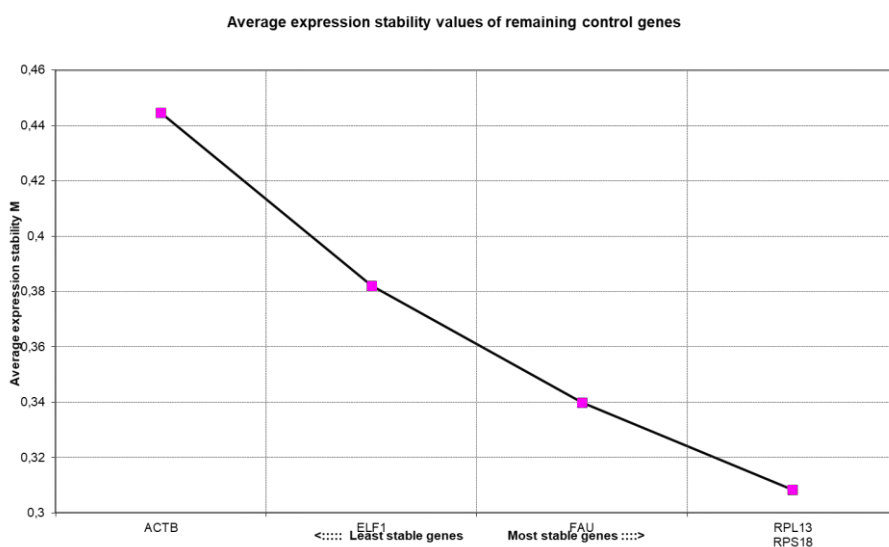
MYLPF XM_022739352.1 protein coding

```
TTACACTGTCTTCTCTTTCTTGTATCATCCAAACCTCCACTCATACCGTCTCAAGATCGCA
M A
CCAAAAGAAGGCCAAGAGGAGGCAGGCAGCAGGAGACGGAGGCTCCTCCAATGTGTTCTCC
P K K A K R R Q A A G D G G S S N V F S
ATGTTTGTGAGCAGAGCCAGATTCAGGAGTACAAGGAGGCTTACAATCATTGACCAGAAC
M F E Q S Q I Q E Y K E A F T I I D Q N
AGAGACGGTATCATCAGCAAAGATGACCTGAGGGACGTGCTGGCCTCAATGGGCCAGTTG
R D G I I S K D D L R D V L A S M G Q L
AATGTGAAGAATGAGGAGCTGGAGGCCATGATCAAGGAGGCCAGCGGCCCATCAACTTC
N V K N E E L E A M I K E A S G P I N F
ACCGTCTTCCCTCACCATGTTTCGGAGAGAAGCTGAAGGGTGTGATCCCAGGACGTTATT
```

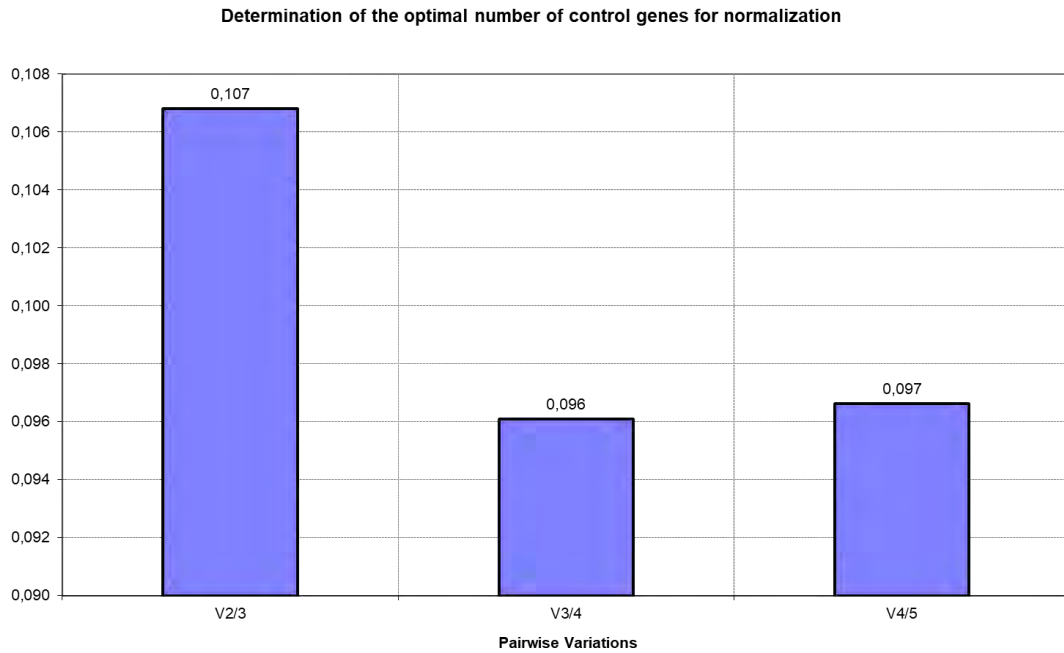

Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται οι αποδόσεις των αντιδράσεων τόσο των ιδιοστατικών γονιδίων όσο και των δύο παραλόγων γονιδίων MYLRF-a και MYLRF-b που μελετήθηκαν στο μαγιάτικο.

