



## Επίδραση του διατροφικού καθεστώτος στη γονιδιακή έκφραση του λευκού μυός στην τσιπούρα (*Sparus aurata*)

### Dietary effects on the white muscle gene expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)



Κωνσταντίνα-Μαρία Περιστέρη του Ιωάννη

Λάρισα, 2021

## **Επιβλέπουσα καθηγήτρια**

Μούτου Αικατερίνη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## **Τριμελής Συμβουλευτική επιτροπή**

Μούτου Αικατερίνη,

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης,

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Σαραφίδου Θεολογία,

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών,  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

## Περίληψη

Τα προϊόντα ιχθυοκαλλιέργειας έχουν, πλέον κατακτήσει μεγάλο ποσοστό της ανθρώπινης διατροφής. Η τσιπούρα αποτελεί βασικό εκτρεφόμενο είδος ψαριού στη περιοχή της Μεσογείου και για αυτό το λόγο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, υπάρχει αυξημένη ζήτηση εύρεσης μεθόδων ελέγχου της ποιότητας και της ανάπτυξης αυτού του είδους σε όλα τα στάδια παραγωγής του. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητη η γνώση εκείνων των μηχανισμών ανάπτυξης του ψαριού που σχετίζονται με την αύξηση των μυών, με στόχο τη βελτιστοποίηση του παραγόμενου προϊόντος αναφορικά με τη διατροφική του αξία και την μείωση του κόστους παραγωγής.

Τα τελευταία χρόνια, οι φυτικές ιχθυοτροφές χρησιμοποιούνται ως υποκατάστατα προκειμένου να μειωθεί η χρήση των ιχθυάλευρων καθώς αποτελούν πιο οικονομικές και περιβαλλοντικά φιλικότερες ιχθυοτροφές. Ωστόσο, οι φυτικές πρώτες ύλες περιέχουν σημαντικό ποσοστό αντιδιατροφικών παραγόντων που οδηγούν σε μειωμένο ρυθμό αύξησης και υποβαθμισμένη μετατρεψιμότητα τροφής. Για το λόγο αυτό, απαιτείται η επιλογή ιχθύων που θα αξιοποιούν αποτελεσματικότερα ιχθυοτροφές που έχουν φυτική σύσταση πράγμα που αποτελεί τον βασικό στόχο ενός ευρύτερου πειραματικού προγράμματος.

Στο πλαίσιο του ανωτέρου πειράματος, σκοπός της παρούσας ερευνητικής εργασίας είναι το να εξετασθεί αν τα επίπεδα έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων στο λευκό μυ της τσιπούρας επηρεάζονται από το γενετικό υπόβαθρο των ιχθύων, τη διατροφή τους ή και τα δύο σε αλληλεπίδραση. Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δέκα οικογένειες τσιπούρας με διαφορετικά γενετικά υπόβαθρα στις οποίες χορηγήθηκαν δύο διαφορετικές τροφές, μία πλούσια σε φυτικές πρώτες ύλες (plant) και μία εμπορική τροφή (control). Στη συνέχεια, μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας με ικανότητα φωσφορυλίωσης του ταχέως μυός της μουσίνης τύπου A (MYLPF A) και τύπου B (MYLPF B), του γονιδίου της μουστατίνης 1 (MSTN1), της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL) και της ορμονοευαίσθητης λιπάσης (HSL) στο λευκό μυ της τσιπούρας (*Sparus aurata*). Ακολούθησε έλεγχος συσχέτισης μεταξύ των υπό μελέτη γονιδίων. Η ανάλυση συσχέτισης μπορεί να αποκαλύψει πιθανούς κοινούς μηχανισμούς ρύθμισης της έκφρασης γονιδίων και αν αυτή η κοινή ρύθμιση εξαρτάται από τις παραμέτρους του πειράματος, δηλαδή την οικογένεια και την τροφή.

Τα αποτελέσματα της μέτρησης των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων έδειξαν ότι η επίδραση τόσο της τροφής όσο και του γενετικού υποβάθρου ήταν στατιστικώς σημαντική στη μεταγραφή του γονιδίου MYLPF B. Επίσης, για την ομάδα plant παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές έκφρασης σε σύγκριση με την ομάδα control, αποτέλεσμα που μας κατευθύνει στο ότι πιθανώς τα φυτικά υποκατάστατα των ιχθυοτροφών οδηγούν σε αύξηση της υπερτροφίας καθώς το γονίδιο MYLPF B επάγει την υπερτροφία δηλαδή την αύξηση της ολικής μάζας του μυός.

