



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας**

**Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας**

**Μοριακοί δείκτες ανάπτυξης και αύξησης σε ιχθύδια  
τσιπούρας (*Sparus aurata*)**

**Molecular markers of development and growth in gilthead  
sea bream (*Sparus aurata*)**



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΚΟΥΦΑΧΕΙΛΗ ANNA**

**ΛΑΡΙΣΑ, 2019**

## **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΜΟΥΤΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ (ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ) Αναπληρώτρια Καθηγήτρια  
Βιολογίας Σπονδυλωτών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του  
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

**ΣΑΡΑΦΙΔΟΥ ΘΕΟΛΟΓΙΑ Επίκουρος καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής  
Ζωικών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του  
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας**

## Ευχαριστίες

**Η συγκεκριμένη πτυχιακή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη της Αναπληρώτριας Καθηγήτριας κ. Αικατερίνης Μούτου την οποία και θα ήθελα να ευχαριστήσω ολόψυχα για τη καθοδήγηση, τη συνεργασία, την ενθάρρυνση καθώς και τη πολύτιμη βοήθειά της με στόχο την διεκπεραίωση της πειραματικής διαδικασίας και τη συγγραφή της παρούσας πτυχιακής εργασίας.**

**Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον υποψήφιο διδάκτορα Ανδρέα Τσιπουρλιάνο καθώς επίσης και όλα τα υπόλοιπα μέλη που απαρτίζουν το εργαστήριο για τις συμβουλές τους και την καθοδήγηση, για το ευχάριστο κλίμα και την άψογη συνεργασία κατά τη διεκπεραίωση του πειράματος.**

**Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής την κ. Θεολογία Σαραφίδου και τον κ. Μαμούρη Ζήση.**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελεί έναν τελεόστεο ιχθύ που ανήκει στην οικογένεια Sparidae. Απαντάται ευρέως κυρίως στην Μεσόγειο και αποτελεί ένα εμβληματικό είδος για τη Μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια. Ο λευκός μυς της είναι το τελικό προϊόν της ιχθυοκαλλιέργειας και καθίσταται λοιπόν σημαντικό να αναπτυχθούν μέθοδοι με δυνατότητα να προβλέπουν το δυναμικό ανάπτυξης και αύξησης στην τσιπούρα. Τέτοιοι μηχανισμοί αφορούν γονίδια που χαρακτηρίζονται ως μοριακοί δείκτες και είναι ενδεικτικοί του μεγέθους ή του αναπτυξιακού σταδίου της τσιπούρας και μπορούν να επιφέρουν αλλαγές ως προς την υπερπλασία και την υπερτροφία του ψαριού.

Στόχος της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν η σύγκριση και η κατανομή μηκών στα ιχθύδια τσιπούρας που παρόλο το κοινό τους μέγεθος άνηκαν σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και σε διαφορετικές παρτίδες. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε ανάλυση της έκφρασης ορισμένων γονιδίων σε ιχθύδια τσιπούρας με στόχο της να αποτελεί η εύρεση διαφορών στην έκφραση τους με βάση τις παραπάνω παραμέτρους. Επιπλέον στόχος ήταν να ελεγχθεί εάν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων όπως είναι η ισομορφή A της μυοσίνης MLC2 (MLC2A), η ισομορφή B της μυοσίνης MLC2 (MLC2B), η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL-like) και η λεπτίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αύξησης ή ανάπτυξης.

Τα αποτελέσματα που αφορούσαν την κατανομή μηκών έδειξαν πως ιχθύδια τσιπούρας τα οποία άνηκαν στις ίδιες παρτίδες αλλά σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια εμφάνιζαν ομοιότητες στα μεγέθη τους. Επιπλέον όπως διαπιστώθηκε, τα επίπεδα έκφρασης της ισομορφής MLC2A ήταν αυξημένα συγκριτικά με τα επίπεδα της ισομορφής MLC2B τόσο στις διαφορετικές παρτίδες όσο και στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια κάτι το οποίο δικαιολογείται λόγω του ότι μελετήθηκε μόνο το κομμάτι της ουράς όπου εκεί υπάρχει άλλωστε και ο μυϊκός ιστός στον οποίον η έκφραση της MLC2A συναντάται. Αναφορικά με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων LPL, λεπτίνης και του λόγου των MLC2A/MLC2B ήταν σταθερά μεταξύ των δύο διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων.

## **ABSTRACT**

The gilthead seabream (*Sparus aurata*) is a teleost fish belonging to the Sparidae family. It is widely found mainly in the Mediterranean and is one of the most common fish in aquaculture as well as one of the most frequently reared species in the Mediterranean. Its white muscle is the final product of aquaculture and it is therefore important to develop methods with predictive capacity of the developmental and growth potential in gilthead seabream. Such mechanisms relate to genes that are characterized as molecular markers and are indicative of the size or the developmental stage of seabream and may cause changes in the hyperplasia and hypertrophy of the fish.

The purpose of this thesis was the comparison and distribution of lengths in gilthead seabream that, despite their common size, belonged to different developmental stages and to different lots. In addition, expression of some genes in seabream has been analyzed in order to find out differences in their expression based on the above parameters. An additional aim was to test whether gene expression levels such as MLC2 myosin A isoform (MLC2A), MLC2 myosin B isoform (MLC2B), lipoprotein lipase (LPL-like) and leptin can be used as markers of growth and development.

Overlapping lengths were observed in gilthead seabream that derived from the same batch but were through different developmental stages. In addition, it was found that MLC2A expression levels were higher than MLC2B levels in both different lots and different developmental stages, which can be justified by the fact that only the tail portion where the muscle is present was studied, in which MLC2A expression is found. Regarding the expression levels of the LPL, leptin and MLC2A / MLC2B genes were constant between the two different developmental stages.

## Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1 Εισαγωγικά για την τσιπούρα ( <i>Sparus aurata</i> ) .....	1
1.2 Συνώνυμες ονομασίες .....	2
1.3 Κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά της τσιπούρας .....	2
1.4 Διατροφικές συνήθειες .....	3
1.5 Αναπαραγωγή .....	3
1.6 Αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας .....	4
1.7 Ιχθυογεννητικοί σταθμοί .....	6
1.8 Κύριες Χώρες Παραγωγής τσιπούρας .....	7
1.9 Ποιότητα γόνου .....	8
1.10 Ο σκελετικός μυς .....	9
1.11 Οι μυϊκές πρωτεΐνες .....	10
1.12 Μυοσίνη .....	11
1.13 Ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης .....	12
1.14 Έκφραση αλυσίδων μυοσίνης .....	13
1.15. Λεπτίνη .....	14
1.16 Λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) .....	15
1.17 Γονίδιο LPL-like στην τσιπούρα .....	15
2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....	16
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....	17
3.1 Προέλευση ιχθυδίων .....	17
3.2 Καταγραφή ολικού μήκους .....	17
3.3 Απομόνωση ολικού RNA .....	17
3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης .....	19
3.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης RNA .....	20
3.6 Σύνθεση cDNA .....	20
3.7 Έλεγχος ποιότητας σύνθεσης του cDNA .....	21
3.8 Ανάπτυξη μεθόδου Real-Time PCR .....	22
3.9 Στατιστική ανάλυση .....	25

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	26
4.1 Καταγραφή μηκών .....	26
4.2 Κατανομή ολικού μήκους ιχθυδίων .....	27
4.3 Σύγκριση των μηκών μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων .....	29
4.4 Αποδόσεις (E) των αντιδράσεων Real-Time που πραγματοποιήθηκαν .....	31
4.5 Γονίδια αναφοράς .....	31
4.6 Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων MLC2A και MLC2B.....	32
4.7 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL-like) .....	34
4.8 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης .....	36
4.9 Επίπεδα έκφρασης του λόγου των γονιδίων MLC2A/MLC2B.....	37
4.10 Στατιστική ανάλυση των επίπεδων έκφρασης.....	39
4.11 Συσχετισμός της έκφρασης γονιδίων με το μήκος.....	39
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	40
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	43

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Εισαγωγικά για την τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Η τσιπούρα αποτελεί έναν τελεόστεο ιχθύ που ανήκει στην οικογένεια Sparidae (UNESCO, 1986) (Πίνακας 1). Άλλοι γνωστοί αντιπρόσωποι της οικογένειας Sparidae είναι η γόπα (*Boops boops*), η συναγρίδα (*Dentex dentex*) και η μουρμούρα (*Lithognathus mormyrus*). Απαντάται ευρέως κυρίως στην Μεσόγειο και στις ακτές του βορειοανατολικού Ατλαντικού, από το Ηνωμένο Βασίλειο έως το Πράσινο Ακρωτήριο και τα Κανάρια νησιά (Christophilogiannis, 1993). Σπανίως όμως εμφανίζεται στην νοτιοανατολική Μεσόγειο και ιδιαίτερα εξασθενημένη είναι η εμφάνιση της στη Μαύρη Θάλασσα. Στην Ελλάδα συναντάται κυρίως στο Αιγαίο, από το Πόρτο Λάγος έως τα Δωδεκάνησα, καθώς και σε κόλπους όπως ο Θερμαϊκός, ο Σαρωνικός, ο Κορινθιακός, ο Πατραϊκός και τη λιμνοθάλασσα του Μεσολογγίου (UNESCO 1986, Kladoudatos & Conides, 1996) (Εικόνα 1). Εκτός από τη θάλασσα η τσιπούρα συναντάται επίσης και στα υφάλμυρα νερά των εκβολών των ποταμών (Cerasi, 2009). Αποτελεί ένα από τα πιο συνηθισμένα ψάρια στην ιχθυοκαλλιέργεια καθώς επίσης συγκαταλέγεται στα είδη που εκτρέφονται με μεγαλύτερη συχνότητα στη Μεσόγειο (Shields, 2001). Η τσιπούρα σχηματίζει συνήθως κοπάδια, ενώ υπάρχουν και περιπτώσεις όπου θηλυκές τσιπούρες μπορούν να δρουν ατομικά σε περιόδους κυνηγιού. Σχετικά με την επιστημονική ονομασία της, το “*Sparus*” έχει προκύψει από το ραχιαίο πτερύγιο με τα αγκάθια που έχουν την μορφή αγκαθωτών δοράτων (Bauchot & Hureau, 1990). Το δεύτερο σκέλος της ονομασίας του είδους, το “*aurata*” οφείλεται στην παρουσία μιας χρυσής γραμμής που ενώνει τα μάτια του ψαριού.

Πίνακας 1: Συστηματική ταξινόμηση του είδους *Sparus aurata*

Βασίλειο	Ζώα
Φύλο	Χορδωτά
Ομάδα	Κρανιωτά
Υπόφυλο	Σπονδυλωτά
Κλάση	Οστεϊχθύες
Υφομοταξία	Ακτινοπτερύγιοι
Υπέρταξη	Τελεόστεοι
Τάξη	Περκοειδείς
Οικογένεια	Sparidae
Γένος	Sparus
Είδος	Sparus aurata





Εικόνα 1: Γεωγραφική κατανομή της τσιπούρας.

### 1.2 Συνώνυμες ονομασίες

- *Chrysophrus aurata* Valenciennes, 1830
- *Pagrus (Chrysophrus) auratus* Steindachner, 1867
- *Pagrus auratus* Day, 1880
- *Chrysophrus aurata* Murray and Hort, 1912
- *Aurata aurata* de Buen, 1935
- *Sparus aurata* Fowler, 1936

### 1.3 Κύρια μορφολογικά χαρακτηριστικά της τσιπούρας

Η τσιπούρα έχει σύνηθες μήκος 35 εκατοστά, αν και υπάρχουν ψάρια με μήκος 70 εκατοστών. Η τσιπούρα με το μέγιστο βάρος που έχει αλιευθεί έως τώρα είχε βάρος 17,2 κιλά (FAO, 1973; UNESCO, 1986). Η μέγιστη ηλικία που έχει καταγραφεί σε τσιπούρα σε συνθήκες αιχμαλωσίας είναι 11 έτη. Όσον αφορά τα εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά της, η τσιπούρα χαρακτηρίζεται από ένα σώμα πεπλατυσμένο και ωοειδές με καμπυλωτό-κυρτό κεφάλι και μικρούς οφθαλμούς (Εικόνα 2). Αξιοσημείωτο είναι το ασημένιο χρώμα που έχει το σώμα της με μια χαρακτηριστική μαύρη κηλίδα στο τέλος του βραγχιακού επικαλύμματος και με μια κόκκινη γραμμή στο όριο του κάτω μισού του βραγχιακού καλύμματος. Χαρακτηριστική είναι επίσης και η χρυσή γραμμή που ενώνει τα μάτια, η οποία μάλιστα ευθύνεται για τη λατινική ονομασία της τσιπούρας «χρυσόχρους». Η εντομή που υπάρχει καθώς και τα άκρα του πτερυγίου έχουν μαύρο χρώμα (Mylonas & Zohar, 2011).



Εικόνα 2: Μορφολογικά χαρακτηριστικά τσιπούρας.

#### 1.4 Διατροφικές συνήθειες

Η τσιπούρα είναι σαρκοφάγο είδος ιχθύος ως επί το πλείστον, όμως οι διατροφικές της συνήθειες εξαρτώνται κυρίως από το μέγεθος της (κατ'επέκταση από την ηλικία της) και από την διαθεσιμότητα της τροφής τους (Christophilogiannis, 1993). Τα νεαρά άτομα (ιχθύδια) τρέφονται κατά βάση με αμφίποδα, ζωοπλαγκτόν, μικρού μεγέθους καρκινοειδή, κωπήποδα και πολύχαιτους, ενώ οι μεγαλύτερες τσιπούρες προτιμούν τα μαλάκια (κυρίως δίθυρα), μύδια, στρείδια, γαστερόποδα, καρκινοειδή και μικρού μεγέθους ιχθύες. (Κλαουδάτος, 2012, UNESCO 1986, Χώτος και Ρογδάκης, 1992). Το σύνολο των μορφολογικών και ανατομικών χαρακτηριστικών της τσιπούρας, ο τύπος της οδοντοστοιχίας και η δομή του πεπτικού σωλήνα αποτελούν χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην προσαρμοστικότητα του είδους στις διάφορες διατροφικές συνήθειες.

#### 1.5 Αναπαραγωγή

Οι τσιπούρες χαρακτηρίζονται ως ερμαφρόδιτα ψάρια (εμφανίζουν πρωτανδρικό ερμαφροδιτισμό) εφόσον γεννιούνται αρχικά ως αρσενικά και έπειτα από διάστημα περίπου 3 χρόνων μετεξελίσσονται σε θηλυκά (αναστροφή φύλου) (Mascarello et al., 1995). Πιο συγκεκριμένα ενηλικιώνονται σεξουαλικά ως αρσενικά κατά τη διάρκεια του πρώτου ή του δεύτερου έτους της ζωής του (μήκος 20 - 30 εκατοστά), ενώ σε ηλικία 3 χρόνων (μήκος 30 - 40 εκατοστά) γίνονται θηλυκά. Όσον αφορά την περίοδο αναπαραγωγής τους είναι μεταξύ του διαστήματος Οκτώβριο - Δεκέμβριο σε λιμνοθάλασσες και σε δεξαμενές αλμυρού νερού (Pillay 1990, Κλαουδάτος και Αποστολόπουλος, 1984, UNESCO 1986). Ένα θηλυκό γεννά κατά μέσο όρο 20.000 - 80.000 αυγά ημερησίως. Τα ιχθύδια που προκύπτουν κολυμπούν μέχρι τα ρηχά νερά, όπου υπάρχει μεγαλύτερη ασφάλεια και πληθώρα τροφής και εγκαθίστανται εκεί από

την άνοιξη μέχρι τον Οκτώβριο όπου τότε ενσωματώνονται στο αρχικό κοπάδι και συμμετέχουν στην αναπαραγωγή (Κλαουδάτος και Αποστολόπουλος, 1984).

### 1.6 Αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας

Σχετικά με τα αναπτυξιακά στάδια της τσιπούρας διακρίνονται σε τρία. Αρχικά υπάρχει το στάδιο του αυγού το οποίο περιλαμβάνει την γονιμοποίηση έως και την εκκόλαψη, ακολουθεί το στάδιο της προνύμφης που ξεκινά αμέσως μετά την περίοδο της εκκόλαψης μέχρι και την μεταμόρφωση, και τελευταίο στάδιο είναι το στάδιο της ενηλικίωσης (νυμφικό στάδιο), δηλαδή η απαρχή της μεταμόρφωσης και το εφηβικό στάδιο του ιχθυδίου μέχρι να επέλθει το άτομο σε αναπαραγωγική ηλικία (Pavlidis et al., 2006).