3.7 Κανονικοποίηση

Τα υποψήφια ιδιοστατικά γονίδια αξιολογήθηκαν πριν τη χρήση τους μέσω του αλγορίθμου geNorm και επιλέχθηκαν τα πιο σταθερά από αυτά (Vandesompele et al., 2002). Μέσω του geNorm προσδιορίζεται η τιμή γονιδιακής σταθερότητας (M) για κάθε γονίδιο. Το γονίδιο με την χαμηλότερη τιμή (M) εμφανίζει την μεγαλύτερη σταθερότητα (Vandesompele et al., 2002). Όπως παρουσιάζεται και στην Εικόνα 14, το γονίδιο με την μικρότερη σταθερότητα ήταν το ACTB, ενώ τα δύο πιο σταθερά ήταν τα γονίδια RPS18 και RPL13.



Εικόνα 14 Η τιμή γονιδιακής σταθερότητας (M) για κάθε ένα από τα γονίδια ACTB, ELF1, FAU, RPL13, RPS18, τα οποία παρουσιάζονται από το πιο ασταθές στο πιο σταθερό.

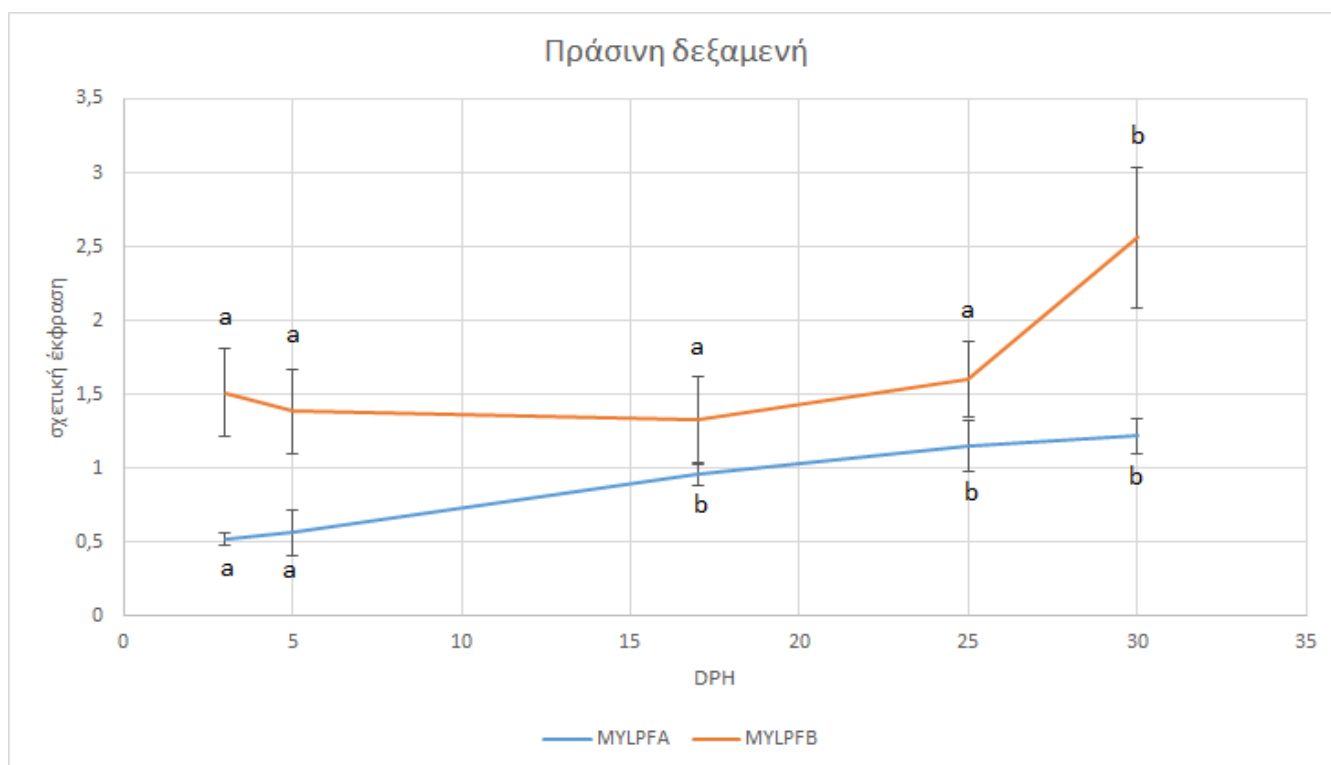


Εικόνα 15 Καθορισμός του βέλτιστου αριθμού ιδιοστατικών γονιδίων για την κανονικοποίηση των τιμών έκφρασης.