Αντιθέτως, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου MYLPF A δεν επηρεάστηκαν από την τροφή αλλά από το γενετικό υπόβαθρο καθώς παρουσιάστηκαν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στις οικογένειες που εμφανίζουν μικρή παραλλακτικότητα σε σχέσεις με τις οικογένειες που εμφανίζουν μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των μελών τους ως προς το μέγεθος και την ανάπτυξη των ιχθύων. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με την έκφραση του γονιδίου MYLPF B, πράγμα που υποδεικνύει ότι η έκφραση των δύο αυτών γονιδίων της μουσίνης και ακολούθως η ρύθμιση της υπερτροφίας και της υπερπλασίας, διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν αυτά τα δύο γονίδια, επηρεάζονται κυρίως από το γονιδιακό υπόβαθρο του κάθε οργανισμού.

Στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μουστατίνη (MSTN), λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) και ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL) δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση ούτε από την τροφή ούτε από το γενετικό υπόβαθρο. Αυτό υποδεικνύει ότι η μερικώς διαφορετικής σύστασης ιχθυοτροφή δεν επηρέασε σε σημαντικό

βαθμό την έκφρασή τους και κατ' επέκταση τη λειτουργία τους. Επίσης, και στα πέντε υπό μελέτη γονίδια δεν παρουσιάστηκε στατιστική σημαντική επίδραση της αλληλεπίδρασης της τροφής με το γενετικό υπόβαθρο. Έτσι, από τα παραπάνω προκύπτει ότι η μερική χρήση φυτικών υποκατάστατων στις ιχθυοτροφές δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων.

Από τον έλεγχο συσχέτισης προέκυψε ότι τα υπό μελέτη γονίδια που εκφράζονται στο λευκό μυ παρουσιάζουν κάποια κοινά πρότυπα έκφρασης για την εναρμονισμένη δράση τους και την εύρυθμη λειτουργία του ιστού. Συγκεκριμένα, μεγαλύτερη συσχέτιση παρουσιάστηκε μεταξύ του γονιδίου της MSTN και του γονιδίου της HSL. Πιο αναλυτικά, στις οικογένειες με την μικρή παραλλακτικότητα εμφανίζεται αρνητική συσχέτιση μεταξύ αυτών των γονιδίων, ενώ στις οικογένειες με μεγάλη παραλλακτικότητα παρουσιάζεται μια ισχυρά θετική συσχέτιση. Αυτό αποκαλύπτει ότι στα πρότυπα έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων στο λευκό μυ το γενετικό υπόβαθρο επιδρά πολύ περισσότερο σε σύγκριση με το διατροφικό καθεστώς.

## Abstract

Aquaculture products have now taken over a large proportion of the human diet. Gilthead sea bream is a basic farmed species in the Mediterranean region and for this reason is of great interest. In particular, there is an increased demand for methods concerning quality control and the development of this species at all stages of its production. For this reason, it is necessary to know those mechanisms of fish growth related to muscle growth, in order to optimize the product in terms of its nutritional value and reduce production costs.

In recent years, plant-based fish food has been used as a substitute to reduce the use of fishmeal as it is a more economical and environmentally friendly fish food. However, plant raw materials contain a significant percentage of anti-nutritional agents that lead to reduced growth rate and low food convertibility. For this reason, it is necessary to select fish that will make more efficient use of plant-based fish food, which is the main goal of a wide net experiment.

The aim of the present research is to examine whether the expression levels of specific genes in white muscle of the gilthead sea bream are influenced by the genetic background of the fish, their diet or both. The experiment used ten families of gilthead sea bream with different genetic backgrounds which were given two different foods, one rich in plant raw materials (plant) and one commercial food (control). Next, the expression levels of light chain of myosin genes of fast muscle type A (MYLPF A) and type B (MYLPF B) with the ability to be phosphorylated, myostatin 1 (MSTN1) gene, lipoprotein lipase (LPL) and hormone-sensitive lipase (HSL) in the white muscle of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) were studied. At the end, a correlation test between the genes under study took place. Correlation analysis can reveal possible common mechanisms of regulation of gene expression and whether this common regulation depends on the parameters of the experiment, namely family and food.

The results of measuring the expression levels of the genes under study showed that the effect of both food and genetic background was statistically significant on the transcription of the MYLPF B gene. Also, for the

“plant” group, higher expression values were observed compared to the “control” group, a result that leads us to the explanation that the plant substitutes of fish food probably lead to an increased hypertrophy as the MYLPF B gene induces hypertrophy, so to an increased total muscle mass.