Τα αυγά μετατρέπονται σε υποανάπτυκτες προνύμφες λεκιθικού σάκου που δεν κολυμπούν αρκετά και βασίζονται στην λέκιθό τους για κάλυψη των διατροφικών τους αναγκών. Αρκετά από τα συστήματα τους (αισθητήρια, κυκλοφορικά, μυϊκά και πεπτικά) εξελίσσονται μέχρι να αποκτήσουν την ευχέρεια να τρέφονται με πλαγκτόν. Όταν πλέον εκλείψει το λεκιθικό περιεχόμενο του σάκου, οι προνύμφες αναπτύσσουν κάποια χαρακτηριστικά παροδικά όπως διάφορα πρότυπα χρωματισμού, ορισμένες μορφές σπονδυλικής στήλης και διαμορφώσεις των δομών των πτερυγίων που προσδίδουν προφανώς προσαρμοστική ικανότητα για αυτό το αναπτυξιακό στάδιο (Kimmel et al., 1995). Κατά τη διάρκεια αυτού του διαστήματος το άτομο ολοένα και διαμορφώνει χαρακτηριστικά της ενήλικης ζωής του (Scholz et al., 2008). Στο τέλος του σταδίου ανάπτυξης των προνυμφών υπάρχει η δυνατότητα να μεταβούν στο στάδιο της νεανικής ηλικίας μέσω μιας ξαφνικής μεταμόρφωσης που υφίστανται (Kanne & Kimmel, 1993), κάτι το οποίο συμβαίνει κυρίως λόγω ύπαρξης μετακίνησης από ένα πελαγικό σε ένα βενθικό βιότοπο, ενώ αντίθετα αν δεν υπάρξει ο μετασχηματισμός γίνεται σταδιακά.

Το δεύτερο αναπτυξιακό στάδιο (προνυμφικό) αποκαλείται ως αυτότροφο και εμφανίζει διακριτές υποκατηγορίες (Matsuoka, 1984):

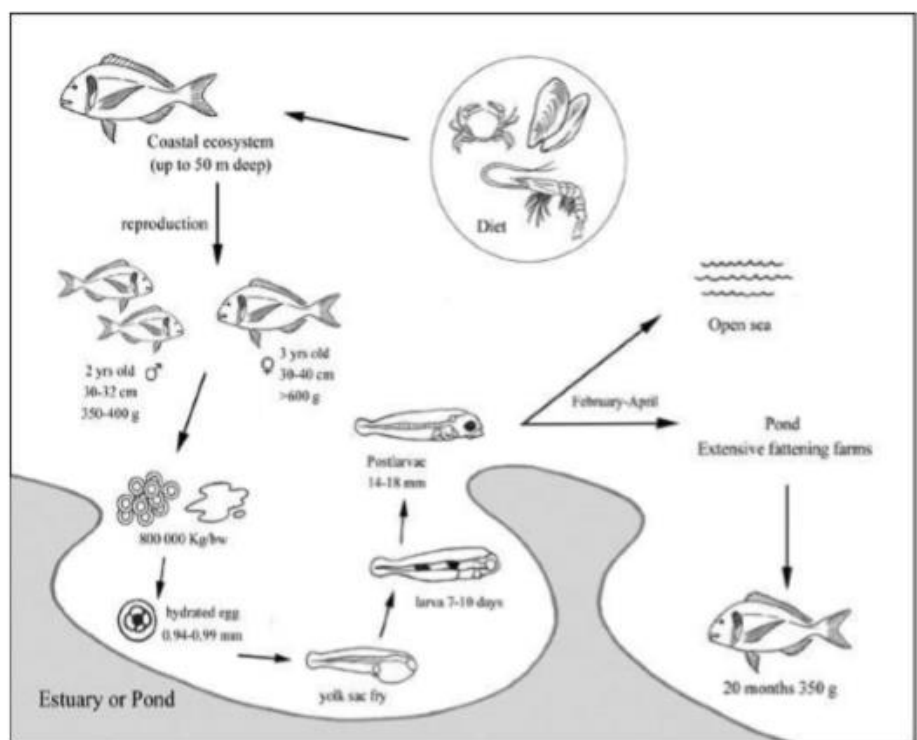
1. Προνύμφη λεκιθικού σάκου: περίοδος από την εκκόλαψη μέχρι εξάντληση του λεκιθικού σάκου.

2. Προνύμφη προ-κάμψης: διάστημα από την εξάντληση του λεκιθικού σάκου μέχρι την ανοδική κάμψη της νωτοχορδής.
3. Προνύμφη κάμψης: από την ολοκλήρωση της ανοδικής κάμψης της νωτοχορδής μέχρι την κατακόρυφη θέση που θα πάρουν τα πλευρικά οστά.
4. Προνύμφη μετά-κάμψης: δημιουργία του ουραίου περυγίου και εξωτερικών μεριστικών χαρακτηριστικών (ακτινωτό περύγιο).

Στο στάδιο της προνύμφης λεκιθικού σάκου, η τροφή προέρχεται αποκλειστικά από την λέκιθο και σε ελάχιστο βαθμό από τη λιπιδιακή σταγόνα (Κουμουνδούρος, 1993). Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου απουσιάζει η λειτουργικότητα του στόματος καθώς αυτό παραμένει κλειστό, υπάρχει έλλειψη χρωματισμού του οφθαλμού καθώς και απουσία διαφοροποιημένων περυγίων. Η καρδιά έχει πάρει την τελική διαμόρφωση της, είναι επομένως λειτουργική και τοποθετείται στο πρόσθιο άκρο του λεκιθικού σάκου. Καθώς αναπτύσσεται η προνύμφη η έδρα αποσπάται από το λεκιθικό σάκο, τα θωρακικά περύγια σχηματίζονται πλήρως, το ίδιο το ήπαρ και το στομάχι ενώ σταδιακά ανοίγουν το στόμα και η έδρα (Patruno et al., 1998). Όσον αφορά το τέλος του σταδίου αυτού εμφανίζεται ο μαύρος χρωματισμός των ματιών με συνέπεια να λήγει το αυτότροφο αυτό στάδιο και να υπάρχει πλέον η μετάβαση στο ετερότροφο στάδιο όπου οι προνύμφες εφοδιάζονται με εξωγενείς τροφές.

Ακολούθως το τρίτο στάδιο ανάπτυξης της τσιπούρας, το νυμφικό, αφορά στην μεταμόρφωση της τσιπούρας από νύμφες σε ιχθύδια όπου εμφανίζονται αρκετές αλλαγές ως προς την μορφολογία και την φυσιολογία της τσιπούρας, γίνεται προοδευτικά και καθορίζεται από μια μεγέθυνση του ολικού μήκους τους σώματος τους (NRC, 1993). Πιο χαρακτηριστικά, επέρχεται πλήρης ανάπτυξη των ιχθυδίων καθώς πλέον περύγια, λέπια και εσωτερικά όργανα παίρνουν την τελική τους διαμόρφωση (Faustino & Power, 1999). Πολλές φορές το νυμφικό στάδιο ανάπτυξης συγχέεται με το ετερότροφο στάδιο μιας και οι νύμφες διατρέφονται από εξωτερικές πηγές. Η μορφολογία των νυμφών στις αρχές του νυμφικού σταδίου συμπίπτει με τα χαρακτηριστικά των προνυμφών (Patruno et al., 1998). Η λιπιδιακή σταγόνα προοδευτικά μειώνεται έως ότου να εξαλειφθεί εντελώς και πλέον διακρίνεται μια κάμψη προς τα πάνω της νωτοχορδής (Faustino & Power, 1998). Τα λέπια σχηματίζονται στα τέλη του σταδίου ενηλικίωσης με συνέπεια έπειτα η τσιπούρα να αυξάνεται μόνο σε μέγεθος και βάρος αφού όλα τα λειτουργικά συστήματα έχουν ήδη

διαμορφωθεί (Patruno et al., 1998). Εξαίρεση αποτελεί η γονάδα η οποία μένει αδιαφοροποίητη μέχρι και τα τέλη του πρώτου έτους, ο ιστός της διέρχεται από μια ξεχωριστή οντογένεση και στην οποία οι διαδικασίες της σπερματογένεσης και της σπερμίας γίνονται όταν το άτομο ενηλικιωθεί.



Εικόνα 3: Κύκλος ζωής του είδους *Sparus aurata* (Sim et al., 2005).

### 1.7 Ιχθυογεννητικοί σταθμοί

Σύμφωνα με το Σύνδεσμο Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργιών (Σ.Ε.Θ.), ο ιχθυογεννητικός σταθμός αποτελεί ένα κτίριο, είναι ουσιαστικά μια στεγασμένη, μονώροφη, ελαφρά κατασκευής χερσαία εγκατάσταση της τάξης των 1-2 στρεμμάτων δίπλα στη θάλασσα για άντληση θαλασσινού νερού είτε απευθείας από την θάλασσα είτε από γεώτρηση. Στον χώρο αυτό ενσωματώνονται δεκάδες δεξαμενές, υπεύθυνες για την παραγωγή, εκτροφή και γονιμοποίηση των αυγών των ψαριών της τσιπούρας.

Στόχος των ιχθυογεννητικών σταθμών είναι μέσα από διάφορες διεργασίες να παράγουν και να διασφαλίσουν τις απαιτούμενες για τις μονάδες πάχυνσης ποσότητες

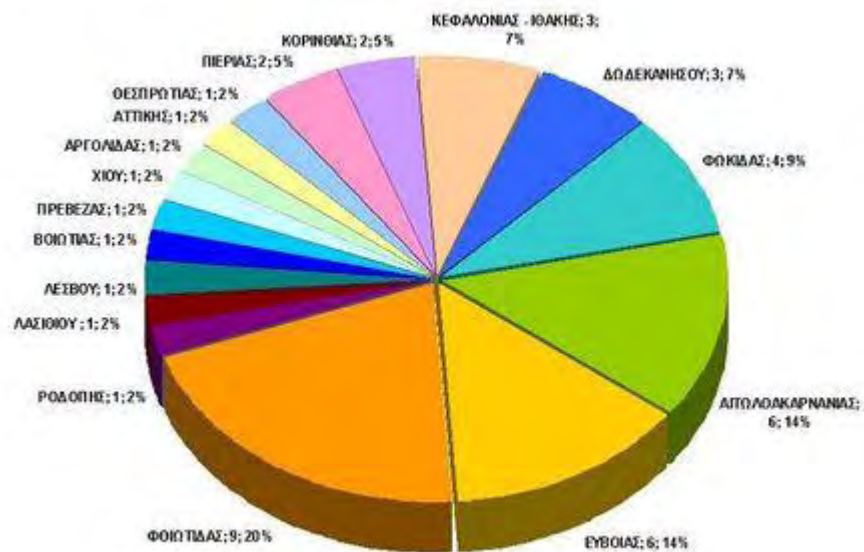
ιχθυδίων. Πιο αναλυτικά, σε αυτούς εκτρέφονται οι γεννήτορες από τους οποίους προκύπτουν τα αυγά που θα αναπτυχθούν σε τελικά ιχθύδια (1,5 έως 2 γραμμαρίων) που θεωρούνται έτοιμα να εισαχθούν στην διαδικασία της πάχυνσης. Εκεί τα ιχθύδια τοποθετούνται σε ειδικά διαμορφωμένους ιχθυοκλωβούς και ξεκινά η συστηματική εκτροφή τους (Κλαουδάτο, 2006). Κατόπιν, τα ψάρια λαμβάνουν σε καθημερινή βάση τροφή με σκοπό να προσεγγίσουν αλλά και να υπερβούν εν τέλει σε βάρος τα 300 γραμμάρια (εμπορεύσιμο), μια διεργασία που διαρκεί περίπου 12-14 μήνες (Sim et al., 2005).

Για να χαρακτηριστεί ένας τέτοιος σταθμός πλήρως λειτουργικός και αποδοτικός οφείλει να έχει τα εξής γνωρίσματα: (Κλαουδάτο, 2006)

- Τους χώρους παραμονής των γεννητόρων (δεξαμενές γεννητόρων)
- Τις δεξαμενές γονιμοποίησης
- Το εκκολαπτήριο
- Τις εγκαταστάσεις καλλιέργειας του φυτοπλαγκτού
- Τις εγκαταστάσεις εκτροφής ζωοπλαγκτού
- Τους χώρους εκτροφής των προνυμφικών και νυμφικών σταδίων των ιχθύων
- Τους χώρους εκτροφής και συντήρησης των μεταμορφωμένων ιχθυδίων και τις εγκαταστάσεις προπάχυνσης
- Προαπαιτούμενοι χαρακτηρίζονται και ορισμένοι απαραίτητοι βοηθητικοί χώροι, όπως αποθήκες, εργαστήρια αναλύσεων, μηχανοστάσιο, αντλιοστάσιο νερού, ψυκτικοί θάλαμοι, χώροι μηχανολογικού εξοπλισμού και γραφεία.

### **1.8 Κύριες Χώρες Παραγωγής τσιπούρας**

Η Ελλάδα καταλαμβάνει την πρώτη χώρα σε ποσοστά παραγωγής της τσιπούρας (49%) με την Τουρκία και την Ισπανία να ακολουθούν με ποσοστά 32% και 14% αντίστοιχα. Άλλες εξίσου σημαντικές χώρες με ευρεία παραγωγή τσιπούρας είναι η Κροατία, η Κύπρος, η Αίγυπτος, η Γαλλία, το Μαρόκο, η Τυνησία, η Πορτογαλία, η Ερυθρά θάλασσα και ο Περσικός κόλπος (Moretti, 2005). Στην Ελλάδα, η εκτροφή τσιπούρας εξαπλώνεται σε όλη την επικράτεια της (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Κατανομή μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας στην Ελλάδα.

### 1.9 Ποιότητα γόνου

Ο γόνος, ο οποίος χρησιμοποιείται για την παραγωγή του τελικού προϊόντος, αποτελεί την πιο σημαντική παράμετρο της διαδικασίας εκτροφής. Η ποιότητά του συμβάλλει στο τελικό κόστος και εξαρτάται από τις συνθήκες καλλιέργειας στις οποίες αυτοί μεγαλώνουν. Επηρεάζονται από την αλατότητα, το pH, τη θερμοκρασία, την επιλογή των γεννητόρων, τον αερισμό και την καθαρότητα του νερού καθώς και από το είδος της τροφής που τους χορηγείται και την πιθανή εμφάνιση σκελετικών δυσμορφιών. Επιπλέον, σημαντική επίδραση έχουν ο εμβολιασμός ή όχι του γόνου, όπου συνήθως οι γόνοι εμβολιάζονται πριν γίνει η παραλαβή τους. Ιδιαίτερα σημαντικό είναι η ποιότητα του γόνου να είναι εξαιρετική και να κυμαίνεται σε σταθερά επίπεδα καθ'όλη την παραγωγική διαδικασία (Mylonas & Zohar, 2011). Η ποιότητα του γόνου στην Ελλάδα χαρακτηρίζεται ως μια από τις καλύτερες στην Ευρώπη λόγω της εξειδίκευσης και της τεχνογνωσίας που διαθέτουν οι Έλληνες ιχθυοκαλλιεργητές (Moretti, 2005). Άλλωστε, οι περισσότερες επιχειρήσεις μεγάλου βεληνεκούς, σχετικές με τον τομέα αυτό, πιστοποιούν με τα κατάλληλα πιστοποιητικά ποιότητας και ελέγχου (ISO, HACCP, AGRO). Επιπρόσθετα, διασφαλίζουν την εφαρμογή τεχνικών αναπαραγωγής και ανάπτυξης γόνου οι οποίες εγγυώνται για όσο το δυνατόν καλύτερη ποιότητα και βιωσιμότητα τους κατά τη διάρκεια της πάχυνσης τους στο εσωτερικό των δεξαμενών. Τέλος, η ποιότητα του



γόνου, εκφράζεται συνήθως ως το ποσοστό των ατόμων χωρίς σκελετικές δυσμορφίες και των ατόμων με λειτουργική νηκτική κύστη. Στο στάδιο της προπάχυνσης, τα ψάρια χωρίς νηκτική κύστη απομακρύνονται (Κεντούρη, 2010).

Προκειμένου τα ιχθύδια να πληρούν όλες τις προδιαγραφές για να κριθούν έτοιμα για πώληση, εφαρμόζονται κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας οι ακόλουθοι έλεγχοι:

- Έλεγχος % εκκόλαψης των αυγών, σχήματος λεκιθοφόρων νυμφών
- Έλεγχος % νυμφών με έλλειψη νηκτικής κύστης, (οργάνου απαραίτητου για την κίνηση του ψαριού σε διαφορετικά βάθη)
- Έλεγχος % νυμφών με δυσμορφία γνάθων, σκελετικές δυσμορφίες, καθώς και έλλειψη βραγχιακού επικαλύμματος, (παράγοντες που απομειώνουν την αξία του τελικού προϊόντος)
- Έλεγχος % ιχθυδίων με δυσμορφία στη σπονδυλική στήλη
- Αποκλεισμός των ιχθυδίων στα οποία εκλείπει η νηκτική κύστη και το βραγχιακό επικάλυμμα
- Πραγματοποίηση διαλογών σε διάφορα μεγέθη και απομάκρυνση των ιχθυδίων που παρουσιάζουν υπολειπόμενη ανάπτυξη, (περίπου το 10% του αρχικού πληθυσμού), με σκοπό την ποιοτική αναβάθμιση του προς πώληση γόνου
- Πραγματοποίηση εργαστηριακών (χημικών και μικροβιολογικών) ελέγχων του νερού και των τροφών που χρησιμοποιούνται στις δεξαμενές ανάπτυξης

Εφόσον τα ελεγχόμενα ιχθύδια καλύπτουν τις συγκεκριμένες προδιαγραφές, διατίθενται σε παραγωγικές μονάδες πάχυνσης.