Επίσης, καθορίστηκε και ο βέλτιστος αριθμός ιδιοστατικών γονιδίων (των πιο σταθερών), όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 15, για την κανονικοποίηση των τιμών έκφρασης. Ο παράγοντας κανονικοποίησης προέκυψε από τον γεωμετρικό μέσο των τεσσάρων πιο σταθερών ιδιοστατικών γονιδίων δηλαδή των γονιδίων RPL13, RPS18, FAU και ELF1.

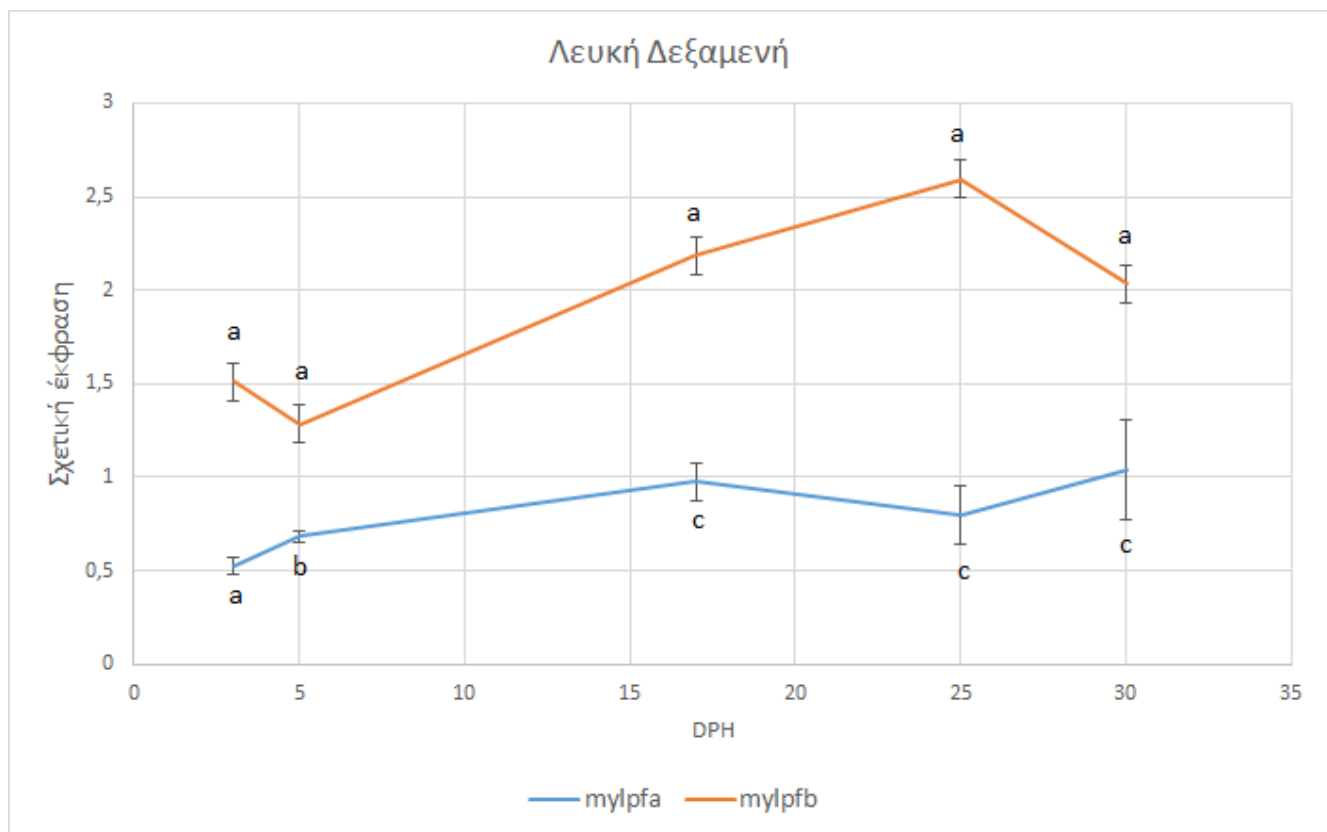
3.8 Η έκφραση των γονιδίων MYLPP-a και MYLPP-b

Η ανάλυση της έκφρασης των δύο παραλόγων γονιδίων MYLPP-a και MYLPP-b πραγματοποιήθηκε με βάση το χρώμα της δεξαμενής έτσι ώστε να παρατηρηθούν οι πιθανές επιπτώσεις του χρώματος αυτής στην έκφραση των γονιδίων. Στην Εικόνα 16 παρουσιάζεται η σχετική έκφραση των δύο παραλόγων γονιδίων στις ημέρες 3, 5, 17, 25 και 30 μετά την εκκόλαψη στα άτομα τα οποία εκτράφηκαν σε πράσινες δεξαμενές.