In contrast, expression levels of the MYLPF A gene were influenced by genetic background but not by food as different levels of expression occurred in families showing low weight variability compared to families showing high weight variability between their members in size and development of fish. The same was observed about the expression of the MYLPF B gene, which indicates that the expression of these two myosin genes and subsequently the regulation of hypertrophy and hyperplasia, processes in which these two genes are involved, are mainly influenced by the genetic background of each organization.

Expression levels of the myostatin (MSTN), lipoprotein lipase (LPL) and hormone-sensitive lipase (HSL) genes seemed not to be statistically significant affected by either food or by genetic background. This indicates that the partially plant-based fish food did not significantly affect their expression and consequently their function. Also, all five genes under study did not show a statistically significant affection by the interaction between diet and genetic background. Thus, it follows from the above that the partial use of plant substitutes in fish food does not seem to significantly affect the expression of these genes.

The correlation test showed that the genes under study which are expressed in white muscle follow some common expression patterns in order to have harmonized action and for the proper function of the tissue. In particular, there was a greater correlation between the MSTN gene and the HSL gene. More specifically, in families with low weight variability there is a negative correlation between these genes, while in families with high weight variability there is a strong positive correlation. This reveals that concerning the expression patterns of the above genes of gilthead sea bream’s white muscle the genetic background is much more influential compared to the diet.

## Περιεχόμενα

|   |    |
|---|----|
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....  | 8  |
| 1. Συστηματική Ταξινόμηση .....   | 8  |
| 2. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά .....   | 8  |
| 3. Γεωγραφική Κατανομή & Ενδιαίτημα .....   | 9  |
| 4. Βιολογικός Κύκλος & Αναπαραγωγή .....  | 9  |
| 5. Διατροφή .....   | 11 |
| 6. Η εκτροφή της τσιπούρας .....  | 11 |
| 7. Συστήματα Εκτροφής Τσιπούρας .....   | 12 |
| 7.1 Εκτατικά συστήματα .....  | 12 |
| 7.2 Ημι-εντατικά συστήματα .....  | 13 |
| 7.3 Εντατικά συστήματα .....  | 13 |
| 8. Σκελετικός μυς στο <i>Sparus aurata</i> : Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά .....  | 15 |
| 8.1 Ρύθμιση υπερτροφίας και υπερπλασίας .....   | 16 |
| 8.2 Στάδια Μυογένεσης στο <i>Sparus aurata</i> .....  | 17 |
| 8.3 Γονίδια υπό μελέτη που εκφράζονται στο λευκό μυ .....   | 20 |
| 8.3.1 Ελαφριές αλυσίδες της μυοσίνης με ικανότητα φωσφορυλίωσης στους ταχείς σκελετικούς μύες τύπου Α και Β (MYLPF Α & MYLPF Β) ..... | 20 |
| 8.3.2 Λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) .....   | 21 |
| 8.3.3 Ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL) .....  | 22 |
| 8.3.4 Μυοστατίνη 1 (MSTN1) .....  | 23 |
| ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ .....  | 25 |
| Σκοπός Εργασίας .....   | 26 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ .....  | 27 |
| 1. Δειγματοληψία ιχθύων και διατροφικές πληροφορίες .....   | 27 |
| 2. Υλικά και Μέθοδοι .....  | 29 |
| 2.1 Απομόνωση του RNA .....   | 29 |
| 2.2 Πέψη με DNάση .....   | 31 |
| 2.3 Σύνθεση cDNA .....  | 31 |
| 2.4 Στάδια σύνθεσης cDNA .....  | 33 |
| 3. Real-Time PCR ή qPCR (quantitative PCR) .....  | 34 |
| 3.1 Αρχή της μεθόδου .....  | 34 |
| 3.2 Καμπύλη Ενίσχυσης (amplification plot) .....  | 35 |
| 3.3 Καμπύλη Τήξης (Melting Curve) .....   | 37 |
| 3.4 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης και απόδοση .....   | 38 |
| 3.5 Απόλυτη και Σχετική ποσοτικοποίηση .....  | 39 |