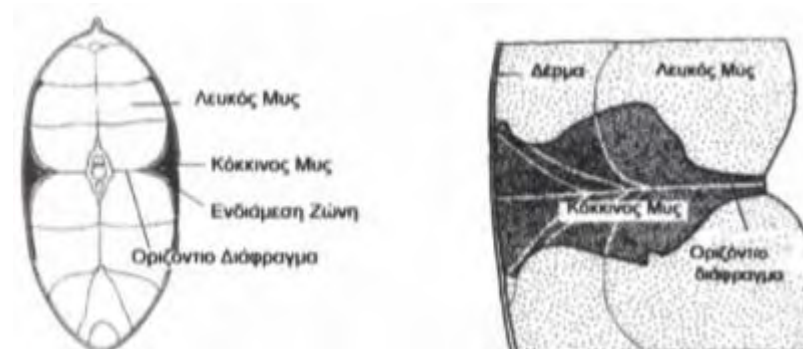
### **1.10 Ο σκελετικός μυς**

Ο μυς είναι η ανατομική δομή που παράγει κίνηση και ευθύνεται για την γέννηση και την μετάδοση ενέργειας. Η διάκριση των μυών γίνεται σε επιμέρους 3 κατηγορίες: τους σκελετικούς, τους καρδιακούς και τους λείους μύες. Οι σκελετικοί μύες εκτελούν εκούσια κίνηση (σκελετικοί μύες) ενώ οι λείοι μύες διαδραματίζουν ακούσια κίνηση και βρίσκονται στο τοίχωμα των σπλάχνων (για αυτό λέγονται και *σπλαχνικοί*) και των αγγείων, στη βάση των τριχών στο δέρμα και στο εσωτερικό του ματιού. Ο καρδιακός μυς μοιάζει ως προς την μορφή με τους γραμμωτούς μύες (



λόγω ύπαρξης εγκάρσιων γραμμώσεων), όμως η λειτουργία του προσομοιάζεται με αυτή των λείων μυών γιατί δρα αυτόνομα και ανεξάρτητα από την θέληση μας.

Οι σκελετικοί μύες διαχωρίζονται στον κόκκινο και στον λευκό μυ και αποτελούν το 40% της μάζας του σώματος, χαρακτηρίζονται ως αυτοτελή όργανα που κατευθύνουν τα οστά και ευθύνονται για την κίνηση και την στάση του σώματος. Όσον αφορά τους σκελετικούς μύες των τελεόστεων ιχθύων περιέχουν μεγάλο ποσοστό λευκών μυών στο κύριο σώμα και στην ουρά. Στο κύριο σώμα μια σειρά μυϊκών τμημάτων (μυομερή) απαρτίζουν τους μύες. Τα μυομερή τα διαχωρίζουν λεπτά στρώματα συνδετικού ιστού που αποτελούν τα μυϊκά διαφράγματα. Ακολουθεί διαχωρισμός σε αριστερό και δεξί ημισφαίριο μέσω ενός κάθετου άξονα ενώ μέσω ενός οριζόντιου διαφράγματος διαχωρίζονται οι μύες σε επαξόνιους και υπαξόνιους. Στρώμα από επιφανειακές πλευρικές ίνες (κόκκινος μυς) επεκτείνεται κάτω από το δέρμα με συνέπεια αυτό να λαμβάνει χαρακτηριστικό σκούρο χρώμα (Bone et al., 1995; Εικόνα 5).



Εικόνα 5: Εγκάρσια τομή σε τελεόστεο ιχθύ. Απεικόνιση οργάνωσης λευκού και του κόκκινου μύος (αριστερά). Ενδιάμεση ζώνη σε μεγέθυνση (δεξιά) (Stroiber et al., 1999).

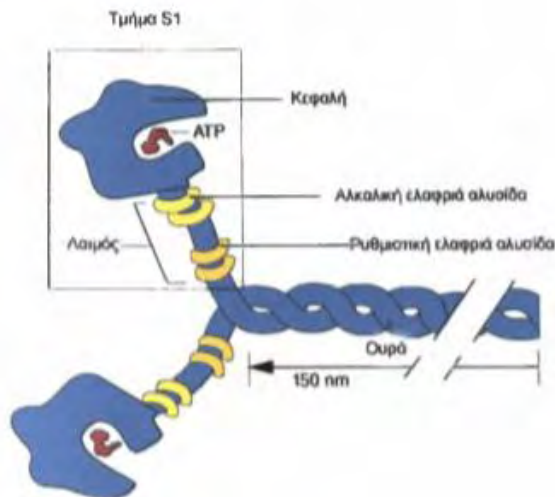
### 1.11 Οι μυϊκές πρωτεΐνες

Οι κύριες πρωτεΐνες που απαρτίζουν το μυ είναι η μυοσίνη, η ακτίνη, η τροπομυοσίνη και η τροπονίνη. Τα παχιά μυϊκά ινίδια αποτελούνται από την μυοσίνη ενώ αντίστοιχα τα λεπτά από τις υπόλοιπες μυϊκές πρωτεΐνες. Η τροπονίνη και η τροπομυοσίνη δρουν ρυθμιστικά όσον αφορά την αλληλεπίδραση μεταξύ ακτίνης και μυοσίνης, συμβάλλοντας έτσι στο μηχανισμό της σύσπασης και της χαλάρωσης στο μυ. Στα μυϊκά ινίδια συναντώνται επίσης και πρωτεΐνες όπως αυτές της α-ακτινίνης,

β-ακτινίνης, κρεατικινάσης, τινίνης, φιλαμίνης και c- πρωτεΐνης (Σμοκοβίτης, 1999).

### 1.12 Μυοσίνη

Στους σκελετικούς μύες αντιστοιχούν περίπου 70-100 mg ανά g μύος με αυτό να συνεπάγεται ποσοστό αντίστοιχο με 40-60% της συνολικής μυϊκής πρωτεΐνης. Όσον αφορά ένα γενικό χαρακτηριστικό της μυοσίνης, είναι ευδιάλυτη σε μεγάλες συγκεντρώσεις άλατος όμως δεν διαλύεται σε χαμηλά ποσοστά. Σχετικά με την δομή της (Εικόνα 6) αποτελεί ένα αρκετά μεγάλο σε μέγεθος (540 kbp) και ασύμμετρο μόριο και την απαρτίζουν έξι πολυπεπτιδικές αλυσίδες (υπομονάδες). Εκ των οποίων οι δύο είναι όμοιες βαριές αλυσίδες με 540 kb η καθεμία και από τέσσερις ελαφριές αλυσίδες με 20 kb η καθεμία (Stryer, 1997). Το μόριο της μυοσίνης περιέχει μια σφαιρική περιοχή με διπλή κεφαλή η οποία συνδέεται με μια μακριά ουρά, μήκους 1500 Å και πλάτους 20 Å, η οποία στην ουσία είναι μια διπλή α-έλικα η οποία διαμορφώνεται από τις βαριές αλυσίδες. Σε κάθε κεφαλή, υπάρχει σύνδεση μεταξύ δύο διαφορετικών ελαφριών αλυσίδων με την βαριά. Υπάρχει πολικότητα στο νηματίο της μυοσίνης και οι δύο σφαιρικές κεφαλές προσανατολίζονται προς αντίθετη κατεύθυνση. Αναφορικά με την λειτουργικότητα της μυοσίνης αξίζει να σημειωθούν 3 βασικές λειτουργικές βιολογικές διεργασίες της. α) Τα μόρια της όταν βρίσκονται σε κάποιο διάλυμα που θα εμφανίζει ιοντική ισχύ σε φυσιολογικά επίπεδα σχηματίζουν δομή νηματίων, β) Έχει την δυνατότητα σύνδεσης με την πολυμερισμένη διαμόρφωση που λαμβάνει η ακτίνη και που μάλιστα αποτελεί βασικό συστατικό των λεπτών νηματίων. Συνδέεται διαμέσω των σφαιρικών κεφαλών της, οι οποίες προκαλούν την μετακίνηση των νηματίων της ακτίνης και προς τις δύο κατευθύνσεις, με συνέπεια να δημιουργούν κίνηση των νηματίων και γ) Η μυοσίνη παρουσιάζει δράση ATPάσης, υδρολύει δηλαδή το ATP για να παράξει ενέργεια και αυτή η δράση εμφανίζεται κυρίως στο τμήμα της κεφαλής της μυοσίνης (Lowe, 1994). Στην αλλαγή της τελικής διαμόρφωσης που λαμβάνει τελικά η κεφαλή της μυοσίνης αλλά και στην κίνηση συμβάλλουν τόσο η ενέργεια που παράγεται όσο και η απελευθέρωση του ανόργανου φωσφορικού (Stryer, 1997).



Εικόνα 6: Δομή μορίου μυοσίνης .

### 1.13 Ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης

Η μυοσίνη του γραμμωτού μυ στα σπονδυλωτά περιέχει τρεις μορφές ελαφριών αλυσίδων: Ελαφριά αλυσίδα 1 της Μυοσίνης (MLC1) με M.B 22 kb, Ελαφριά αλυσίδα 2 της Μυοσίνης (MLC2) με M.B 18 kb και Ελαφριά αλυσίδα 3 της Μυοσίνης (MLC3) με M.B 16 Kb. Η διπλή κεφαλή απαρτίζεται από MLC2 και μία από τις άλλες δύο MLC1 ή MLC3 αντίστοιχα. Όσον αφορά την ταξινόμησή τους οι ελαφριές αλυσίδες διακρίνονται σε: α) Αλκαλικές (MLC1 και MLC3), που μπορούν να απομονωθούν μετά από κατεργασία της μυοσίνης με αλκάλι και προέρχονται από το ίδιο γονίδιο έπειτα από εναλλακτικό μάτισμα (Thiebaud et al., 2001) και β). Απομονωμένες μετά από κατεργασία με δινιτροβενζοϊκό οξύ (DTNB) αλυσίδες (MLC2). Ο ρόλος της MLC2 είναι περισσότερο ρυθμιστικός απ' ό τι καταλυτικός για την δέσμευση του ασβεστίου και γι αυτό αναφέρεται και ως ρυθμιστική αλυσίδα (Weeds & Lowey, 1971). Η φωσφορυλίωση επηρεάζει άμεσα την δράση της και διπλασιάζει την δραστηριότητα ATPάσης της μυοσίνης συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην μυϊκή συστολή. Αντιστοίχως η αποφωσφορυλίωση της που επέρχεται μέσω της φωσφατάσης C προκαλεί την χάλαση του μύος.

Οι ελαφριές και οι βαριές αλυσίδες της μυοσίνης συναντώνται σε διάφορες ισομορφές. Οι ισομορφές των βαριών αλυσίδων είναι τέσσερις εκ των οποίων συμπεριλαμβάνονται η αργή αλυσίδα ή β-MHC και τρεις γρήγορες οι οποίες αναγράφονται ως Να-, Πχ- IIb- MHCs ισομορφές

Οι ισομορφές στις ελαφριές αλυσίδες είναι εξίσου πολλές με πιο εξέχουσα θέση να καταλαμβάνουν η αργή MLC1s (MLC1 slow) και οι δύο γρήγορες MLC1f και MLC3f

(Schiaffino & Reggiani, 1994) καθώς και τρεις επιπλέον ισομορφές MLC2 (MLC2f, MLC2a και MLC2v) (D'Albis A. and Butler-Browne G., 1993).

#### 1.14 Έκφραση αλυσίδων μυοσίνης

Η έκφραση των ισομορφών τόσο των MHCs και των MLCs διαφέρουν μεταξύ των διάφορων ιστών και αναπτυξιακών σταδίων. Η έκφραση τους επηρεάζεται από περιβαλλοντικές και ορμονικές παραμέτρους καθώς και από διατροφικές συνθήκες και άσκηση (Whalen et al., 1981, Gauthier et al., 1982, Izumo et al., 1986, Yamato et al., 1994, Hill et al., 2000). Επίδραση στα επίπεδα του mRNA των ισομορφών στις ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης διαδραματίζει και η θερμοκρασία (Hirayama et al., 1998).

Η έκφραση των αλυσίδων μυοσίνης στα ψάρια παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς η αύξηση του γραμμωτού μυ πραγματοποιείται τόσο μέσω υπερπλασίας όσο και μέσω υπερτροφίας κατά τη διάρκεια του μεγαλύτερου χρονικού διαστήματος του κύκλου ζωής τους ενώ αντιθέτως στα θηλαστικά η υπερπλασία περιορίζεται στην προ- και γενετική περίοδο (Johnston et al., 1998).

Στην τσιπούρα έχουν βρεθεί δύο ελαφριές αλυσίδες οι MLC2 και MLC3 (Moutou et al., 2001) των οποίων η έκφραση παρατηρείται μόνο σε λευκό μυ. Η έκφραση της αλυσίδας MLC2 αρχίζει στην αρχή της ανάπτυξης ταυτόχρονα με την έναρξη της σωματογένεσης και οι θυροειδείς ορμόνες είναι υπεύθυνες για την ρύθμιση της (Moutou et al., 2001). Στην τσιπούρα έχουν βρεθεί δύο ισομορφές της MLC2, (Sarroroulou et al., 2006). Εξ' αυτών, η ισομορφή A αποτελείται από 170αα και περιέχει τρία πιθανά πολυαδενυλικά σήματα στο 3' UTR. Αυτά τα τρία εναλλακτικά μετάγραφα της MLC2A προέρχονται από εναλλακτικό σήμα πολυαδενυλίωσης και κωδικοποιούν για το ίδιο πεπτίδιο αλλά για διαφορετικά μήκη της 3'UTRs (280 bp, 788 bp και 876 bp). Η έκφρασή της συναντάται μόνο στο σκελετικό μυ (λευκό φιλέτο) και ευθύνεται για την δημιουργία νέων μυϊκών ινών (Sarroroulou et al., 2006; Moutou et al., 2009). Η ισομορφή B με την σειρά της κωδικοποιεί ένα πεπτίδιο 170 αα, παρουσιάζει ευρύτερη έκφραση και συναντάται σε διάφορους ιστούς όπως στον κόκκινο, στον λευκό, στον καρδιακό μυ, στους νεφρούς, στο ήπαρ, στη σπλήνα, στον εγκέφαλο, στα βράγχια, και στην επιδερμίδα.

Η ισομορφή Α εμφανίζεται κατά την έναρξη της σωματογένεσης όπου το μετάγραφο εμφανίζεται σε υψηλά ποσοστά κατά τη διάρκεια της υπερπλασίας και ελαττώνεται κατά τη μετα-μεταμόρφωση. Υβριδισμός *in situ* έδειξε ότι η ισομορφή Α εκφράζεται στις νεοσχηματιζόμενες λευκές μυϊκές ίνες και μετά τη μεταμόρφωση η έκφραση περιορίζεται σε μικρά μυογενετικά κύτταρα μεταξύ των ώριμων μυϊκών ινών. Η έκφραση της ισομορφής Β εμφανίζεται μετά την εκκόλαψη και παραμένει σε χαμηλά επίπεδα κατά τα προνυμφικά στάδια.

### 1.15. Λεπτίνη

Η λεπτίνη αποτελεί μια πρωτεΐνη μοριακού βάρους 16 kDa, και εκκρίνεται κυρίως από το λιπώδη ιστό. Την απαρτίζουν τέσσερις αντιπαράλληλες α έλικες, οι οποίες μεταξύ τους ενώνονται με δύο συνδέσεις και με έναν βρόγχο μικρού μεγέθους που τοποθετούνται παίρνοντας τελική διαμόρφωση αριστερόστροφης ελικοειδούς περιστρεφόμενης δομής. (Copeland et al., 2011). Το σηματοδοτικό αυτό πεπτίδιο έχει πληθώρα λειτουργιών με την πιο βασική εξ'αυτών τον έλεγχο και την ρύθμιση της όρεξης με σκοπό να γίνεται έλεγχος στην λαμβάνουσα τροφή, στο σωματικό βάρος καθώς και στην ενεργειακή ομοίωση του κάθε οργανισμού αντίστοιχα. Άλλη μια δράση της είναι η ενημέρωση του εγκεφάλου σχετικά με τις αποθήκες σωματικού λίπους με συνέπεια να προκαλεί αλλαγές σε συμπεριφορική, μεταβολική και ενδοκρινολογική φυσιολογία του οργανισμού (Copeland et al., 2011). Η λεπτίνη είναι γνωστό πως αναστέλλει τη δραστηριότητα της καρβοξυλάσης του ακετυλο-CoA και καταστέλλει επίσης και τη σύνθεση λιπαρών οξέων και λιπιδίων (λιπογένεση). Επομένως, έχει την δυνατότητα να συμμετέχει άμεσα στον έλεγχο των μεταβολικών διαδικασιών που υφίσταται ο λιπώδης ιστός τόσο με το να προκαλεί αναστολή της λιπογένεσης όσο και με το να διεγείρει την διαδικασία της λιπόλυσης (Copeland et al., 2011). Αυξάνεται επίσης όσο αυξάνονται και τα αποθέματα λίπους στον οργανισμό ενώ αντίστοιχα μείωση στα αποθέματα λίπους οδηγεί σε μείωση των επιπέδων λεπτίνης που κυκλοφορεί στο αίμα. Άλλωστε υψηλή έκφραση λεπτίνης προκαλεί μείωση της όρεξης με συνέπεια τα άτομα αυτά να είναι πιο μικρόσωμα ενώ αντίθετα χαμηλά επίπεδα λεπτίνης αντιστοιχούν σε διέγερση της όρεξης (Pfaff, 2001).