Εικόνα 16 Η σχετική έκφραση των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b στα αναπτυξιακά στάδια 3DPH, 5DPH, 17DPH, 25DPH, 30DPH, κατά την ανάπτυξη των ατόμων σε δεξαμενή πράσινου χρώματος. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές εκτιμήθηκαν μέσω t-test και το όριο τέθηκε για $P < 0.05$. Οι τιμές του γραφήματος παρουσιάζονται ως μέσοι όροι με \pm τυπικό σφάλμα. Τα σημεία που φέρουν τα ίδια γράμματα δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική μεταξύ τους διαφορά.

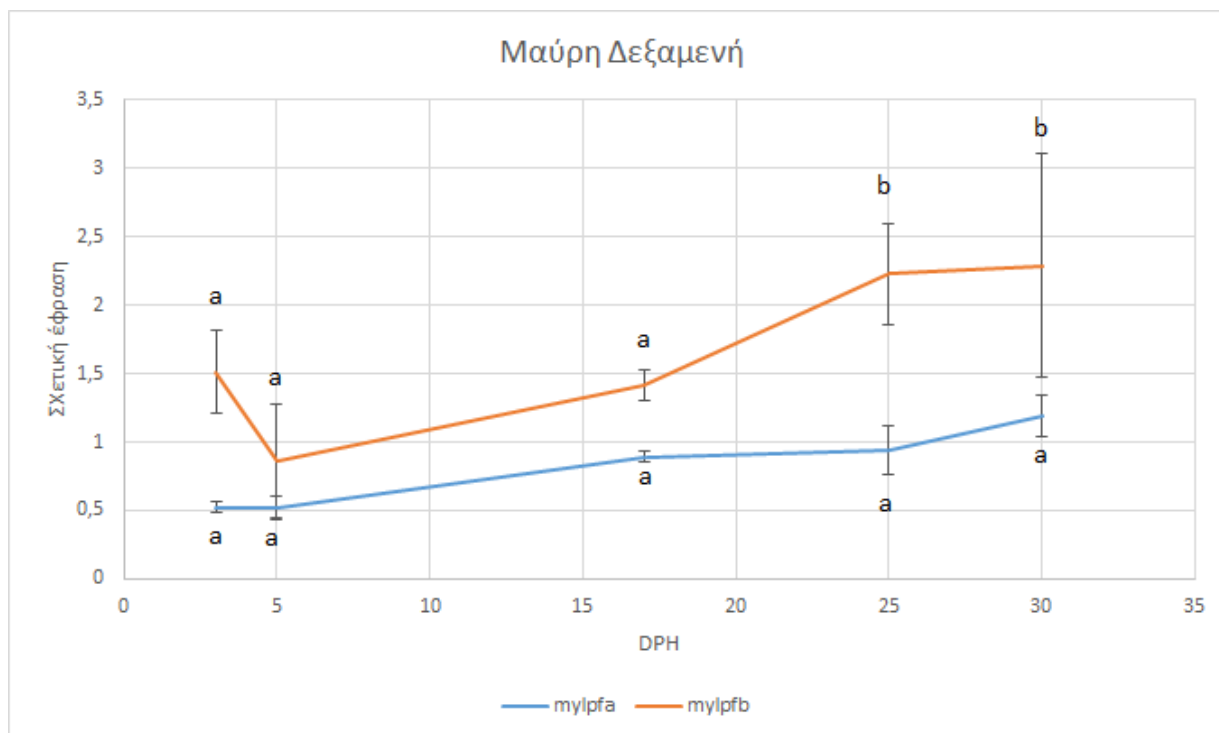
Όπως παρουσιάζεται στο διάγραμμα της Εικόνας 16 το γονίδιο MYLPF-a εμφανίζει μια σχετικά σταθερή πορεία αύξησης έκφρασης η οποία όμως συνεχίζει να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα. Η έκφραση του MYLPF-b μειώνεται από την 3^η ημέρα μετά την εκκόλαψη μέχρι την 5^η, ενώ μετά την 17^η ημέρα ακολουθεί ανοδική πορεία με τη μέγιστη έκφραση να παρατηρείται κατά την 30^η ημέρα.



Εικόνα 17 Η σχετική έκφραση των παραλόγων γονιδίων MYLPFa και MYLPFb του μαγιάτικου στα αναπτυξιακά στάδια 3DPH, 5DPH, 17DPH, 25DPH, 30DPH, κατά την ανάπτυξη των ατόμων σε δεξαμενή λευκού χρώματος. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές εκτιμήθηκαν μέσω t-test και το όριο τέθηκε για $P < 0.05$. Οι τιμές του γραφήματος παρουσιάζονται ως μέσοι όροι με \pm τυπικό σφάλμα. Τα σημεία που φέρουν τα ίδια γράμματα δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική μεταξύ τους διαφορά.

Στην Εικόνα 17 παρουσιάζεται η πορεία της έκφρασης των δύο παραλόγων γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b στα πρώιμα στάδια ανάπτυξης του μαγιάτικου κατά την ανάπτυξη σε δεξαμενή χρώματος λευκού χρώματος.