|   |    |
|---|----|
| 4. Προσδιορισμός των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης .....       | 39 |
| 4.1 Αλληλουχίες εκκινητών γονιδίων .....                      | 40 |
| 4.2 Απόδοση (Efficiency) .....                                | 40 |
| 4.3 Προετοιμασία αντίδρασης για τα πειραματικά δείγματα ..... | 41 |
| 4.4 Ανάλυση δεδομένων και κανονικοποίηση .....                | 43 |
| 4.5 Στατιστική ανάλυση .....                                  | 44 |
| ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....                                | 45 |
| 1. MYLPF B .....  | 45 |
| 2. HSL (Ορμονοευαίσθητη λιπάση) .....                         | 47 |
| 3. MYLPF A .....  | 49 |
| 4. MSTN1 (Μυοστατίνη) .....                                   | 51 |
| 5. LPL (Λιποπρωτεϊνική λιπάση) .....                          | 53 |
| 6. Πειραματικά συμπεράσματα .....                             | 54 |
| ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....  | 55 |
| ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....  | 60 |

## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1. Συστηματική Ταξινόμηση

Η τσιπούρα από ζωολογική άποψη έχει την ακόλουθη θέση στο σύστημα ταξινόμησης (Linnaeus 1758):

|                   |                      |
|-------------------|----------------------|
| <b>Φύλο</b>       | Χορδωτά              |
| <b>Υποφύλο</b>    | Σπονδυλωτά           |
| <b>Υπερκλάση</b>  | Γναθοστόματα         |
| <b>Κλάση</b>      | Οστεϊχθείς           |
| <b>Υποκλάση</b>   | Ακτινοπτερύγιοι      |
| <b>Μεσοκλάση</b>  | Τελεόστεοι           |
| <b>Υπέρταξη</b>   | Ακανθοπτερύγιοι      |
| <b>Τάξη</b>       | Περκόμορφοι          |
| <b>Υποτάξη</b>    | Περκοειδή            |
| <b>Οικογένεια</b> | Σπαρίδες             |
| <b>Γένος</b>      | <i>Sparus</i>        |
| <b>Είδος</b>      | <i>Sparus aurata</i> |

Η πρώτη προσπάθεια συστηματικής ταξινόμησης της τσιπούρας έγινε από τον Linnaeus το 1758, ο οποίος της έδωσε και τη σημερινή επιστημονική της ονομασία. Την ίδια ονομασία χρησιμοποίησε και ο Fowler μεταγενέστερα στη δική του συστηματική ταξινόμηση το 1936 (*Sparus aurata*). Συνήθη συνώνυμα είναι: *Chrysophrys aurata* [Linnaeus, 1758, Valenciennes, 1830], *Chrysophrys crassirostris* [Valenciennes, 1830], *Pagrus auratus*, ενώ κοινά ξενόγλωσσα ονόματα του ιχθύος είναι: Gilthead sea bream στην Αγγλική γλώσσα, *Dorade royale* στη Γαλλική και *Pargo dorado* στην Ισπανική (Βασιλειάδου, 2002, Τζήκας, 2007).