### 1.16 Λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL)

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση αποτελεί ένα γλυκοπρωτεϊνικό ένζυμο και η παραγωγή του γίνεται σε διάφορους ιστούς όπως ο λιπώδης, οι σκελετικοί μύες, η καρδιά, τα μακροφάγα και οι μαστιτικοί αδένες. Στα ενήλικα ψάρια εκφράζεται και στο ήπαρ, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει στα θηλαστικά. (Garfinkel et al., 1987, Saera-Vila et al., 2005). Η LPL έχει βρεθεί σε μοριακό επίπεδο πως εκφράζεται σε διαφορετικά είδη ψαριών όπως τα παρακάτω: στο *Danio rerio* (Arnault et al., 1996), την ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*), (Lindberg & Olivercrona, 2002) στο φαγκρί (*Pagrus major*), (Liang et al., 2002) και στην τσιπούρα, όπου σε αυτά τα ψάρια έχει γίνει αναγνώριση μερικών ή ολόκληρων αλληλουχιών του γονιδίου της λιπάσης. Η ρύθμισή της πραγματοποιείται με βάση τις διατροφικές συνήθειες και με έναν ιστό-εξειδικευμένο τρόπο. Πρωταρχικό ρόλο στη ρύθμισή της διαδραματίζει η ινσουλίνη, που προωθεί την άμεση ενεργότητα της LPL στον λιπώδη ιστό προκαλώντας επίσης μείωσή της στους σκελετικούς μύες στον άνθρωπο και στον ποντικό καθώς και στα ψάρια (Farese Jr et al., 1991). Μέσω πρόσφατης μελέτης στην τσιπούρα διαπιστώθηκε πως αλλαγές της σύστασης των πρωτεϊνών στην τροφή προκαλούσαν διαφορές στην έκφραση της LPL στο λιπώδη ιστό (Saera-Vila et al., 2005).

Στην τσιπούρα υπάρχει μια διαβάθμιση όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης της LPL στους ιστούς. Πηγαίνοντας από την μεγαλύτερη έκφραση στην μικρότερη αντίστοιχα όπως φαίνεται παρακάτω : λιπώδης ιστός, ήπαρ, λευκός μυϊκός ιστός (λευκές μυϊκές ίνες) (Saera-Vila et al., 2005).

### 1.17 Γονίδιο LPL-like στην τσιπούρα

Μέσω φυλογενετικής ανάλυσης που πραγματοποιήθηκε για το γονίδιο της LPL στην τσιπούρα διαπιστώθηκε πως η πρωτεΐνη της LPL παρουσίαζε ομολογία της τάξης 78-79 % με τις αντίστοιχες αλληλουχίες της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης στην ιριδίζουσα πέστροφα και στο Zebrafish. Όμως το ποσοστό ομολογίας μειώθηκε στο 47,8 % όταν έγινε σύγκριση της LPL της τσιπούρας με την υποτιθέμενη αποκαλούμενη LPL στο φαγκρί (Liang et al., 2002). Πρόσφατες μελέτες όρισαν την δεύτερη LPL στο φαγκρί ως LPL2 και με φυλογενετική ανάλυση κατάφεραν να την ομαδοποιήσουν περισσότερο κοντά με την LPL σε σχέση με άλλα γονίδια τα οποία ανήκουν στην οικογένεια των λιπασών (Oku et al., 2006). Στη τσιπούρα βρέθηκε μια λιπάση αναφερόμενη ως LPL-like που παρουσίαζε περισσότερα κοινά στοιχεία με την

λιπάση που επιβεβαιώθηκε ως LPL2 (Benedito-palos et al., 2013) και με βάση αυτό εξήγαγαν το συμπέρασμα πως υπάρχει ένα ακόμα γονίδιο το LPL-like που είναι ισομορφή της.

Η έκφραση της LPL και της LPL-like στο φαγκρί εμφανίζεται κυρίως στον λιπώδη ιστό, στα βράγχια, στην καρδιά, στο ήπαρ, στο πάγκρεας, στις γονάδες, και στους μύες με την έκφραση της LPL να είναι σε χαμηλά επίπεδα στους μύες. Στη τσιπούρα η LPL-like εμφανίζεται κυρίως στους σκελετικούς μύες της και υπάρχει θετική ρύθμιση της έκφρασής της από την ελάττωση της τροφής. (Benedito-palos et al., 2013).

## 2. ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) αποτελεί ένα ψάρι της οικογένειας των Σπαρίδων, συγκαταλέγεται στα βασικότερα είδη εκτροφόμενων ψαριών που απαντούν στην Μεσόγειο. Παρουσιάζει τεράστιο ενδιαφέρον καθώς είναι ένα από τα κύρια ψάρια για τις ιχθυοκαλλιέργειες. Επομένως είναι σημαντικό να αναπτυχθούν μέθοδοι με σκοπό τον έλεγχο της ποιότητας και της ανάπτυξης του συγκεκριμένου είδους καθόλη την διάρκεια των αναπτυξιακών σταδίων παραγωγής του. Είναι λοιπόν ιδιαίτερα σημαντικό να γνωρίζουμε μηχανισμούς αύξησης και ανάπτυξης σε ιχθύδια τσιπούρας γιατί μέσω αυτών μπορεί να γίνει βελτιστοποίηση του προϊόντος είτε όσον αφορά τη διατροφική του αξία είτε τα οικονομικά οφέλη που μπορεί να επιφέρει. Τέτοιοι μηχανισμοί μπορεί να σχετίζονται με γονίδια που χαρακτηρίζονται ως μοριακοί δείκτες που είναι ενδεικτικοί του μεγέθους ή του αναπτυξιακού σταδίου της τσιπούρας και μπορούν να επιφέρουν αλλαγές ως προς την υπερπλασία και την υπερτροφία του ψαριού.

Η συγκεκριμένη εργασία έχει ως στόχο τη μελέτη της έκφρασης ορισμένων γονιδίων σε ιχθύδια τσιπούρας που είχαν κοινό μέγεθος αλλά προέρχονταν από τρεις διαφορετικές παρτίδες και από δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Τα γονίδια τα οποία μελετήθηκαν ήταν τα εξής : η ισομορφή Α της μυοσίνης MLC2 (MLC2A), η ισομορφή Β της μυοσίνης MLC2 (MLC2B), η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL-like) και η λεπτίνη. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να ελεγχθεί εάν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αύξησης ή ανάπτυξης.



### **3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

#### **3.1 Προέλευση ιχθυδίων**

Ιχθύδια τσιπούρας συλλέχθηκαν σε εμπορικό ιχθυογεννητικό σταθμό κατά τη διάρκεια μιας παραγωγικής περιόδου. Συλλέχθηκαν ιχθύδια από τρεις (3) παρτίδες ιχθυδίων. Σε κάθε παρτίδα, η δειγματοληψία ιχθυδίων πραγματοποιήθηκε α) στο τέλος της νυμφικής περιόδου (LR, 10-14 mm TL) και β) στο μέσο της μεταμόρφωσης (MM, 15-20 mm TL). Κατά τη δειγματοληψία τα ιχθύδια συλλέχθηκαν σε σωλήνες που περιείχαν RNA later και τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -20°C.

#### **3.2 Καταγραφή ολικού μήκους**

Αρχικά πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός και καταγραφή του ολικού μήκους (TL) των ιχθυδίων τσιπούρας σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια πάνω σε μιλιμετρέ χαρτί για ακριβή μέτρηση. Έπειτα τα ιχθύδια επανατοποθετήθηκαν σε RNA later (Sigma) σε θερμοκρασία -20° C μέχρι να πραγματοποιηθεί εξαγωγή ολικού RNA.

#### **3.3 Απομόνωση ολικού RNA**

Ολικό RNA απομονώθηκε από ιχθύδια κάθε παρτίδας με συγκεκριμένα μήκη, τα οποία είναι κοινά μεταξύ των δύο αναπτυξιακών σταδίων και κυμαίνονται μεταξύ των 9-11 mm. Κάθε ιχθύδιο κόπηκε στη μέση και μόνο το κομμάτι της ουράς χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση ολικού RNA ακολουθώντας τις οδηγίες του εμπορικού προϊόντος E.Z.N.A total RNA kit (Omega). Πιο συγκεκριμένα τα βήματα που ακολουθήθηκαν για την εξαγωγή RNA ήταν τα ακόλουθα:

1. Αφαιρέθηκε το RNA later.
2. Προστέθηκαν 700 μl TRK lysis buffer.
3. Ακολούθησε ομογενοποίηση του ιστού στο lysis buffer.
4. Φυγοκέντρηση στις 14000x g για 5 λεπτά.



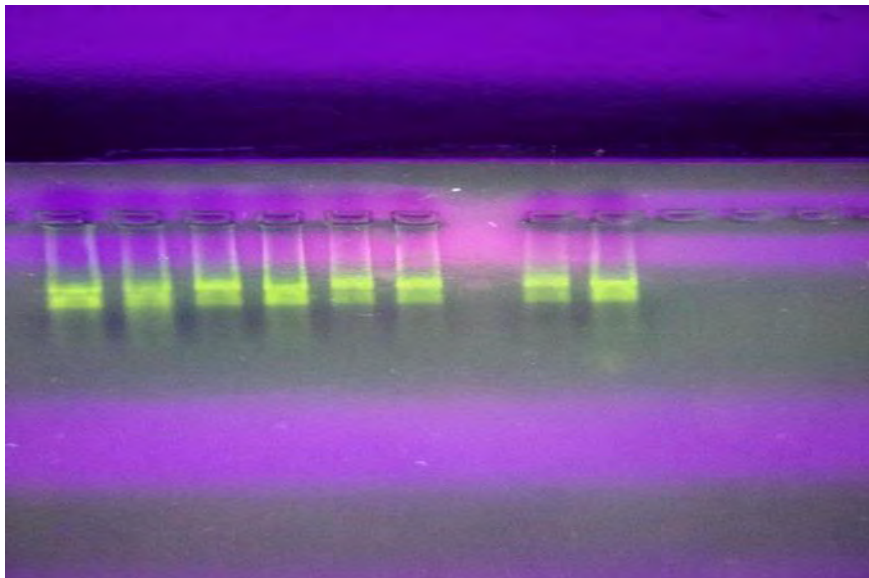
5. Προσεκτική μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο tube (1,5 ml) χωρίς την μεταφορά λιπαρών στρωμάτων που ενδεχομένως να επηρεάσουν την απόδοση παραγόμενου RNA.
6. Πλύση με 700 μl 70% αιθανόλης και γρήγορη ανάδευση στο vortex.
7. Τοποθέτηση της HiBind RNA Mini Column σε 1 Collection tube (2ml) .
8. Μεταφορά 700 μl από το δείγμα στη παραπάνω στήλη.
9. Φυγοκέντρηση στις 10000x g για 1 λεπτό, απόρριψη της φιλτραρισμένης ποσότητας και εκ νέου χρήση του tube.
10. Επανάληψη των βημάτων 8-9 μέχρι να μεταφερθεί όλη η ποσότητα στην στήλη.
11. Για κάθε στήλη, έγινε ετοιμασία DNase I stock solution (73,5 μl DNase Digestion Buffer και 1,5 μl DNase I (20 Kunitz/μl) για απομάκρυνση τυχόν γενωμικού DNA.
12. Προσθήκη 250 μl RNA wash buffer I και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 10000x g, απόρριψη φιλτραρισμένης ποσότητας και επαναχρησιμοποίηση της στήλης.
13. Προσθήκη 75 μl από το μίγμα του βήματος 11 και στόχευση ακριβώς πάνω στο βαμβάκι γιατί διαφορετικά αν μείνει ποσότητα στα τοιχώματα δεν θα γίνει επιτυχής πέψη του DNA.
14. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά.
15. Προσθήκη 250 μl RNA wash buffer I και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά.
16. Φυγοκέντρηση στις 10000x g για 1 λεπτό, απόρριψη φιλτραρισμένου υγρού και επαναχρησιμοποίηση στήλης.
17. Προσθήκη 500 μl RNA wash buffer II, φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 10000x g, απόρριψη φιλτραρισμένης ποσότητας και επαναχρησιμοποίηση της στήλης.
18. Επανάληψη βήματος 17.

19. Φυγοκέντρηση της στήλης στις 14000x g για 2 λεπτά ώστε να στεγνώσει η στήλη.
20. Μετακίνηση της στήλης σε νέο tube (1,5 μl).
21. Προσθήκη 50 μl DEPC water, φυγοκέντρηση στις 14000x g για 2 λεπτά, απόρριψη της στήλης και αποθήκευση δειγμάτων σε πάγο.

### 3.4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της καθαρότητας και της ποιότητας δειγμάτων RNA μεταξύ τους.

Αρχικά έγινε παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1 %, με προσθήκη 0,6 g αγαρόζης σε 45 ml TAE (Tris/Acetate/EDTA). Μετά τη στερεοποίηση του πηκτώματος φορτώθηκαν 3 μl χρωστικής και 3 μl δείγματος. Το τροφοδοτικό ρυθμίστηκε στα 100 V. Ακολουθεί εικόνα (Εικόνα 7) με χαρακτηριστικό παράδειγμα πηκτώματος αγαρόζης 1% για τα δείγματα του σταδίου LR για την παρτίδα 1701030102LR από τα δείγματα 1-8.



Εικόνα 7: Πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1% για τα δείγματα 1701030102LR(1)-1701030102LR(8).

### 3.5 Προσδιορισμός συγκέντρωσης RNA

Η συγκέντρωση του RNA προσδιορίστηκε μέσω του Qubit™ RNA BR Assay Kit (Invitrogen) που αφορά στο φωτομετρικό προσδιορισμό της ποσότητας του ολικού εξαγόμενου RNA καθώς επίσης και υπολογισμός της ποιότητας του RNA βάσει της αναλογίας A260/A280. Βάσει των συγκεντρώσεων υπολογίστηκε ο όγκος του νερού καθώς και του ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του cDNA.

### 3.6 Σύνθεση cDNA

Πραγματοποιήθηκε ακολούθως σύνθεση cDNA όπου δημιουργήθηκε ένα ενιαίο διάλυμα αντίδρασης για όλα τα δείγματα μου ώστε τα δείγματα να έχουν ακριβώς την ίδια διαχείριση μεταξύ τους. Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής περιελάμβανε τη σύνθεση του cDNA με εκκινητές oligodT(18) (O 4387, Sigma) και τυχαία εξαμερή 48190-011, Invitrogen). Το διάλυμα περιελάμβανε τα ακόλουθα:

1. 14,45  $\mu$ l RNA
2. 1  $\mu$ L dNTPs (10 mM)/ 1  $\mu$ L RH (10 mM)
3. 4  $\mu$ L 5x RT buffer
4. 2  $\mu$ L DTT (0,1 M)
5. 1  $\mu$ l random primers
6. 0,55  $\mu$ L αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse Transcriptase, 200 U/ $\mu$ L; GIBCO)

Το διάλυμα αντίδρασης προστέθηκε σε κάθε δείγμα και ακολούθησε ελαφριά ανάδευση και φυγοκέντρωση.

Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής:

1. 25°C για 10 min
2. 37°C για 120 min
3. 85°C για 5 min
4.  $\infty$  για 4 min

Τα παραγόμενα cDNAs που προέκυψαν αποθηκεύτηκαν απευθείας σε θερμοκρασία  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.7 Έλεγχος ποιότητας σύνθεσης του cDNA

Έπειτα από την σύνθεση του cDNA πραγματοποιήθηκε η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) ώστε να ελεγχθεί η επιτυχία της σύνθεσης του cDNA. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση της PCR αφορούσαν την ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκαν 1  $\mu\text{l}$  από ένα τυχαίο δείγμα και για την αντίδραση δημιουργήθηκε το ακόλουθο μίγμα με τις εξής ποσότητες:

1. 5  $\mu\text{l}$  10x PCR buffer
2. 3  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25 mM)
3. 1  $\mu\text{l}$  dNTPs (10 mM)
4. 1  $\mu\text{l}$  forward primer b-actin BAF (100 pmol/ $\mu\text{l}$ )
5. 1  $\mu\text{l}$  reverse primer b-actin BAR (100 pmol/ $\mu\text{l}$ )
6. 0,2  $\mu\text{l}$  Taq
7. 37,8  $\mu\text{l}$  dH<sub>2</sub>O

Η παραπάνω αντίδραση συμπεριλαμβάνει τα εξής βήματα:

- |                                      |   |                |
|--------------------------------------|---|----------------|
| 1. 3 min στους $94^{\circ}\text{C}$  | } | 30 επαναλήψεις |
| 2. 45 sec στους $94^{\circ}\text{C}$ |   |                |
| 3. 1 min στους $48^{\circ}\text{C}$  |   |                |
| 4. 1 min στους $72^{\circ}\text{C}$  |   |                |

Στο τέλος της PCR κατασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 2,2% (150 ml TAE και 3,3 g αγαρόζη) και χωρητικότητα 100 θέσεων που ως σκοπό είχε την

παρατήρηση παραγωγής προϊόντος. Πιο συγκεκριμένα φορτώθηκαν 7μl από το κάθε δείγμα και 3 μl χρωστικής και το πήκτωμα έτρεξε στα 150 V.