Κατά την ανάπτυξη των ατόμων στην λευκή δεξαμενή παρατηρείται ότι η έκφραση του γονιδίου MYLPF-a αυξάνεται με στατιστική σημαντικότητα από την 3^η στην 5^η ημέρα μετά την εκκόλαψη, όπως επίσης και από την 5^η μέχρι την 17^η ημέρα μετά την εκκόλαψη. Μετά την 17^η ημέρα αρχίζει να μειώνεται μέχρι και την 25^η ημέρα, όπου παρατηρείται και πάλι ανοδική πορεία στην έκφραση. Η έκφραση του γονιδίου MYLPF-b μειώνεται αισθητά μέχρι την 5^η ημέρα, ενώ συνεχίζει ανοδική πορεία μέχρι



Εικόνα 18 Η σχετική έκφραση των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b στα αναπτυξιακά στάδια 3DPH, 5DPH, 17DPH, 25DPH, 30DPH, κατά την ανάπτυξη των ατόμων του είδους *Seriola dumerili* σε δεξαμενή μαύρου χρώματος. Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές εκτιμήθηκαν μέσω t-test και το όριο τέθηκε για $P < 0.05$. Οι τιμές του γραφήματος παρουσιάζονται ως μέσοι όροι με \pm τυπικό σφάλμα. Τα σημεία που φέρουν τα ίδια γράμματα δεν εμφανίζουν στατιστικώς σημαντική μεταξύ τους διαφορά.

να φτάσει τη μέγιστη τιμή έκφρασης κατά την 25 ημέρα μετά την εκκόλαψη.

Τέλος, στην Εικόνα 18 απεικονίζεται η πορεία έκφρασης των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b σε άτομα που αναπτύχθηκαν στην μαύρη δεξαμενή. Η έκφραση του γονιδίου MYLPF-a ακολουθεί αυξητική πορεία, ενώ για την έκφραση του γονιδίου MYLPF-b παρατηρείται μια μεγάλη πτώση από την 3^η έως την 5^η ημέρα μετά την εκκόλαψη, ενώ μετά την 5^η ημέρα η έκφραση του αυξάνεται δραματικά έως την 25^η ημέρα μετά την εκκόλαψη, όπου και σταθεροποιείται.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν τρία βασικά θέματα. Το πρώτο ήταν η φυλογενετική εξακρίβωση της προέλευσης των δύο γονιδίων MYLRF-a και MYLRF-b τα οποία είναι παράλογα και προέρχονται από τον τρίτο γύρο διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος που πραγματοποιήθηκε στους τελεόστεους, στους οποίους ανήκει και το μαγιάτικο. Το δεύτερο θέμα περιλάμβανε την αναζήτηση, τον εντοπισμό και την επιλογή ιδιοστατικών γονιδίων με την μεγαλύτερη δυνατή σταθερότητα και τέλος, το τρίτο θέμα ήταν η περαιτέρω χρήση αυτών για την ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των δύο παραλόγων γονιδίων MYLRF-a και MYLRF-b σε άτομα του είδους τα οποία αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες εκτροφής.

Τα τέσσερα γονίδια τα οποία χαρακτηρίστηκαν ως ιδιοστατικά και χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία είναι τα γονίδια ELF1, FAU, RPL13 και RPS18. Όσον αφορά τη διαδικασία ταυτοποίησης ιδιοστατικών γονιδίων, λαμβάνοντας υπόψιν τις λειτουργίες των γονιδίων που μελετήθηκαν, μπορούμε και βιολογικά να επαληθεύσουμε την σταθερή τους έκφραση κατά την διάρκεια των αναπτυξιακών σταδίων που μελετήθηκαν. Και τα τέσσερα γονίδια σχετίζονται με την διαδικασία της πρωτεϊνοσύνθεσης, μια πολύ σημαντική και απαραίτητη διεργασία για την ανάπτυξη και την επιβίωση των ατόμων.

4.1 Η επίδραση του χρώματος της δεξαμενής

Η έκφραση των γονιδίων MYLRF-a και MYLRF-b παρουσιάζει μεγάλες διαφορές. Οι μεγάλες αυτές διαφορές πιθανότατα οφείλονται στην επίδραση των διαφόρων χρωμάτων τόσο στην συμπεριφορά και την απόκριση στο στρες, αλλά και στην πρόσληψη τροφής, στην ανάπτυξη και την επιβίωση των ατόμων.

Και στις τρεις διαφορετικές συνθήκες που αφορούν το χρώμα της δεξαμενής, κατά το χρονικό διάστημα από την 3^η ημέρα μετά την εκκόλαψη έως την 30^η, η σχετική έκφραση του γονιδίου MYLRF-b είναι μεγαλύτερη από αυτή του γονιδίου MYLRF-a. Τα αποτελέσματα αυτά συμβαδίζουν με τα αποτελέσματα μελετών που πραγματοποιήθηκαν στην τσιπούρα όπου τα ομόλογα γονίδια των MYLRF-b και MYLRF-a, MLC2A και MLC2B παρουσιάζουν παρόμοια έκφραση, με την MLC2A να κυριαρχεί στα πρώτα προνυμφικά στάδια και να σηματοδοτεί τον σχηματισμό νέων ινών, ενώ η έκφραση του MLC2B να αυξάνεται σταδιακά και ενώ παρουσιάζει πολύ μικρή έκφραση στα προνυμφικά στάδια, να εκφράζεται σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από την MLC2A κατά τη διάρκεια της υπετροφικής διεργασίας (Georgiou et al., 2014).