### 2. Μορφολογικά Χαρακτηριστικά

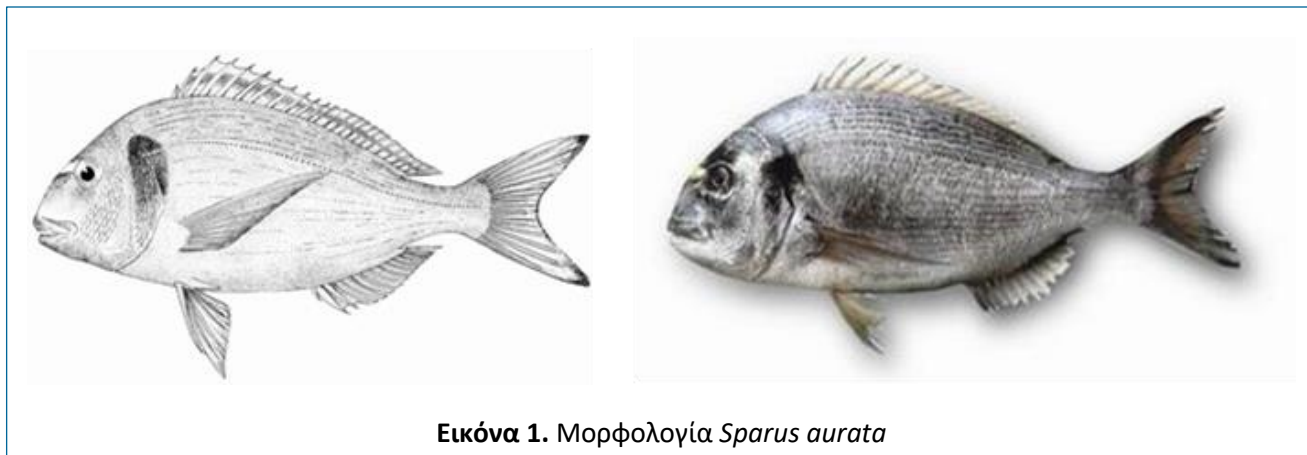
Η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και τα υπόλοιπα είδη της οικογένειας Sparidae σχηματίζουν από μορφολογική άποψη ένα αρκετά ομοιογενές σύνολο ειδών που χαρακτηρίζεται από ένα υψηλό και συμπιεσμένο πλευρικό σώμα, μεγάλα κτενοειδή λέπια, ένα ραχιαίο πτερύγιο που εν μέρει είναι ακανθώδες και ένα διχαλωτό ουραίο πτερύγιο (Χώτος, 2010). Τα θωρακικά πτερύγια είναι μακριά και οξύληκτα. Τα κοιλιακά πτερύγια βρίσκονται κάτω ή ακριβώς πίσω από τις βάσεις των θωρακικών, με μια ακανθώδη και πέντε μαλακές ακτίνες. Το εδρικό πτερύγιο έχει τρεις ακανθώδεις και 11 ή 12 μαλακές ακτίνες. Υπάρχει ένα διχαλωτό ουραίο πτερύγιο. Οι παρειές φέρουν λέπια, σε αντίθεση με το βραγχιακό προεπικάλυμμα. Τα κοιλιακά της πτερύγια έχουν μία σκληρή και πέντε μαλακές ακτίνες ενώ το εδρικό τρεις σκληρές και δώδεκα μαλακές. Ο αριθμός των λεπιών κατά μήκος της πλευρικής γραμμής είναι 73 έως 85. Το στόμα της είναι ελαφρώς προεκτεινόμενο και τα δόντια της ανόμοια, προσαρμοσμένα για σαρκοφαγία (Εικόνα 1). Γενικότερα οι τσιπούρες διαθέτουν πολυάριθμα μυτερά δόντια και στις δύο γνάθους και πολυάριθμες σειρές χοντρών τραπεζιτών κάτι που διευκολύνει την σύνθλιψη των οστράκων. Επιπλέον το έντερο τους, ευθύ και κοντό, είναι ανθεκτικό στα σχισίματα που προκαλούνται από τα κελύφη (FAO, 2006).

Το χρώμα του σώματος είναι ασημογάλαζο στην κορυφή της ράχης με ασημί, γαλάζιες και γκρι αποχρώσεις στα πλευρά. Μια μεγάλη μαύρη κηλίδα παρατηρείται στο ύψος της πλευρικής γραμμής και εκτείνεται στο άνω όριο του βραγχιακού επικαλύμματος, κάτω από την οποία γειτνιάζει με μια μικρή ερυθρή περιοχή. Ανάμεσα στους οφθαλμούς υπάρχει ένας χρυσοκίτρινος χρωματισμός, ο οποίος συνορεύει με δύο περιοχές



σκούρου χρώματος (δεν διακρίνονται καλά σε νεαρά άτομα). Το ραχιαίο πτερύγιο έχει μια μαύρη γραμμή (FAO, 2006).

Το μέγεθός της είναι συνήθως 30-40 cm στα ενήλικα άτομα. Παρόλα αυτά, έχει παρατηρηθεί άτομο με μήκος 76 cm (Γαλλία 2000, Florn Estuary, Brest). Αν και το μέγιστο βάρος ψαριού που έχει δημοσιευτεί για το είδος είναι τα 17,2kg, συνήθως το βάρος του κυμαίνεται γύρω στα 400 - 600 g (Βασιλειάδου, 2002).