### 3.8 Ανάπτυξη μεθόδου Real-Time PCR

#### ✓ Διαδικασία Real –Time PCR

Η Real-Time PCR αποτελεί μια διεργασία μέσω της οποίας γίνεται εφικτή η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων (Bustin et al., 2005). Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στον υπολογισμό και στην ανίχνευση των προϊόντων κατά τη διάρκεια κάθε κύκλου μιας κλασσικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR), κάτι το οποίο προκύπτει μέσω της δράσης μια χρωστικής, της Sybr Green (Argy et al., 2005). Αυτή η χρωστική έχει τη δυνατότητα να προσδεθεί στο δίκλωνο προϊόν της PCR και να φθορίσει (Ponchel et al., 2003).

Μέσω της Real-time γίνεται εφικτός ο προσδιορισμός των επιπέδων έκφρασης των προς εξέταση γονιδίων και η ποσοτικοποίηση τους είναι είτε απόλυτη είτε σχετική. Στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε σχετική ποσοτικοποίηση όπου πραγματοποιείται καταγραφή της σχετικής μεταβολής των επιπέδων έκφρασης του mRNA των προς εξέταση γονιδίων σε σχέση με γονίδια αναφοράς (Housekeeping genes) (Pfaffl, 2004).

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με το μηχάνημα CFX Manager 3.1 της εταιρίας Biorad και τα συστατικά που περιείχε ήταν τα εξής:

1. 10 μl Sybr Green 2x
2. 1,5 μl cDNA
3. Εκκινητές των οποίων οι ποσότητες διαφοροποιούνταν ανάλογα με τις συγκεντρώσεις των εκκινητών κάθε φορά
4. H<sub>2</sub>O

Ο τελικός όγκος κάθε δείγματος των αντιδράσεων είχε τελικό όγκο 20μl.

Οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκε κάθε αντίδραση είναι οι εξής:

1. 95°C για 3min

2. 95°C για 15 sec (αποδιάταξη δίκλωνων τμημάτων)
3. 95°C για 40sec (υβριδοποίηση εκκινητών και δράση πολυμεράσης)

Έγινε επανάληψη των σταδίων 2 και 3, 39 φορές έως ότου συμπληρωθούν συνολικά 40 κύκλοι σε κάθε αντίδραση. Με σκοπό την κατασκευή καμπύλης αποδιάταξης αυξανόταν σταδιακά η θερμοκρασία κατά 0,5 °C, με αφετηρία τους 65°C μέχρι τους 95°C.

#### ✓ **Πρότυπες καμπύλες και υπολογισμός βαθμού απόδοσης αντίδρασης**

Από τα συνολικά 44 δείγματα χρησιμοποιήθηκαν 2μl από το κάθε ένα και έτσι προέκυψε ένα νέο δείγμα (pool) συνολικού όγκου 88 μl. Στη συνέχεια στο παραπάνω αυτό δείγμα πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:50, 1:80 και 1:100 φορές, με σκοπό να χρησιμοποιηθούν στην δημιουργία πρότυπων καμπυλών για το κάθε ζεύγος εκκινητών. Στη συνέχεια από την κλίση της κάθε καμπύλης έγινε υπολογισμός του βαθμού απόδοσης (Efficiency) κάθε αντίδρασης σύμφωνα με τον εξής τύπο:

$Efficiency = 10^{(-1/slope)}$  (Pfaffl, 2001), όπου slope αντιστοιχεί στην κλίση της πρότυπης καμπύλης.

Σε αυτό το σημείο αξίζει να αναφερθεί πως ιδανικό είναι η τιμή του βαθμού απόδοσης να προσεγγίζει το 100 %, όμως συνήθως ποικίλλει μεταξύ των τιμών 93-101%.

#### ✓ **Γονίδια αναφοράς - υπολογισμός παράγοντα κανονικοποίησης**

Στην συγκεκριμένη πτυχιακή έγινε μελέτη των ακόλουθων τριών γονιδίων αναφοράς μέσω της μεθόδου της Real-time PCR:

ELF1

RPS18

RPL13A

Τα υποψήφια ιδιοστατικά γονίδια εξετάστηκαν πριν την χρήση τους όσον αφορά τη σταθερότητα της έκφρασής τους (M) στις συνθήκες της συγκεκριμένης, δεδομένης πειραματικής διαδικασίας. Αυτή η ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος στατιστικής ανάλυσης geNorm το οποίο αποτελεί τον πιο δημοφιλή αλγόριθμο για την εύρεση σταθερότητας των γονιδίων αναφοράς από ένα σύνολο δοκιμαζόμενων υποψήφιων γονιδίων αναφοράς και υποδεικνύει την τιμή της γονιδιακής σταθερότητας (M) για κάθε γονίδιο (Vandesompele et al., 2002). Το geNorm επομένως υποδεικνύει τη σταθερότητα της έκφραση κάθε γονιδίου αναφοράς και χρησιμοποιεί το γεωμετρικό μέσο σαν έναν παράγοντα κανονικοποίησης. Για να συνεχιστεί η ανάλυση κάθε φορά απορρίπτεται το γονίδιο που εμφανίζει τη πιο μεγάλη τιμή M (περισσότερο ασταθές), μέχρι να καταλήξει στα δύο πιο σταθερά γονίδια (Vandesompele et al. 2002). Για τον υπολογισμό των επιπέδων R0 των γονιδίων αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος (comparative ct method). Ο παράγοντας κανονικοποίησης όσον αφορά το κάθε δείγμα, υπολογίστηκε ως ο γεωμετρικός μέσος των δύο καλύτερων γονιδίων αναφοράς με την χρήση του geNorm. Πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση της έκφρασης όλων των γονιδίων στόχων με βάση τον παρακάτω παράγοντα κανονικοποίησης: Κανονικοποίηση της έκφρασης ισοδυναμεί με έκφραση του γονιδίου / παράγοντα κανονικοποίησης.

#### ✓ **Γονίδια- στόχοι**

Στα γονίδια στόχους συμπεριλαμβάνονται οι δύο ισομορφές A και B της ελαφριάς αλυσίδας 2 της μυοσίνης, η λεπτίνη και το γονίδιο της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης.

#### ✓ **Εκκινητές γονιδίων**

Στον Πίνακα 3 απεικονίζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της έκφρασης των ιδιοστατικών γονιδίων καθώς και τον γονιδίων στόχων.

Αξίζει επίσης σε αυτό το σημείο να αναφερθούν αναλυτικά και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν τελικά για τον κάθε εκκινητή ξεχωριστά τόσο για τα γονίδια αναφοράς όσο και για τα γονίδια στόχους όπως διατυπώνεται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 3: Αλληλουχίες εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν

Γονίδιο - Accession Number	Εκκινητής
ELF1 AF184170	FW 5' TCAAGGCATGGAAGGTTGAG 3'
	RV 5' AGTTCCAATACCGCCGAT 3'
RPS18 AM490061	FW 5' AGGGTGTGGCAGACGTTAC 3'
	RV 5' CAGGACCTGGCTGTATTTGC 3'
RPL13 CV133427	FW 5' TCTGGAGGACT GTCAGGGGCATGC 3'
	RV 5' AGACGCACAATCTTAAGAGCAG 3'
MLC2A AF150904	FW 5' GCCCCATCAACTTCACCGTCTTT 3'
	RV 5' GGTTGGTCATCTCCTCAGCGG 3'
MLC2B FG618629	FW 5' TCCCTTTGCTATTCTGCCTTC 3'
	RV 5' AAATCAGCCCTATTCCCATA 3'
Lept	FW 5' CAATGCAAACGTCCATGCT 3'
	RV 5' CGTTGCCATACAAACACACC 3'
LPL like	FW 5' CAAGCTCGGCTACAACATCA 3'
	RV 5' GAAATCTTCATCGGCTGCTC 3'

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Γονίδιο	Συγκέντρωση Forward εκκινητή (nM/μL)	Συγκέντρωση Reverse εκκινητή (nM/μL)
ELF1	300	300
RPL13	300	300
RPS18	400	300
MLC2A	300	300
MLC2B	200	200
Lept	300	300
LPL like	300	300

### 3.9 Στατιστική ανάλυση

Στην παρούσα μελέτη η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω της two-way analysis of variance (ANOVA) ώστε να πραγματοποιηθεί σύγκριση των διαφορών που παρουσιάζουν ως προς την έκφρασή τους τα γονίδια στις τρεις διαφορετικές παρτίδες. Επιπλέον έγινε χρήση του t-test για να πραγματοποιηθεί σύγκριση ανάμεσα



στα δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια των ιχθυδίων της τσιπούρας. Για την δημιουργία των γραφικών παραστάσεων χρησιμοποιήθηκε το θηκόγραμμα (boxplot). Για την αναπαράσταση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος pair-wise test και για όλες τις στατιστικές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν το επίπεδο σημαντικότητας τέθηκε για  $p < 0.05$ .

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 Καταγραφή μηκών

Αρχικά πραγματοποιήθηκε καταγραφή των μηκών των ιχθυδίων τσιπούρας όπου σημειώθηκαν αναλυτικά τα μήκη όλων των ψαριών από όλα τα αναπτυξιακά στάδια καθώς επίσης και η συχνότητα με την οποία εμφανίζονται. Μετέπειτα έγινε επιλογή μόνο ορισμένων ψαριών με το ίδιο μέγεθος από δύο διαφορετικά όμως αναπτυξιακά στάδια (LR και MM) και από τρεις διαφορετικές παρτίδες όπως απεικονίζονται στους παρακάτω Πίνακες 5 και 6.

Πίνακας 5: Καταγραφή επιλεγμένων μηκών ιχθυδίων σταδίου LR.

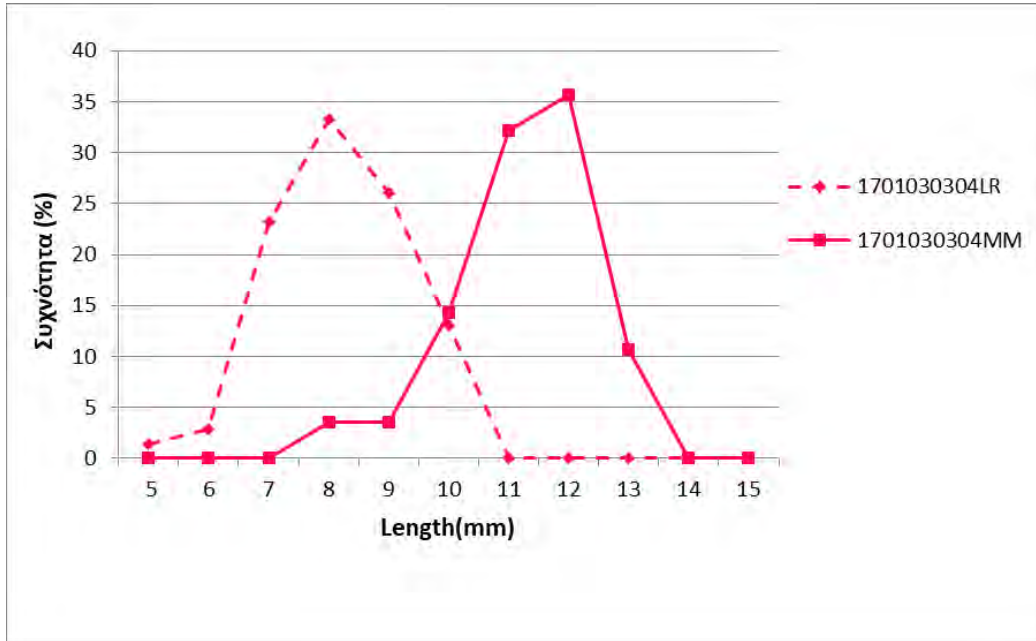
170103.03-04 LR	170103.01-02 LR	170103.05-0708 LR
9,5	10	9,5
9,5	10	10
9,5	10	10
9,5	10	10
9,5	10	11
10	10	11
10	10	11
10	10,5	
10		

Πίνακας 6: Καταγραφή επιλεγμένων μηκών ιχθυδίων σταδίου MM.

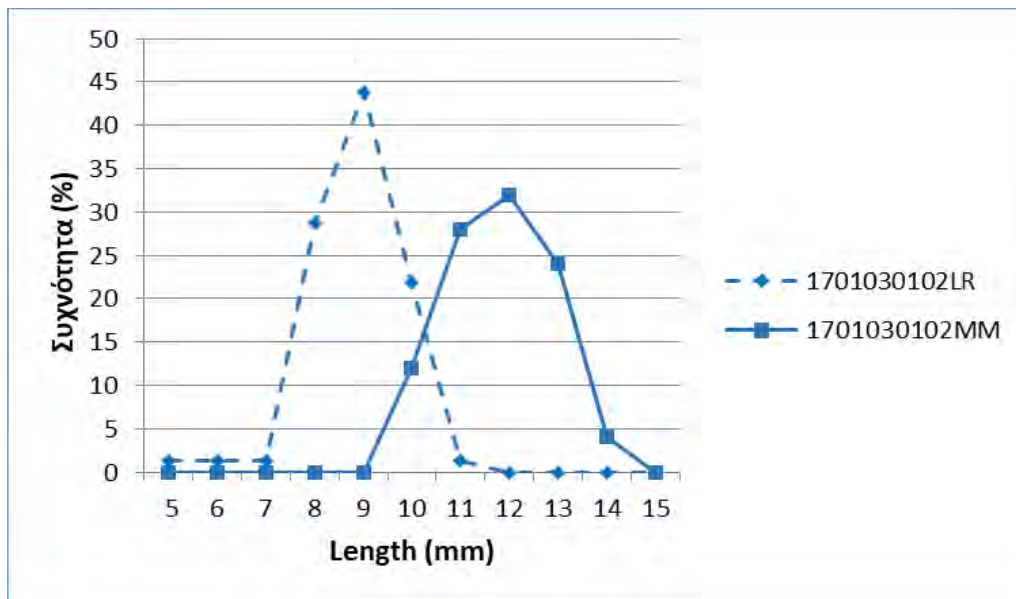
<b>170103.03-04 MM</b>	<b>170103.01-02 MM</b>	<b>170103.05-0708 MM</b>
9	10	10
10	10	10
10	10	10,5
10	10,5	11
10	10,5	11
10,5	10,5	
10,5	10,5	
10,5		

#### **4.2 Κατανομή ολικού μήκους ιχθυδίων**

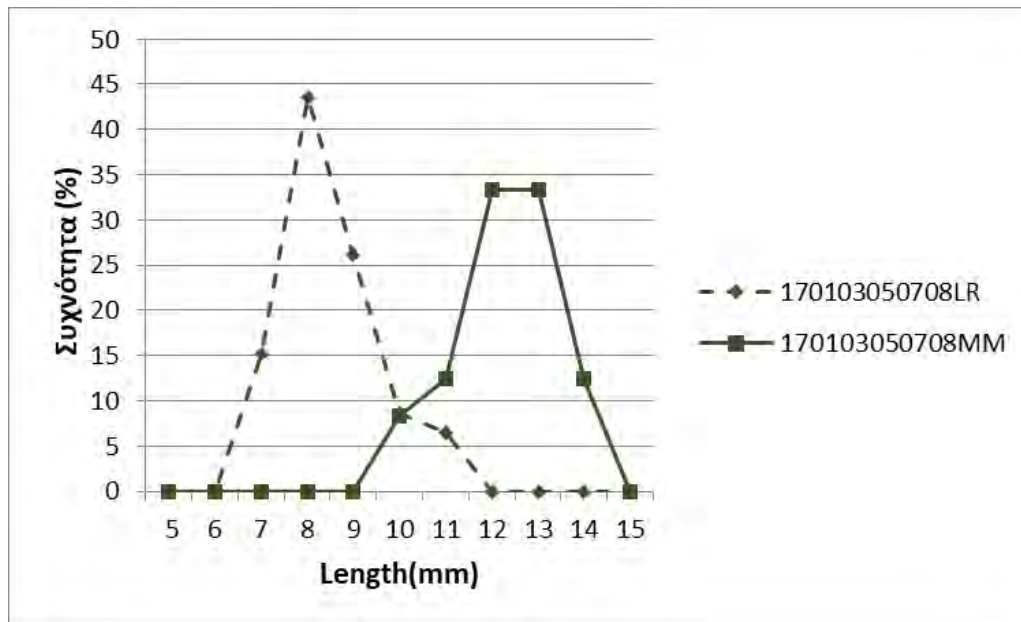
Σύμφωνα με την καταγραφή των μηκών στα δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και στις διαφορετικές παρτίδες σχεδιάστηκαν καμπύλες κατανομής ολικού μήκους για κάθε παρτίδα, οι οποίες παρουσιάζονται στα ακόλουθα διαγράμματα (Εικόνα 8-10).



Εικόνα 8: Διάγραμμα κατανομής μηκών για παρτίδα 1701030304.



Εικόνα 9: Διάγραμμα κατανομής μήκων για παρτίδα 170103.01-02.