Οι δύο ισομορφές της ελαφριάς αλυσίδας της μυσίνης MLC2A και MLC2B αποτελούν δείκτες μυϊκής υπερπλασίας και υπερτροφίας στην τσιπούρα ενώ υπάρχει

και η υπόθεση ότι η πιο γρήγορη διαδοχή της υπερπλασίας από την υπερτροφία αποτελεί ένα δείκτη γρηγορότερης ανάπτυξης.

Κατά την ανάπτυξη στην δεξαμενή λευκού χρώματος, παρατηρείται η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου MYLPF-b μέχρι και την 25^η ημέρα μετά την εκκόλαψη, όπου και μεγιστοποιείται, και έπειτα μειώνεται. Παράλληλα, η έκφραση του γονιδίου MYLPF-a αυξάνεται με στατιστική σημαντικότητα. Η αντιστροφή αυτή στις πορείες έκφρασης των δύο παραλόγων γονιδίων, πιθανότατα παρουσιάζει την διαδοχή της υπερπλασίας από την υπερτροφία και άρα την γρηγορότερη ανάπτυξη των ατόμων στην λευκή δεξαμενή.

Σε μελέτη που έχει πραγματοποιηθεί στο μαγιάτικο παρουσιάζεται ότι το λευκό χρώμα της δεξαμενής αυξάνει τα ποσοστά επιβίωσης των ατόμων του είδους *Seriola dumerili* σε σχέση με τα άτομα που αναπτύχθηκαν σε δεξαμενές μαύρου και πράσινου χρώματος, ενώ επίσης έγινε γνωστό ότι στα ψάρια τα οποία αναπτύχθηκαν στο λευκό χρώμα εντοπίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στην έκφραση γονιδίων-συστατικών του μονοπατιού της αυξητικής ορμόνης (GH) και των παραγόντων αύξησης της ινσουλίνης (IGFI και IGFII), και επομένως γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στην ανάπτυξη των αξονικών συστημάτων (Tsalafouta et al., 2017).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης σε συνδυασμό με τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα προτείνουν ότι το λευκό χρώμα της δεξαμενής ενισχύει την ανάπτυξη του μαγιάτικου επισπεύδοντας την μετάβαση στην υπερτροφία, ενισχύοντας την σηματοδότηση της αυξητικής ορμόνης και ενώ επιτρέπει και την αυξημένη επιβίωση των ατόμων του είδους. Λαμβάνοντας υπόψιν τα οφέλη της ιχθυοκαλλιέργειας του μαγιάτικου, ενός ψαριού με εξαιρετικά χαρακτηριστικά, γίνεται αντιληπτή η μεγάλη σημασία των παραπάνω αποτελεσμάτων.

4.2 Διακύμανση των τιμών σχετικής έκφρασης των γονιδίων

Τέλος, αξίζει να σχολιαστεί, η μεγάλη διακύμανση στην σχετική έκφραση των γονιδίων MYLPF-a και MYLPF-b στα επιμέρους αναπτυξιακά στάδια και στις τρεις χρωματικές διαφοροποιήσεις των δεξαμενών. Η διακύμανση, θα μπορούσε αρχικά να είναι αποτέλεσμα, του όχι ιδιαίτερα διευρυμένου αριθμού δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη, ωστόσο πρέπει να αναφερθεί ότι μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί τόσο σε άτομα του είδους *Sparus aurata* αλλά και σε άλλα είδη όπως για παράδειγμα στον σολομό, έχουν διακρίνει μεγάλη διακύμανση στην ανάπτυξη των μυϊκών ινών σε άτομα των ίδιων πληθυσμών (Rowlerson et al. 1995).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Πράγματι, το χρώμα της δεξαμενής επηρέασε την ανάπτυξη του μαγιάτικου με το λευκό χρώμα να επισπεύδει την μυϊκή ανάπτυξη των ατόμων.