Εικόνα 1. Μορφολογία *Sparus aurata*

### 3. Γεωγραφική Κατανομή & Ενδιαίτημα

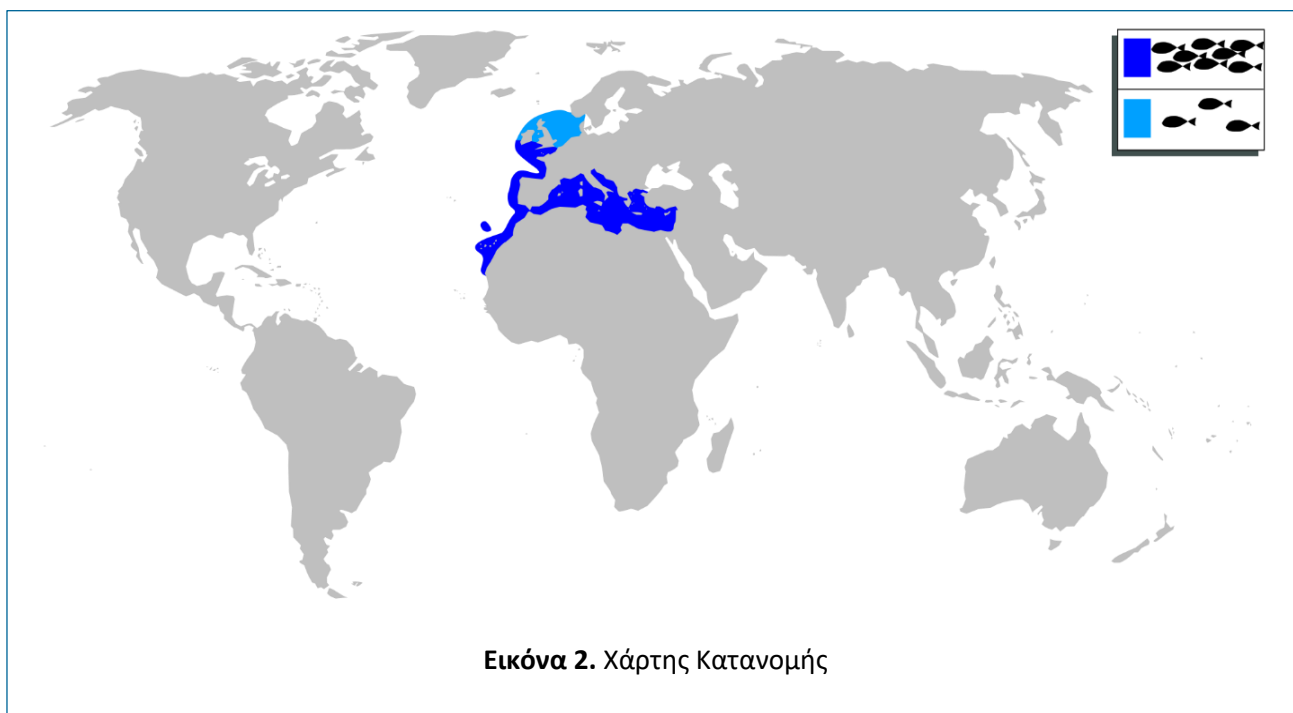
Η τσιπούρα είναι είδος κοινό στη Μεσόγειο Θάλασσα, ενώ εξαπλώνεται και κατά μήκος των ανατολικών ακτών του Ατλαντικού, από τη Μεγάλη Βρετανία έως τη Σενεγάλη, και πιο σπάνια στη Μαύρη Θάλασσα (Εικόνα 2, FAO, 2006). Εξαιτίας του ότι είναι είδος ευρύαλο και ευρύθερμο εντοπίζεται τόσο σε θαλάσσια όσο και σε υφάλμυρα περιβάλλοντα, όπως οι παράκτιες λιμνοθάλασσες και οι εκβολές των ποταμών, ιδίως κατά τα αρχικά στάδια του κύκλου ζωής της. Η αναπαραγωγή συντελείται στην ανοικτή θάλασσα από το φθινόπωρο έως τις αρχές του χειμώνα, ενώ τα νεαρά άτομα συνήθως μεταναστεύουν στις αρχές της άνοιξης προς προστατευόμενα παράκτια ύδατα, όπου μπορούν να βρουν άφθονη τροφή και ηπιότερες συνθήκες θερμοκρασίας. Επειδή στο στάδιο αυτό τα άτομα είναι αρκετά ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες (κατώτατο θανατηφόρο όριο οι 4°C), στα τέλη του φθινοπώρου επιστρέφουν στην ανοιχτή θάλασσα, στην περιοχή όπου βρίσκεται ο ενήλικος πληθυσμός (Κάπελος, 2011).

Στην ανοικτή θάλασσα, η τσιπούρα βρίσκεται συνήθως σε βραχώδεις περιοχές και σε λειμώνες ποσειδωνίας (*Posidonia oceanica*), ενώ συχνά εντοπίζεται και σε αμμώδεις πυθμένες. Τα νεαρά άτομα παραμένουν σε σχετικά ρηχά νερά (έως 30 m), ενώ τα ενήλικα μπορούν να φτάσουν και σε μεγαλύτερα βάθη, που γενικά δεν ξεπερνούν τα 150 m. Η τσιπούρα σχηματίζει κοπάδια πολυμελή ή ολιγομελή, ενώ κάποιες φορές μεγάλα θηλυκά άτομα μπορεί να βρεθούν να κυνηγούν μόνα τους για μια περίοδο (FAO, 2006).