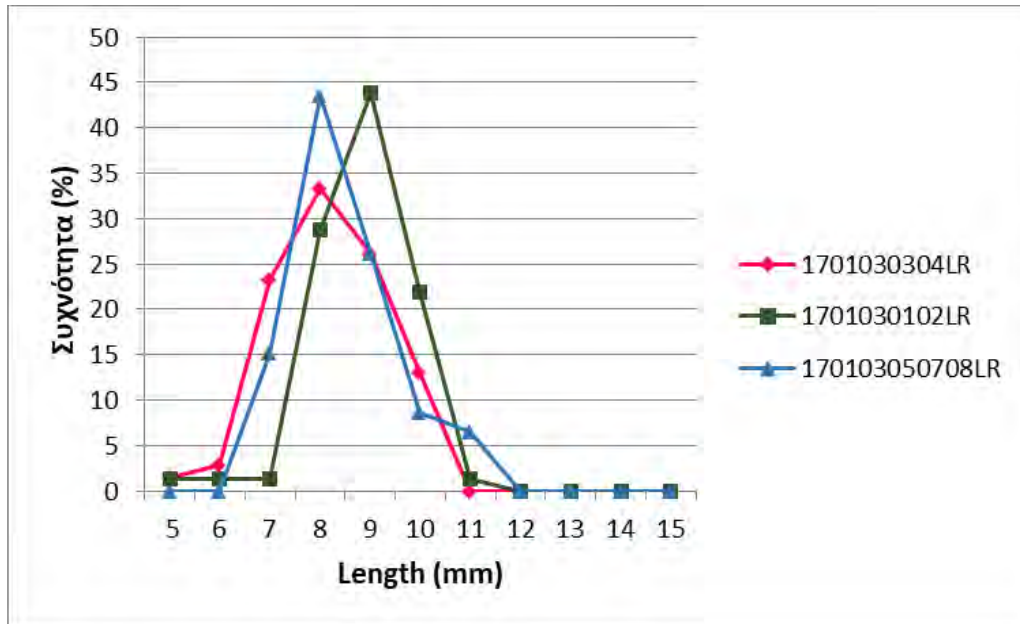
Εικόνα 10: Διάγραμμα κατανομής μήκων για παρτίδα 170103.05-0708.

Από τα παραπάνω τρία διαγράμματα κατανομής μηκών φαίνεται πως υπάρχει μια αλληλοεπικάλυψη μεταξύ των δύο διαφορετικών σταδίων ανάπτυξης (LR και MM) όσον αφορά τα μήκη που εμφανίζουν τα ιχθύδια της ίδιας παρτίδας. Αυτή η αλληλοεπικάλυψη παρουσιάζεται και στις τρεις περιπτώσεις διαφορετικών παρτίδων υποδεικνύοντας πως ιχθύδια από την ίδια παρτίδα αλλά προερχόμενα από διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια μπορούν να εμφανίσουν ομοιότητες στα μεγέθη τους.

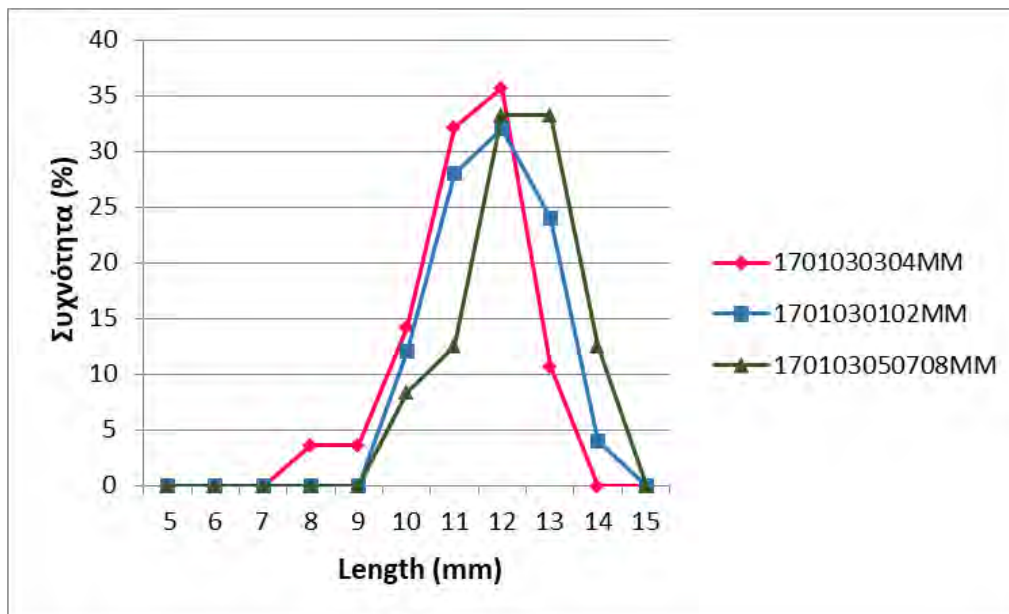
#### 4.3 Σύγκριση των μηκών μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων

Ακολούθησε σύγκριση μεταξύ των μηκών που παρουσιάζονταν στις τρεις διαφορετικές παρτίδες όμως στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο κάθε φορά και διαπιστώθηκε πως στις διαφορετικές παρτίδες που όμως αναφέρονται στα ίδια στάδια ανάπτυξης LR ή MM αντίστοιχα κάθε φορά, παρατηρείται παραπλήσια κατανομή του μήκους (Εικόνα 11-12). Πιο συγκεκριμένα, διαπιστώνεται πως παρόλο που αναφερόμαστε σε διαφορετικές παρτίδες τα μεγέθη της τσιπούρας σε αυτές τις παρτίδες και η συχνότητα με την οποία αυτά εμφανίζονται είναι κοινά και χωρίς μεγάλες διαφοροποιήσεις. Κυρίως επικρατεί μια εικόνα όπου ιχθύδια τσιπούρας προνυμφικού σταδίου (LR) έχουν μεγέθη μεταξύ 4,5-11 mm με μεγαλύτερη συχνότητα μεταξύ μηκών 6-10 mm. Αντίστοιχα, ιχθύδια τσιπούρας στο στάδιο της

μεταμόρφωσης (MM) έχουν μεγέθη μεταξύ 8-14 mm με μεγαλύτερη συχνότητα μεταξύ των μηκών 10-13 mm.



Εικόνα 11: Διάγραμμα κατανομής μηκών για το αναπτυξιακό στάδιο LR.



Εικόνα 12: Διάγραμμα κατανομής μηκών για το αναπτυξιακό στάδιο MM.

#### 4.4 Αποδόσεις (E) των αντιδράσεων Real-Time που πραγματοποιήθηκαν

Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται οι αποδόσεις που προέκυψαν για τις αντιδράσεις τόσο των γονιδίων αναφοράς όσο και των γονιδίων στόχων που μελετήθηκαν στην τσιπούρα. Η απόδοση (E) της real-time PCR προσδιορίστηκε με βάση τον τύπο  $E=10^{[-1/\kappa\lambda\iota\sigma\eta]}$  (Pfaffl, 2001).

**Πίνακας 7: Αναλυτική απεικόνιση των αποδόσεων των αντιδράσεων για όλα τα γονίδια.**

Γονίδιο	ELF1	RPL13	RPS18	MLC2A	MLC2B	Lept	LPL like
Απόδοση (E)	1,08	1,09	1,18	1,14	1,055	1,13	0,98

#### 4.5 Γονίδια αναφοράς

Μέσω της συγκεκριμένης μελέτης και μέσω των διεργασιών που αναφέρθηκαν στη ενότητα «Υλικά και Μέθοδοι» ελέγχθηκε ο ιδιοστατικός χαρακτήρας που παρουσιάζουν τα παρακάτω γονίδια αναφοράς :

ELF1: Αυτό το γονίδιο είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση μιας ισομορφής της άλφα υπομονάδας του συμπλόκου του παράγοντα επιμήκυνσης 1. Η μεταφορά των αμινο-άκυλο tRNAs στο ριβόσωμα που πραγματοποιείται ενζυμικά οφείλεται με την σειρά της σε αυτό.

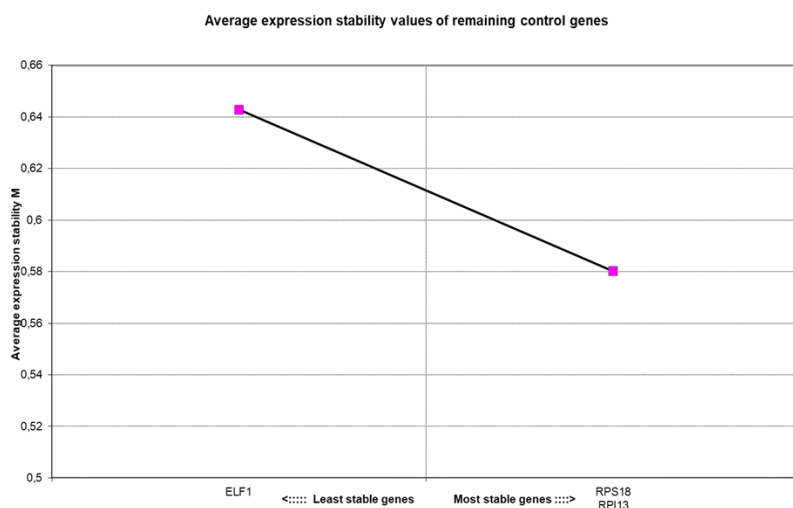
RPL13: Αυτό το γονίδιο είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση μιας ριβοσωμικής πρωτεΐνης L13a, που αποτελεί στοιχείο της 60S μεγάλης υπομονάδας. Αυτή η ριβοσωμική πρωτεΐνη βρίσκεται στο κυτόπλασμα και συγκαταλέγεται στην οικογένεια L13E.

RPS18: Αυτό το γονίδιο αναφοράς κωδικοποιεί μια ριβοσωμική πρωτεΐνη που αποτελεί στοιχείο της 40S μικρής υπομονάδας. Η συγκεκριμένη ριβοσωμική πρωτεΐνη βρίσκεται στο κυτόπλασμα και συγκαταλέγεται στην οικογένεια S13P.

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

Μέσω του προγράμματος geNorm επιλεχθήκαν ανάμεσα από τα γονίδια ELF1, RPS18 και RPL13 τα δύο με τη χαμηλότερη τιμή M, δηλαδή τα γονίδια αναφοράς με

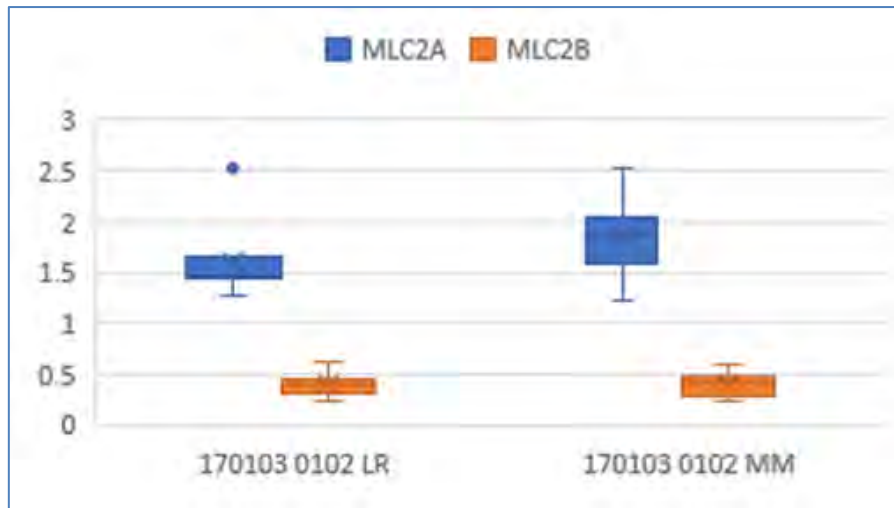
την πιο σταθερή έκφραση και την μεγαλύτερη σταθερότητα (Vandesompele et al., 2002). Στην Εικόνα 13 μέσω του διαγράμματος απεικονίζεται πως ανάμεσα στα τρία ιδιοστατικά γονίδια μικρότερη σταθερότητα είχε το ELF1 ενώ τα δύο πιο σταθερά ήταν τα γονίδια RPS18 και RPL13.



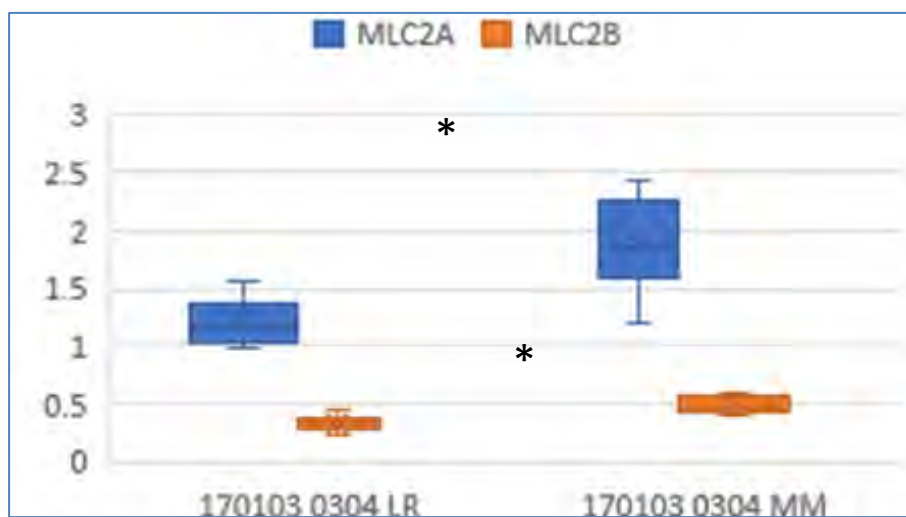
Εικόνα 13: Απεικόνιση τιμής της γονιδιακής σταθερότητας (M) για τα γονίδια αναφοράς.

#### 4.6 Επίπεδα έκφρασης των γονιδίων MLC2A και MLC2B

Στις Εικόνες 14-16 παρουσιάζεται η έκφραση των ισομορφών MLC2A και MLC2B στις τρεις παρτίδες που εξετάστηκαν. Σε κάθε περίπτωση παρατηρείται διαφορετική έκφραση μεταξύ των δύο αυτών ισομορφών, με την MLC2A να επικρατεί σε μεγαλύτερα επίπεδα σε σύγκριση με την MLC2B.

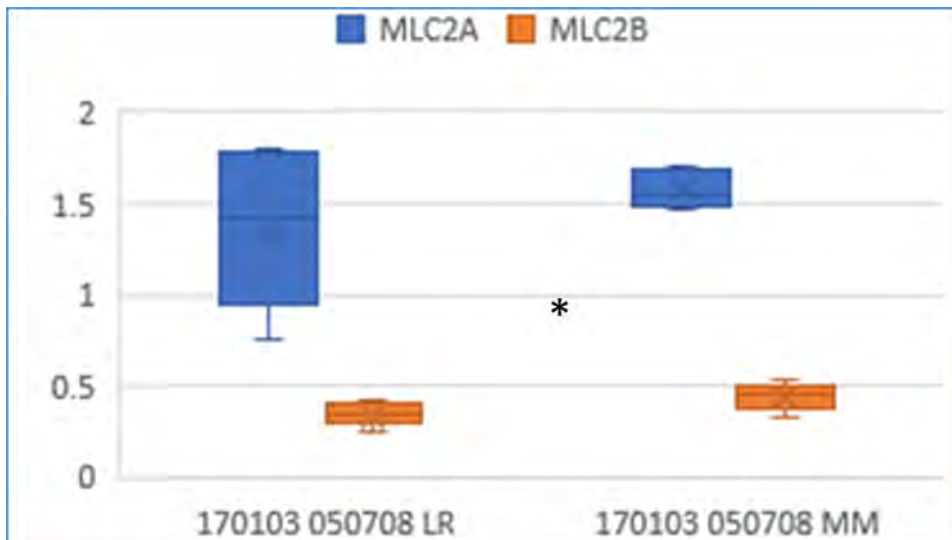


Εικόνα 14: Σχετική έκφραση των γονιδίων MLC2A και MLC2B στη τσιπούρα για την παρτίδα 1701030102 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM .



Εικόνα 15: Σχετική έκφραση των γονιδίων MLC2A και MLC2B στη τσιπούρα για την παρτίδα 1701030304 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM. Με αστερίσκο υποδεικνύονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των γονιδίων (p value <0,05).





Εικόνα 16: Σχετική έκφραση των γονιδίων MLC2A και MLC2B στη τσιπούρα για την παρτίδα 170103050708 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM. Με αστερίσκο υποδεικνύονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση των γονιδίων ( $p$  value <0,05).

#### 4.7 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL-like)

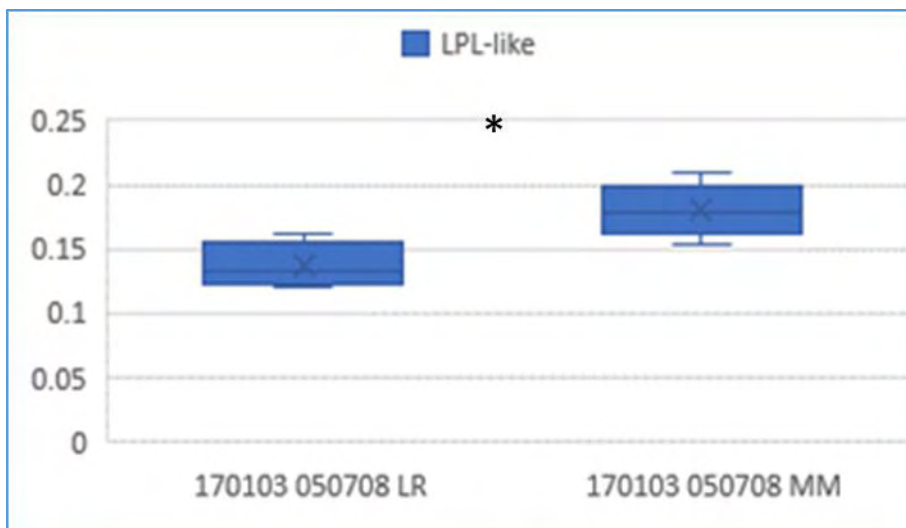
Στις Εικόνες 17-19 εμφανίζεται η έκφραση του γονιδίου της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης για τις τρεις διαφορετικές παρτίδες και στα δύο αναπτυξιακά στάδια. Παρουσιάζεται σταθερή έκφραση του γονιδίου ανεξαρτήτως αναπτυξιακού σταδίου.