Τα δύο παράλογα γονίδια MYLRF-a και MYLRF-b, τα οποία προέκυψαν από τον τρίτο γύρο διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος των τελεόστεων (3R), παρουσιάζουν διαφορετική έκφραση κάτω από την επίδραση των τριών χρωμάτων που αποτέλεσαν το περιβάλλον κάθε δεξαμενής. Με την αξιοποίηση των ιδιοστατικών γονιδίων ELF1, FAU, RPL13 και RPS18 αναλύθηκε η έκφραση των γονιδίων MYLRF-a και MYLRF-b, με το MYLRF-b να αποτελεί δείκτη της μυϊκής υπερπλασίας και το MYLRF-a δείκτη της μυϊκής υπερτροφίας. Στην λευκή δεξαμενή παρατηρήθηκε η γρήγορη μετάβαση από την μυϊκή υπερπλασία στην μυϊκή υπερτροφία, και επομένως παρατηρήθηκε η ταχύτερη ανάπτυξη των ατόμων που αναπτύχθηκαν σε αυτή. Η επίσπευση της μυϊκής ανάπτυξης σε συνδυασμό με τα αυξημένα ποσοστά επιβίωσης που προσφέρει, καθιστούν το λευκό χρώμα ως το ιδανικό περιβάλλον για την πρόωμη ανάπτυξη του μαγιάτικου στην ιχθυοκαλλιέργεια.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amores, A., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R. K., Langeland, J., & Postlethwait, J. H. (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, 282(November), 1711–1714. <https://doi.org/10.1126/science.282.5394.1711>
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. H. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, Vol. 5, pp. 209–219. <https://doi.org/10.1586/14737159.5.2.209>
- Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., ... Corner, R. (2010). Aquaculture: Global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2897–2912. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0170>
- Craig, R., & Woodhead, J. L. (2006). Structure and function of myosin filaments. *Current Opinion in Structural Biology*, 16(2), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.03.006>
- Eslamloo, K., Akhavan, S. R., Eslamifar, A., & Henry, M. A. (2015). Effects of background colour on growth performance, skin pigmentation, physiological condition and innate immune responses of goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture Research*, 46(1), 202–215. <https://doi.org/10.1111/are.12177>
- Gentry, R. R., Froehlich, H. E., Grimm, D., Kareiva, P., Parke, M., Rust, M., ... Halpern, B. S. (2017). Mapping the global potential for marine aquaculture. *Nature Ecology and Evolution*, 1(9), 1317–1324. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0257-9>
- Georgiou, S., Makridis, P., Dimopoulos, D., Power, D. M., Mamuris, Z., & Moutou, K. A. (2014). Myosin light chain 2 isoforms in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Molecular growth markers at early stages. *Aquaculture*, 432, 434–442. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.030>
- Glasauer, S. M. K., & Neuhauss, S. C. F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics*, 289(6), 1045–1060. <https://doi.org/10.1007/s00438-014-0889-2>
- Hill, J. A., Kiessling, A., & Devlin, R. H. (2011). Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for a growth hormone gene construct exhibit increased rates of muscle hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(5), 939–950. <https://doi.org/10.1139/f00-015>
- Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993). Society of Systematic Biologists An Empirical Test of Bootstrapping as a Method for Assessing Confidence in Phylogenetic Analysis. *Society*, 42(2), 182–192. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp096>
- HOWELL, B. R. (1979). *EXPERIMENTS ON THE REARING OF LARVAL TURBOT*,

SCOPHTHAL- MUS MAXIMUS L. 18, 215–225.

- Hunt, S. E., McLaren, W., Gil, L., Thormann, A., Schuilenburg, H., Sheppard, D., ... Cunningham, F. (2018). Ensembl variation resources. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 2018(8), 1–12. <https://doi.org/10.1093/database/bay119>
- Johnston, I. A. (2006). Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, 209(12), 2249–2264. <https://doi.org/10.1242/jeb.02153>
- Johnston, I. A., Bower, N. I., & Macqueen, D. J. (2011). Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, 214(10), 1617–1628. <https://doi.org/10.1242/jeb.038620>
- Kasahara, M. (2007). The 2R hypothesis: an update. *Current Opinion in Immunology*, 19(5), 547–552. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2007.07.009>
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., & Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3059–3066. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12136088><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC135756>
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2017). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, (June), 1–7. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kendall, A. W., Ahlstrom, E. H., & Moser, H. G. (1984). Early Life History Stages of Fishes and Their Characters. *Ontogeny and Systematics of Fishes*, 11–22.
- Kesbiç, O. S., Yiğit, M., & Acar, Ü. (2016). Effects of Tank Color on Growth Performance and Nitrogen Excretion of European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) Juveniles. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 86(1), 205–210. <https://doi.org/10.1007/s40011-014-0441-5>
- Koonin, E. V. (2005). Orthologs, paralogs, and evolutionary genomics. *Annual Review of Genetics*, 39, 309–338. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.39.073003.114725>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). *MEGA X : Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms*. 35(June), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Louis, A., Nguyen, N. T. T., Muffato, M., & Crollius, H. R. (2015). Genomicus update 2015: KaryoView and MatrixView provide a genome-wide perspective to multispecies comparative genomics. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D682–D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1112>
- Meyer, A., & Schartl, M. (1999). Gene and genome duplications in vertebrates: The one-to-four (-to-eight in fish) rule and the evolution of novel gene functions. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(6), 699–704. <https://doi.org/10.1016/S0955->