### 4. Βιολογικός Κύκλος & Αναπαραγωγή

Στην τσιπούρα έχει αποδειχθεί η ύπαρξη ενός πρωτανδρικού ερμαφροδιτισμού. Σύμφωνα με αυτόν, όλος ο πληθυσμός μέχρι το τέλος του 2ου έτους λειτουργεί σαν ένα σύνολο αρσενικών ατόμων. Από το τέλος του 2ου και αρχή του 3ου έτους, λαμβάνει χώρα αλλαγή φύλου και αρχίζουν να εμφανίζονται θηλυκά άτομα. Παρόλα αυτά, η αναστροφή φύλου δε φαίνεται να επηρεάζει το σύνολο των ατόμων, αφού μερικά από αυτά παραμένουν αρσενικά σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους. Για τους παράγοντες που καθορίζουν αυτή την

αντιστροφή δεν υπάρχουν σαφείς ενδείξεις. Υποστηρίζεται ότι, εκτός από την ηλικία, είναι πιθανόν το βάρος των ψαριών και η διατροφή τους να επηρεάζει αυτό το φαινόμενο (Χώτος, 2010). Γενικά τα άτομα με μήκη μικρότερα των 25 cm και βάρη μικρότερα των 250 g είναι αρσενικά ενώ άτομα με μήκη πάνω από 35 cm και βάρη πάνω από 350 g είναι θηλυκά. Παρόλα αυτά κάποια άτομα παραμένουν αρσενικά για όλη τους τη ζωή. Σε αυτές τις περιπτώσεις ο λόγος της μη αναστροφής του φύλου είναι η διατήρηση της αναλογίας των φύλων που είναι απαραίτητη για τη παραγωγή απογόνων και τη διαίωσιση του είδους (Κλαουδάτος, 2012). Σε συνθήκες αιχμαλωσίας η αναστροφή του φύλου εξαρτάται από κοινωνικούς και ορμονικούς παράγοντες.



Εικόνα 2. Χάρτης Κατανομής

Η αναπαραγωγική περίοδος εκδηλώνεται από τον Οκτώβριο έως και τον Δεκέμβριο σε νερά ανοιχτής θαλάσσης στα οποία κατευθύνεται εγκαταλείποντας συνήθως τις ημίκλειστες υδατοσυλλογές των λιμνοθαλασσών στις οποίες τα άτομα των νέων πληθυσμών επιστρέφουν κατά τη περίοδο της άνοιξης. Ένα θηλυκό μπορεί να γεννάει 20.000-80.000 αυγά καθημερινά κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου. Η περίοδος εκκόλαψης των αυγών διαρκεί 5 ώρες έως 2 ημέρες σε νερό θερμοκρασίας 15-20°C, ενώ η περίοδος και ατελών ιχθυδίων από περίπου 43 έως 50 ημέρες (Παπουτσόγλου, 2008). Τα προνυμφικά στάδια διαρκούν περίπου 50 ημέρες σε θερμοκρασία 17,5°C ή περίπου 43 ημέρες σε θερμοκρασία 20°C. Το μέγεθος των αυγών είναι 0,9-1,1 mm, ενώ το μέγεθος των προνυμφικών σταδίων κατά την εκκόλαψη είναι 2,5-3,0 mm. Από το αυγό θα εκκολαφθεί η προνύμφη η οποία τρέφεται από το περιεχόμενο του λεκιθικού της σάκου. Στη συνέχεια θα εξελιχθούν σε νύμφες και θα προσλαμβάνουν τροφή για να αναπτυχθούν κατά τη μεταμόρφωση σε ιχθύδια (Κλαουδάτος, 2012). Ο γόνος που θα προκύψει, θα κολυπήσει στα ρηχά νερά, εκεί που μπορεί να βρει μεγαλύτερη ασφάλεια και αφθονία τροφής, όπου και θα μείνει μέχρι τον επόμενο Οκτώβριο. Μετά θα ενσωματωθεί στο αρχικό κοπάδι, θα λαμβάνει μέρος στην αναπαραγωγή και θα το ακολουθεί στις μετακινήσεις του. Κάτι αξιοσημείωτο για την τσιπούρα είναι ότι ενώ μπορεί να είναι σε διαδικασία αλλαγής φύλου από αρσενικό σε θηλυκό, μπορεί να τη διακόψει, και να ξαναπαράγει σπέρμα για την ερχόμενη αναπαραγωγική περίοδο (Κλαουδάτος, 2012).