Εικόνα 17: Σχετική έκφραση του γονιδίου LPL-like στη τσιπούρα για την παρτίδα 1701030102 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM.



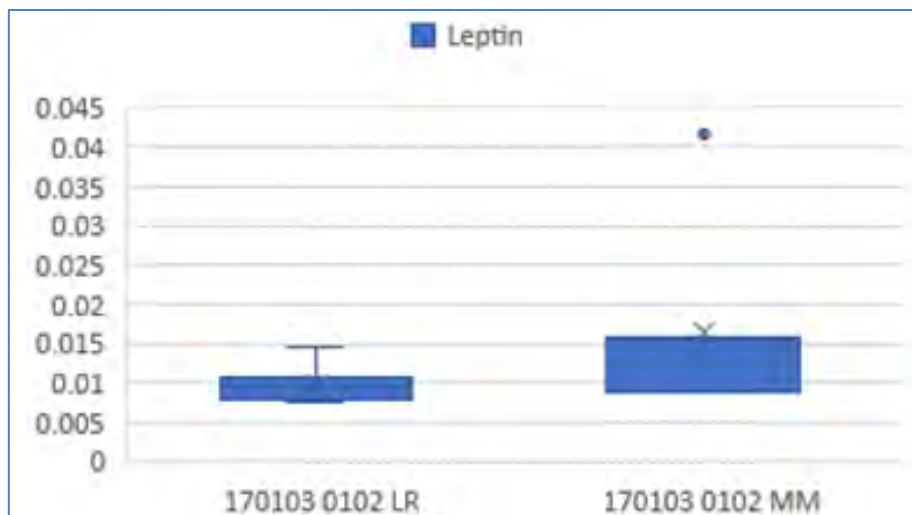
Εικόνα 18: Σχετική έκφραση του γονιδίου LPL-like στη τσιπούρα για την παρτίδα 1701030304 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM.



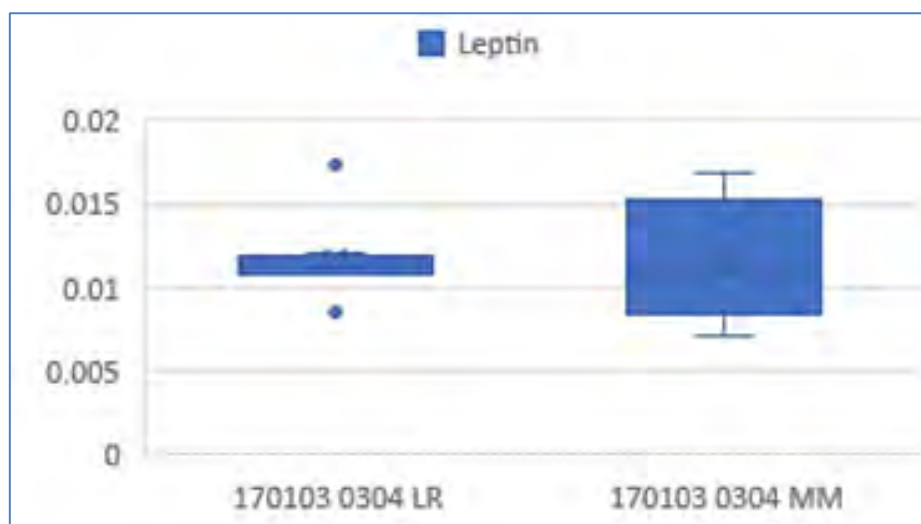
Εικόνα 19: Σχετική έκφραση του γονιδίου LPL-like στη τσιπούρα για την παρτίδα 170103050708 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM. Με αστερίσκο υποδεικνύονται οι στατιστικά σημαντικές διαφορές στην έκφραση του γονιδίου (p value <0,05).

#### 4.8 Επίπεδα έκφρασης του γονιδίου της λεπτίνης

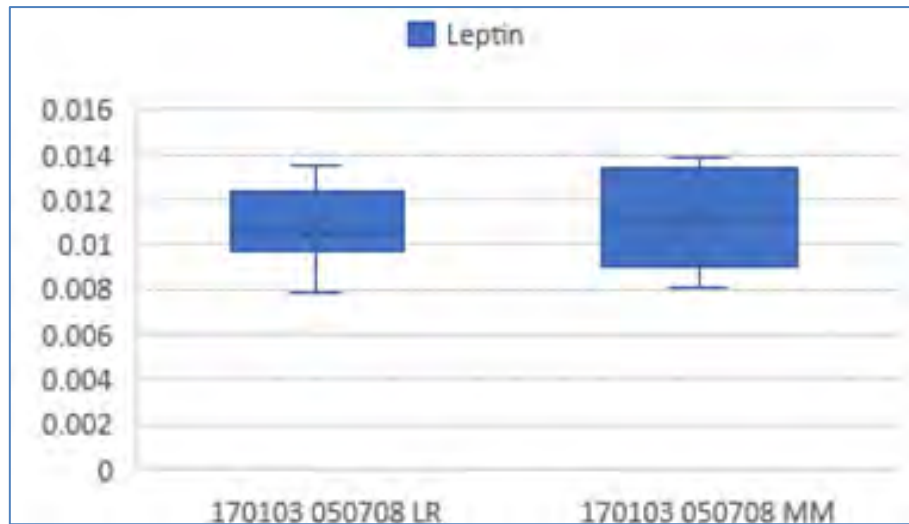
Στις Εικόνες 20-22 παρουσιάζεται η έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης για τις τρεις διαφορετικές παρτίδες και στα δύο αναπτυξιακά στάδια. Παρουσιάζεται σταθερή έκφραση του γονιδίου ανεξαρτήτως αναπτυξιακού σταδίου.



Εικόνα 20: Σχετική έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης στη τσιπούρα για την παρτίδα 1701030102 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM.



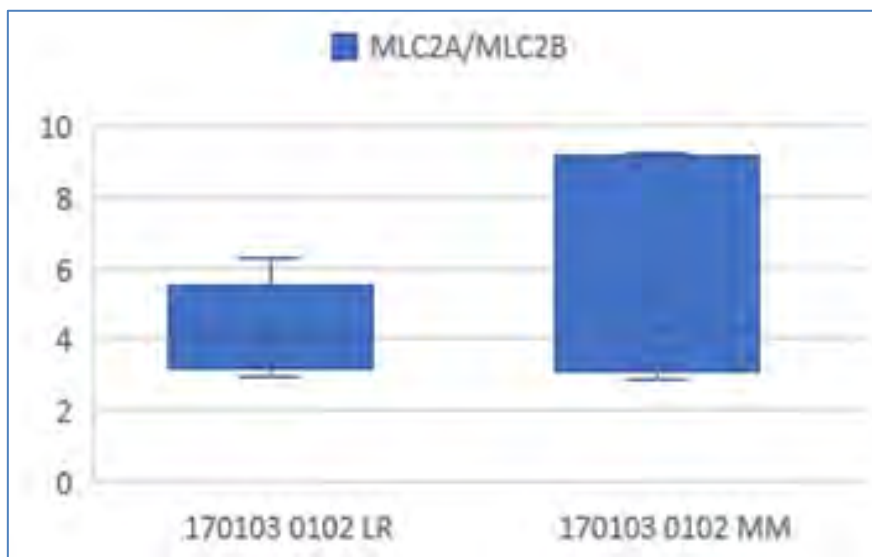
Εικόνα 21: Σχετική έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης στη τσιπούρα για την παρτίδα 1701030304 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM.



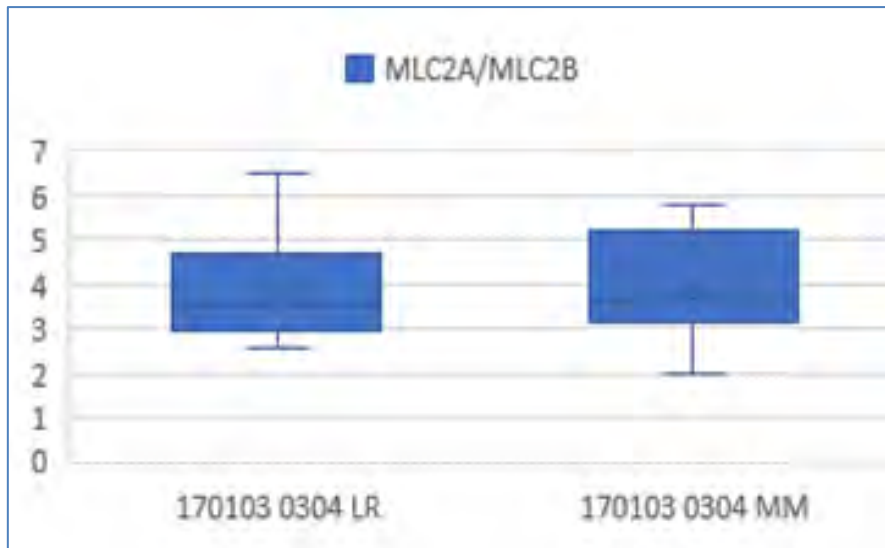
Εικόνα 22: Σχετική έκφραση του γονιδίου της λεπτίνης στη τσιπούρα για την παρτίδα 170103050708 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM.

#### 4.9 Επίπεδα έκφρασης του λόγου των γονιδίων MLC2A/MLC2B

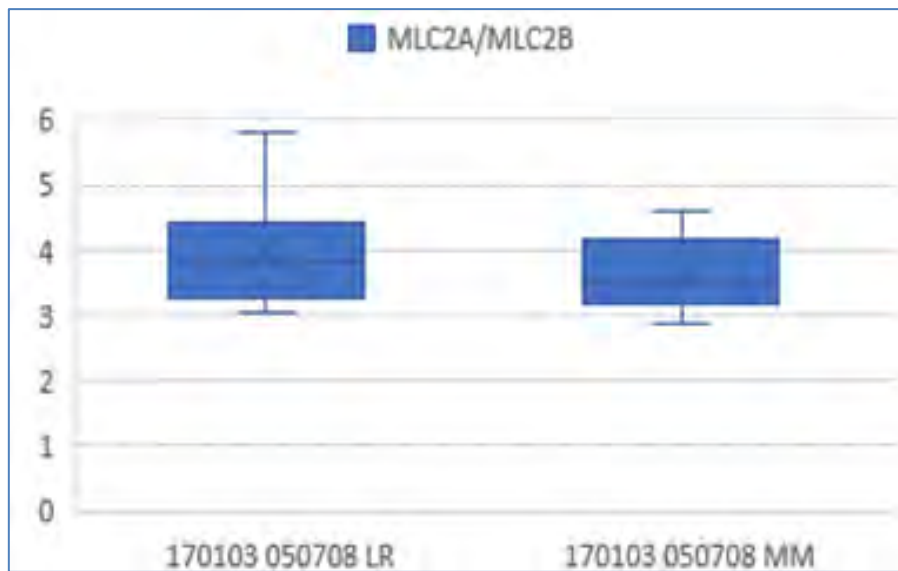
Στις Εικόνες 23-25 παρουσιάζεται η έκφραση που εμφανίζει ο λόγος των MLC2A/MLC2B, ο οποίος φαίνεται να είναι κοινός και σταθερός μεταξύ των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων στις διαφορετικές παρτίδες.



Εικόνα 23: Σχετική έκφραση του λόγου των γονιδίων MLC2A προς MLC2B στη τσιπούρα για την παρτίδα 1701030102 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM.



Εικόνα 24: Σχετική έκφραση του λόγου των γονιδίων MLC2A προς MLC2B στη τσιπούρα για την παρτίδα 1701030304 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM.



Εικόνα 25 : Σχετική έκφραση του λόγου των γονιδίων MLC2A προς MLC2B στη τσιπούρα για την παρτίδα 170103050708 και για τα αναπτυξιακά στάδια LR και MM.

#### **4.10 Στατιστική ανάλυση των επίπεδων έκφρασης**

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος μέσω του t test ανά γονίδιο και ανά παρτίδα στα δύο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια αν εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές (p value <0,05).

Παρατηρήθηκε πως η έκφραση της ισομορφής MLC2A της μυοσίνης στην παρτίδα 1701030304 εμφάνισε στατιστική σημαντικότητα σε σχέση με τις άλλες δύο παρτίδες. Η έκφραση της ισομορφής MLC2B της μυοσίνης, στις παρτίδες 1701030304 και 170103050708 ήταν στατιστικά σημαντική ενώ η έκφραση του γονιδίου της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης ήταν στατιστικά σημαντική μόνο για την παρτίδα 170103050708. Αναφορικά με την έκφραση της λεπτίνης αυτή δεν εμφάνισε στατιστικά σημαντικά αποτελέσματα σε καμία παρτίδα.

#### **4.11 Συσχετισμός της έκφρασης γονιδίων με το μήκος**

Μέσω ενός συντελεστή συσχέτισης (correlation coefficient) που προκύπτει από το πρόγραμμα excel, μελετήθηκε η συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων και του μήκους στα ιχθύδια τσιπούρας. Διαπιστώθηκε πως δεν υπήρξε υψηλή συσχέτιση της έκφρασης με το μήκος, όχι τουλάχιστον σε βαθμό που να μπορέσει να αξιολογηθεί ως στατιστικό σημαντικό αποτέλεσμα.

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αφορούσε ιχθύδια που προέρχονταν από τρεις διαφορετικές παρτίδες με αποτέλεσμα να είναι απόγονοι διαφορετικών γεννητόρων. Κατά την καταγραφή των μηκών διαπιστώθηκε πως υπήρχαν κοινά μήκη μεταξύ των διαφορετικών παρτίδων αλλά και των διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων. Τα άτομα με αυτά τα χαρακτηριστικά αποτέλεσαν τα προς εξέταση δείγματα.

Τα δύο αναπτυξιακά στάδια τα οποία μελετηθήκαν ήταν το τέλος του προνυμφικού σταδίου που συγκαταλέγεται στο δεύτερο αναπτυξιακό στάδιο της τσιπούρας καθώς και το στάδιο της μεταμόρφωσης όπου είναι το τρίτο και τελευταίο αναπτυξιακό στάδιο του ψαριού. Η θεμελιώδης διαφορά μεταξύ των παραπάνω σταδίων είναι το γεγονός ότι στο προνυμφικό στάδιο δεν υπάρχει πλήρης ανάπτυξη ενώ στο στάδιο της μεταμόρφωσης βασικά όργανα όπως τα πτερύγια, τα λέπια και διάφορα άλλα όργανα της τσιπούρας λαμβάνουν την τελική τους διαμόρφωση.

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν να ελεγχθεί εάν τα επίπεδα έκφρασης γονιδίων όπως είναι η ισομορφή A της μυοσίνης MLC2 (MLC2A), η ισομορφή B της μυοσίνης MLC2 (MLC2B), η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL-like) και η λεπτίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες αύξησης ή ανάπτυξης.

Όσον αφορά τα βασικά θέματα μελέτης τα οποία εξετάστηκαν στην συγκεκριμένη πτυχιακή ήταν τα ακόλουθα. Το πρώτο αφορούσε τον συσχετισμό και την σύγκριση μηκών σε δυο διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Το δεύτερο αφορούσε την εύρεση και την διαλογή ιδιοστατικών γονιδίων τα οποία πρέπει να εμφανίζουν χαμηλό παράγοντα γονιδιακής σταθερότητας δηλαδή να είναι αρκετά σταθερά. Τρίτο βασικό αντικείμενο μελέτης ήταν η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων, η ανάλυση στατιστικής σημαντικότητας των επιπέδων έκφρασής τους και ο συσχετισμός της έκφρασης με το μήκος σε ιχθύδια τσιπούρας πανομοιότυπου μεγέθους.

Σχετικά με την κατανομή των μηκών στα ιχθύδια προέκυψαν ορισμένες καμπύλες οι οποίες σύγκριναν μεταξύ τους δείγματα μεταξύ των ίδιων αναπτυξιακών σταδίων και διαφορετικών παρτίδων με αποτέλεσμα να παρατηρείται εμφανής αλληλεπικάλυψη στα δείγματα με κοινά μήκη. Επίσης έγινε σύγκριση δειγμάτων που προέρχονταν από τις ίδιες παρτίδες όμως και από τα δύο διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Αυτό που

παρατηρήθηκε ήταν το γεγονός πως υπήρξε αλληλεπικάλυψη σε ορισμένα δείγματα και σε ένα εύρος μηκών 9-12 mm.