0674(99)00039-3

- Moutou, K. A., Power, D. M., & Canario, A. V. M. (2003). Molecular cloning and sequence of *Sparus aurata* skeletal myosin light chains expressed in white muscle: developmental expression and thyroid regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *124*, S68. [https://doi.org/10.1016/s1095-6433\(99\)90269-6](https://doi.org/10.1016/s1095-6433(99)90269-6)
- Mugue, N. S., & Ozernyuk, N. D. (2006). Comparative structural analysis of myosin light chains and gene duplication in fish. *Biology Bulletin*, *33*(1), 30–34. <https://doi.org/10.1134/s1062359006010043>
- Papandroulakis, N., Mylonas, C. C., Maingot, E., & Divanach, P. (2005). First results of greater amberjack (*Seriola dumerili*) larval rearing in mesocosm. *Aquaculture*, *250*(1–2), 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.02.036>
- Papoutsoglou, S. E., Karakatsouli, N., & Chiras, G. (2005). Dietary L-tryptophan and tank colour effects on growth performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles reared in a recirculating water system. *Aquacultural Engineering*, *32*(2), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2004.04.004>
- Peitsch, M. C. (1997). *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer : An environment for comparative protein modeling*. 2714–2723.
- Pfaffl, M W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, *29*(9), e45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328886><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC55695>
- Pfaffl, Michael W. (2004). *Relative quantification*. 63–82.
- Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., ... Markham, A. F. (2003). *Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence : An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements , gene amplifications and micro gene deletions TCR-alpha*. *13*, 1–13.
- Rescan, P. Y. (2008). New insights into skeletal muscle development and growth in teleost fishes. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *310*(7), 541–548. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21230>
- Rowlerson, A., Mascarello, F., Radaelli, G., & Veggetti, A. (1995). Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L): II. Hyperplastic and hypertrophic growth of lateral muscle from hatching to adult. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *16*(3), 223–236. <https://doi.org/10.1007/BF00121131>
- Ryan, M. T., O'Halloran, A. M., Hamill, R. M., Davey, G. C., Gil, M., Southwood, O. I., & Sweeney, T. (2016). Polymorphisms in the regulatory region of the porcine MYLPF gene are related to meat quality traits in the Large White breed. *Meat Science*, *113*, 104–106. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.11.016>
- Sarropoulou, E., Sundaram, A. Y. M., Kaitetzidou, E., Kotoulas, G., Gilfillan, G. D., Papandroulakis, N., ... Magoulas, A. (2017). Full genome survey and dynamics of

- gene expression in the greater amberjack *Seriola dumerili*. *GigaScience*, 6(12), 1–13. <https://doi.org/10.1093/gigascience/gix108>
- Sato, Y., & Nishida, M. (2010). Teleost fish with specific genome duplication as unique models of vertebrate evolution. *Environmental Biology of Fishes*, 88(2), 169–188. <https://doi.org/10.1007/s10641-010-9628-7>
- Szczesna-Cordary, D. (2005). Regulatory Light Chains of Striated Muscle Myosin. Structure, Function and Malfunction. *Current Drug Target -Cardiovascular & Hematological Disorders*, 3(2), 187–197. <https://doi.org/10.2174/1568006033481474>
- Tamazouzt, L., Chatain, B., & Fontaine, P. (2000). Tank wall colour and light level affect growth and survival of Eurasian perch larvae (*Perca fluviatilis* L.). *Aquaculture*, 182(1–2), 85–90. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00244-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00244-6)
- Tsalafouta, A., Pavlidis, M., & Papandroulakis, N. (2017). EFFECT OF BACKGROUND COLOR AND EXPRESSION OF GENES RELATED TO THE GH/IGF GROWTH AXIS AT EARLY DEVELOPMENT OF GREATER AMBERJACK (*Seriola dumerili*). (October), 4–6.
- Uji, S., Kurokawa, T., Hashimoto, H., Suzuki, T., & Okuzawa, K. (2014). Visualization of musculature of the larval greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso) using whole-mount immunostaining with special reference to cranial muscles. *Aquaculture Research*, 45(6), 1096–1108. <https://doi.org/10.1111/are.12053>
- Valente, L. M. P., Moutou, K. A., Conceição, L. E. C., Engrola, S., Fernandes, J. M. O., & Johnston, I. A. (2013). What determines growth potential and juvenile quality of farmed fish species? *Reviews in Aquaculture*, 5(SUPPL.1). <https://doi.org/10.1111/raq.12020>
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7), RESEARCH0034. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC126239>
- Wang, Y., Szczesna-Cordary, D., Craig, R., Diaz-Perez, Z., Guzman, G., Miller, T., & Potter, J. D. (2007). Fast skeletal muscle regulatory light chain is required for fast and slow skeletal muscle development. *The FASEB Journal*, 21(9), 2205–2214. <https://doi.org/10.1096/fj.06-7538com>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., ... Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- Xu, H., Xu, G., Wang, D., Ma, J., & Wan, L. (2013). Molecular cloning, sequence identification and expression analysis of novel caprine MYLPF gene. *Molecular Biology Reports*, 40(3), 2565–2572. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2342-0>