Μέσω ανάλυσης συσχέτισης μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων και του μήκους στα ιχθυδία τσιπούρας δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ των δύο παραπάνω παραμέτρων. Γεγονός το οποίο θεωρείται αναμενόμενο καθώς η απόκλιση τιμών όσον αφορά το μήκος των ιχθυδίων ήταν 1.5mm λαμβάνοντας υπόψη το σχεδιασμό της μελέτης.

Σύμφωνα λοιπόν με τα αποτελέσματα της παρούσας έρευνας παρατηρούμε πως τα επίπεδα σχετικής έκφρασης για όλα τα υπό μελέτη γονίδια δεν παρουσιάζουν συστηματικά<sub>2</sub> (σε όλες τις παρτίδες) στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο αναπτυξιακών σταδίων. Πιο αναλυτικά, όσον αφορά τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου MLC2A στατιστικά σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται μόνο στην παρτίδα 1701030304, για το γονίδιο MLC2B στις παρτίδες 170103050708 και 1701030304, για το γονίδιο LPL-like στην παρτίδα 170103050708, ενώ δεν προκύπτουν στατιστικά σημαντικές διαφορές για το γονίδιο της λεπτίνης. Όσον αφορά το γονίδιο MLC2B θα μπορούσε να θεωρηθεί υποψήφιος δείκτης ανάπτυξης λόγω των διαφορών που παρατηρήθηκαν ανάμεσα στα δυο αναπτυξιακά στάδια. Περαιτέρω διερεύνηση για την χρήση του συγκεκριμένου δείκτη κρίνεται αναγκαία διότι στατιστικά σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μόνο στις δυο από τις τρεις παρτίδες υπό εξέταση. Τα επίπεδα σχετικής έκφρασης των γονιδίων MLC2A και LPL-like δεν φαίνεται να επηρεάζονται από το αναπτυξιακό στάδιο στις περισσότερες περιπτώσεις, παρόλα αυτά περαιτέρω διερεύνηση κρίνεται απαραίτητη και σε αυτήν την περίπτωση όσον αφορά την δυνατότητα χρήσης των συγκεκριμένων γονιδίων ως δείκτες αύξησης. Στην περίπτωση του γονιδίου της λεπτίνης δεν παρατηρείται διαφοροποίηση μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων και στις τρεις παρτίδες υπό εξέταση, γεγονός που το καθιστά καλό υποψήφιο ως δείκτη αύξησης. Κατά την εξέταση της διαφοροποίησης της σχετικής έκφρασης των γονιδίων MLC2A και MLC2B ανάμεσα στα δυο αναπτυξιακά στάδια όπως ειπώθηκε και παραπάνω δεν προέκυψαν ασφαλή συμπεράσματα. Όταν όμως συγκρίναμε την διαφοροποίηση του λόγου των επιπέδων έκφρασης αυτών των γονιδίων, παρατηρήσαμε ότι δεν επηρεάζεται από το αναπτυξιακό στάδιο σε καμία από τις τρεις παρτίδες. Με βάση το παραπάνω προκύπτει ότι ο λόγος της έκφρασης των



γονιδίων MLC2A και MLC2B θα μπορούσε να θεωρηθεί ένας καλός υποψήφιος δείκτης αύξησης.

Συμπερασματικά, τα επίπεδα έκφρασης της λεπτίνης και ο λόγος έκφρασης MLC2A/MLC2B δεν επηρεάζονται από το αναπτυξιακό στάδιο και ως εκ τούτου είναι καλοί δείκτες αύξησης. Αντιθέτως, η παρούσα εργασία παρέχει ενδείξεις ότι η έκφραση του MLC2B είναι υποψήφιος δείκτης ανάπτυξης, καθώς διαφοροποιείται με το αναπτυξιακό στάδιο ακόμα και σε ιχθύδια ίδιου μεγέθους.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

### Ελληνική Βιβλιογραφία

- Κεντούρη Μ., (2010α). «Εκτροφή ιχθύων-Εκκολαπτήρια», Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Κρήτη.
- Κεντούρη Μ., (2010β). «Υδατοκαλλιέργειες: Παγκόσμια πρακτική και αποδόσεις», Πανεπιστήμιο Κρήτης, Τμήμα Βιολογίας, Κρήτη.
- Κλαουδάτος Σ.Δ., (2006). Υδατοκαλλιέργειες ΙΙ, Εντατική Μέθοδος Εκτροφής Ευρύαλων Ειδών Ιχθύων, Ιχθυογεννητικοί Σταθμοί, Νέα προς Εκτροφή Είδη. Πανεπιστημιακές Παραδόσεις, Βόλος .
- Κλαουδάτος Σ., Αποστολόπουλος Ι.(1984). Μελέτη βιολογίας και αλιείας των σημαντικότερων ψαριών της λιμνοθάλασσας Μεσολογίου. Α' Πανελλήνιο Συμπόσιο Ωκεανογραφίας και Αλιείας.
- Σμοκοβίτης Αθ., (1999) Μυϊκό Σύστημα Σε :Φυσιολογία, Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη.
- Χώτος Γ.Ν, Ρογδάκης Ι.Γ, (1992). Υδατοκαλλιέργειες ευρύαλων ψαριών. Λαυράκι και τσιπούρα.Τεχνικές της αναπαραγωγής και πάχυνσης. Εκδόσεις ΙΩΝ, 446 σελ.
- Guyton, A.G., (1992). Ιατρική Φυσιολογία. Επιστημονικές Εκδόσεις «Γρηγόριος Παρισσιανός». 8<sup>η</sup> έκδοση.
- Stryer Lubert, (1997). Βιοχημεία ΙΙ, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης. 2η έκδοση. Σελ: 1016-1019.

### Ξένη Βιβλιογραφία

- Apostolopoulos J., Kladatos S. (1986). Effect of acclimatization and degree of hunger on the satiation amount in *Sparus aurata*, and satiation curve of the fish. *Thalassographica*, 9: 69-78.

Arnault F., Etienne J., Noé L., Raisonnier A., Brault D., Harney J.W., Berry M.J., Tse C., Fromental Romain C., Hamelin J., Galibert F. (1996). Human lipoprotein lipase last exon is not translated, in contrast to lower vertebrates. *Journal of Molecular Evolution* 43:109-115.

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*, 5:209–219.

Benedito-palos L., Calduch-giner J. A., Ballester-lozano G. F., Pe J. (2013) Effect of ration size on fillet fatty acid composition, phospholipid allostasis and mRNA expression patterns of lipid regulatory genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*), *British Journal of Nutrition*, 109(7): 1175–1187

Bone Q., Marshall N.B., Blaxter J.H.S (1995). Locomotion. In: *Biology of fishes*, 2<sup>nd</sup> edition, Chapman and Hall London Weinheim New York.

Bustin, S.A., Benes, V., Nolan, T., Pfaffl, M.W. (2005). Quantitative real-time RT PCR - a perspective. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34:597-601.

Cerasi, S. (2009). *Cultured Aquatic Species Information Programme – Sparus aurata*. Rome.

Christophilogiannis P. (1993). The Veterinary Approach to Seabass and Seabream. In Brown L. (editor) . *Aquaculture for Veterinarians*, pp . 379-393.

Conides A.J., Klaoudatos S.D. (1996). Effect of bottom sediment type, salinity and temperature on the dynamics of fry population of European seabass used as seed for aquaculture. *Second World Fisheries Congress 28 July -2 August, Brisbane, Australia*.

Copeland, D.L., Duff, R.J., Liu, Q., Prokop, J., Londraville, R.L. (2011). Leptin in teleost fishes: an argument for comparative study 29, *frontiers in Physiology*

FAO , (1973). *Identification des especes*. Vol 1,2.

Faustino M., Power D M. (1998). Development of osteological structures in the sea bream: vertebral column and caudal fin complex. *Journal of Fish Biology*, 52: 11-22.

Faustino M., Power D M. (1999). Development of the pectoral, pelvic, dorsal and anal fins in cultured sea bream. *Journal of Fish Biology*, 54: 1094-1110.

Garfinkel A.S., Schotz M.C. (1987). Lipoprotein lipase. In: Gotto AM (ed) *Plasma lipoproteins*. Elsevier, Amsterdam, pp 335-358.

Gauthier, G. F., Lowey, S., Benfield, P. A., Hobbs, A. W. (1982). Distribution and properties of myosin isozymes in developing avian and mammalian skeletal muscle fibres. *Journal of Cell Biology*, 92: 472–484.

Helm, M.M., Bourne, N. (2004) *Hatchery culture of bivalves: a practical manual*. FAO, Rome.

Hirayama, Y., Kobiyama, A., Ochiai, Y., and Watabe, S. (1998). Two types of mRNA encoding myosin regulatory light chain in carp fast skeletal muscle differ in their 3' noncoding regions and expression patterns following temperature acclimation. *The Journal of Experimental Biology*, 201:2815-2820.

Hill, J. A., Kiessling, A., Devlin, R. H. (2000). Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) transgenic for a growth hormone gene construct exhibit increased rates of muscle hyperplasia and detectable levels of differential gene expression. *Can. Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57: 939–950.

Izumo, S., Nadal-Ginard, B., Mahdavi, V. (1986). All members of MHC multigene family respond to thyroid hormone in a highly tissue-specific manner. *Science* 231: 597–600.

Jobling M. (1995). Body form swimming and movement through the water. In: *Environmental Biology of fishes*. Chapman and Hall. 1st edition.

Johnston, I. A, Cole, N. J., Abercromby, M. and Vieira, V. L. A. (1998). Embryonic temperature modulates muscle growth characteristics in larval and juvenile herring. *Journal of Experimental Biology*, 201: 623–646.

Kane, A., Kimmel, B. (1993). The zebrafish midblastula transition. *Development*, 119: 447-456.

Kimmel, B., Ballard, W., Kimme, R., Ullmann, B., Schilling, F. (1995) Stages of Embryonic Development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, 203: 253-310.

Schoonjans, K., Staels, B., Auwerx, J. (1996). Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *The Journal of Lipid Research*, 37(5):907-925.

Liang, X.F., Oku, H., Ogata, H.Y. (2002). The effects of feeding condition and dietary lipid level on lipoprotein lipase gene expression in liver and visceral adipose tissue of red sea bream *Pagrus major*. *Comparative Biochemistry & Physiology*, A131: 335–342.

Lindberg A., Olivecrona, G. (2002). Lipoprotein lipase from rainbow trout differs in several respects from the enzyme in mammals, *GENE*, 292:213–223.

Lowey, S. (1994). The structure of vertebrate muscle myosin. In *Myology* (ed. by A.G. Engel and C. Franzini-Armstrong), pp. 485-505. McGraw-Hill Book Co., New York.

Mascarello F., Rowleson A., Veggetti A. (1994). Hyperplasia of lateral muscle during normal growth of the sea-bream, *Sparus aurata*. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 15:189.

Mascarello F., Rowleson A., Radaelli G., Scapolo P.A., Veggetti A. (1995). Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L): I. Myosin expression and organization of fibres in lateral muscle from hatching to adult. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 16:213-222.

Matsuoka, M., Iwai, T. (1984). Development of the myotomal musculature in the red sea bream. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 50:29-35.

Moretti A. (2005) *Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream Volume 2* FAO, Rome.

Moutou, K.A., Canario, A.V.M., Mamuris, Z., Power, D.M. (2001). Molecular cloning and sequence of *Sparus aurata* skeletal myosin light chains expressed in

white muscle: developmental expression and thyroid regulation. *The Journal of Experimental Biology*, 204: 3009-3018.

Moutou, K.A., Godina, M., Georgiou, S., Gutiérrez, J., Mamuris, Z. (2009) Myosin light chain 2 in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): a molecular marker of muscle development and growth, pp. 289-292, In Hendry, C.I., Van Stappen, G., Wille, M. & Sorgeloos P. (Eds.), LARVI '09 – 5th Fish & Shellfish Larviculture Symposium, European Aquaculture Society, Special Publication No. 38, Oostende, Belgium, 2009.

Mylonas, C.C., Zohar, Y. (2011). Reproduction and broodstock management. In: Pavlidis, M.A., and Mylonas, C.C. (eds), *Sparidae: biology and aquaculture of gilthead sea bream and other species*, pp. 95–131. Blackwell Publishing, Oxford.

NRC (1993). *Nutrient Requirements of Fish*. pp. 1-116. National Research Council, National Academy Press, Washington, DC, USA.

Oku, H., Koizumi, N., Okumura, T., Kobayashi, T., Umino, T. (2006). Molecular characterization of lipoprotein lipase, hepatic lipase and pancreatic lipase genes: effects of fasting and refeeding on their gene expression in red sea bream *Pagrus major*. *Comparative Biochemistry & Physiology*, 145B, 168–178.

Patrino M., Radaelli F., Mascarello M.D., Carnevali, C. (1998). Muscle growth in response to changing demands of functions in the teleost *Sparus aurata* (L.) during development from hatching to juvenile. *Anatomy and Embryology*, 198:487-504.

Pavlidis, M., Kokokiris, L., Paspatis, M., Somarakis, S., Kentouri, M., Divanach, P. (2006). Gonadal development in hybrids of Mediterranean sparids: *Sparus aurata* (female) x *Pagrus pagrus* (male). *Aquaculture Research* 37: 302–305.

Pillay, T.V.R. (1990). Sea-basses and sea-brems. In *Aquaculture principles and practices*.

Piper, R.G., Me Elwain, I.B., Orme, L.E., Me Craren, J.P., Fowler, L.G., Leonard, J.R. (1982). *Fish Hatchery Management*. U.S. Department of the Interior Fish and the Wildlife Service, Washington, D.C. pp 348-368.

- Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT – PCR, *Nucleic Acids Research*, 29(9), 16–21.
- Pfaffl, M.W. (2004). Relative quantification. *AZ of quantitative PCR*, 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. *BMC Biotechnol*, 13, 1–13.
- Farese Jr, R.V., Yost, T.J., Eckel, R.H. (1991). Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase activity by insulin/glucose in normal-weight humans. *Metabolism.*, 40(2), 214–216.
- 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: 223–236.
- Sarropoulou, E., Power, D.M., Mamuris, Z., Moutou, K. (2006). The two isoforms of myosin light chain 2 in gilthead sea bream (*Sparus aurata*); alternative polyadenylation site selection and tissue expression. *Archiv Tierzucht / Archives Animal Breeding*, 49 (Special Issue): 92-96.
- Georgiou, S., Alami-Durante, H., Power, D.M., Sarropoulou, E., Mamuris, Z., Moutou, K.A. (2016). Transient up- and down-regulation of expression of myosin light chain 2 and myostatin mRNA mark the changes from stratified hyperplasia to muscle fiber hypertrophy in larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.). *Cell and Tissue Research*, 363: 541–554.
- Saera-Vila, A., Calduch-Giner, J.A., Gomez-Requeni, P., Medale, F., Kaushik, S., Perez-Sanchez, J. (2005). Molecular characterization of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) lipoprotein lipase. Transcriptional regulation by season and nutritional condition in skeletal muscle and fat storage tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142B, 224-232.

- Schiaffino, S., Reggiani C. (1994). Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle. *Journal of Applied Physiology*, 77: 493-501.
- Scholz, S., Fischer, S., Gundel, U., Kuster, E., Luckenbach, T., Voelker, D. (2008) The zebrafish embryo model in environmental risk assessment - Applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research*, 15: 394-404.
- Shields, R.J. (2001). Larviculture of marine fin fish in Europe. *Aquaculture* 200, 55-88.
- Sim, S. Y., Rimmer, M. A., Toledo, J.D., Sugama, K., Rumengan, I., Williams, K., Phillips, M.J. (2005). A guide to small-scale marine finfish hatchery technology. Australian Centre for International Agricultural Research, pp 312.
- Stroiber W., Haslett J.R., Sanger A.M. (1999). Myogenic patterns in teleosts: what does the present evidence really suggest? *Journal of Fish Biology*, 55: 84-99.
- Thiebaud, P., Rescan, P.Y., Barillot, W., Ralliere, C., Theze, N. (2001). Developmental program expression of myosin alkali light chain and skeletal actin genes in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Biochim Biophys Acta.*,1519: 139-142.
- UNESCO (1986). Fishes of the North-eastern Atlantic and the Mediteranean. Editors: Whitehead P.J.P., Baushot M.-L., Hureau J.-C., Nielsen J., Tortonese E., pp.702, 794-795, 883, 906.
- 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.
- Weeds, A.G., Lowey, S. (1971). Substructure of the myosin molecule II. The high chains of myosin. *Journal of Molecular Biology*, 61: 701-725.



Whalen, R. G., Sell, S. M., Butler-Browne, G. S., Schwartz, K., Bouveret, P., Pinset-Harstrom, I. (1981). Three myosin heavy chain isozymes appear sequentially in rat muscle development. *Nature*, 292: 805–809.

Yamano, K., Takano-Ohmuro, H., Obinata, T., Inui, Y. (1994). Effect of thyroid hormone on developmental transition of myosin light chain during flounder metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*, 93: 321–332.

Zhou S., Ackman R. G., Morrison C. (1996). Adipocytes and lipid distribution in the muscle tissue of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(2):326-332.

Zohar, Y. (1984). La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*): connaissance du cycle sexuel et controle de la gametogenese et de la ponte. In: Barnabe, G., and Billard, R. (eds), *L'Aquaculture du bar et des Sparides*, pp. 3–24. INRA, Paris