## 5. Διατροφή

Η τσιπούρα είναι ψάρι κυρίως σαρκοφάγο και σπάνια φυτοφάγο. Στο φυσικό περιβάλλον τρέφεται κυρίως με οστρακόδερμα (μύδια, στρείδια, κυδώνια), δίθουρα, γαστερόποδα, καρκινοειδή εχινόδερμα, πολύχαιτους και τελεόστεους. Η τροφή της ποικίλει ανάλογα το μέγεθος του ψαριού και τη διαθεσιμότητα της. Η τσιπούρα δεν είναι εκλεκτική στη διατροφή της και όταν ένα είδος τροφής σπανίζει στρέφεται σε εναλλακτικές πηγές τροφής. Έχει παρατηρηθεί ότι τα άτομα μικρότερου μεγέθους καταναλώνουν μικρούς και με μαλακή σάρκα οργανισμούς όπως πολύχαιτους και μικρά καρκινοειδή. Καθώς η τσιπούρα αυξάνει σε μέγεθος αρχίζει να διατρέφεται με μεγαλύτερα και με πιο σκληρό κέλυφος ζώα (Κάπελος, 2011).

Σε συνθήκες υδατοκαλλιέργειας εκτός από ζωντανή τροφή στα ψάρια δίδεται και σύνθετη τροφή, αδρανής, βιομηχανοποιημένη ιχθυοτροφή που περιέχει θρεπτικά συστατικά απαραίτητα για το ψάρι (πρωτεΐνες, αμινοξέα, λιπαρά, βιταμίνες, ιχνοστοιχεία). Η σύνθετη τροφή δίδεται υπό τη μορφή συμπύκτων τα οποία προέρχονται από ανάμειξη ιχθυαλεύρων, ιχθυελαίου, σόγιας, αλευριού και ανόργανων συστατικών (FAO 2006). Τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια να αντικατασταθεί η ζωντανή τροφή από τη σύνθετη (ιχθυοτροφή) καθώς η δεύτερη είναι λιγότερο δαπανηρή και πλουσιότερη σε θρεπτική και ενεργειακή αξία. Επιπρόσθετα, τα τροχόζωα, λόγω της ικανότητας τους να διηθούν το νερό, υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να γίνουν φορείς παθογόνων μικροοργανισμών και να μεταδώσουν ασθένειες στα ψάρια ([www.fishportal.gr](http://www.fishportal.gr)).

## 6. Η εκτροφή της τσιπούρας

Η θαλασσοκαλλιέργεια, όπου η τσιπούρα κατέχει εξέχουσα θέση, είναι ο κύριος εξαγωγικός κλάδος της χώρας μας, με αξία της τάξης των 500 εκατομμυρίων ευρώ (Γκάνιας, 2015). Μέχρι τις αρχές της δεκαετίας του 1980, οπότε και αναπτύχθηκαν τα εντατικά συστήματα εκτροφής της, η τσιπούρα, όχι μόνο στην Ελλάδα αλλά και στην υπόλοιπη Ευρώπη, καλλιεργούνταν με παραδοσιακό τρόπο σε εκτατικά συστήματα καλλιέργειας, όπως οι παράκτιες λιμνοθάλασσες και υδατοσυλλογές με θαλασσινό νερό. Τα παραδοσιακά ελληνικά διβάρια, η ιταλική *vallicoltura* ή το αιγυπτιακό *hosha* αποτελούν περιπτώσεις εκτατικών συστημάτων εκτροφής ψαριών που λειτουργούν ως φυσικές παγίδες, εκμεταλλευόμενα τις διατροφικές μεταναστεύσεις των νεαρών ατόμων από τη θάλασσα προς τις παράκτιες λιμνοθάλασσες. Η τσιπούρα είναι είδος πολύ κατάλληλο για εκτατική υδατοκαλλιέργεια στη Μεσόγειο, λόγω των καλών αγοραστικών της τιμών, των υψηλών ποσοστών επιβίωσης, αλλά και των διατροφικών της συνηθειών αφού βρίσκεται σχετικά χαμηλά στην τροφική αλυσίδα (FAO, 2006).

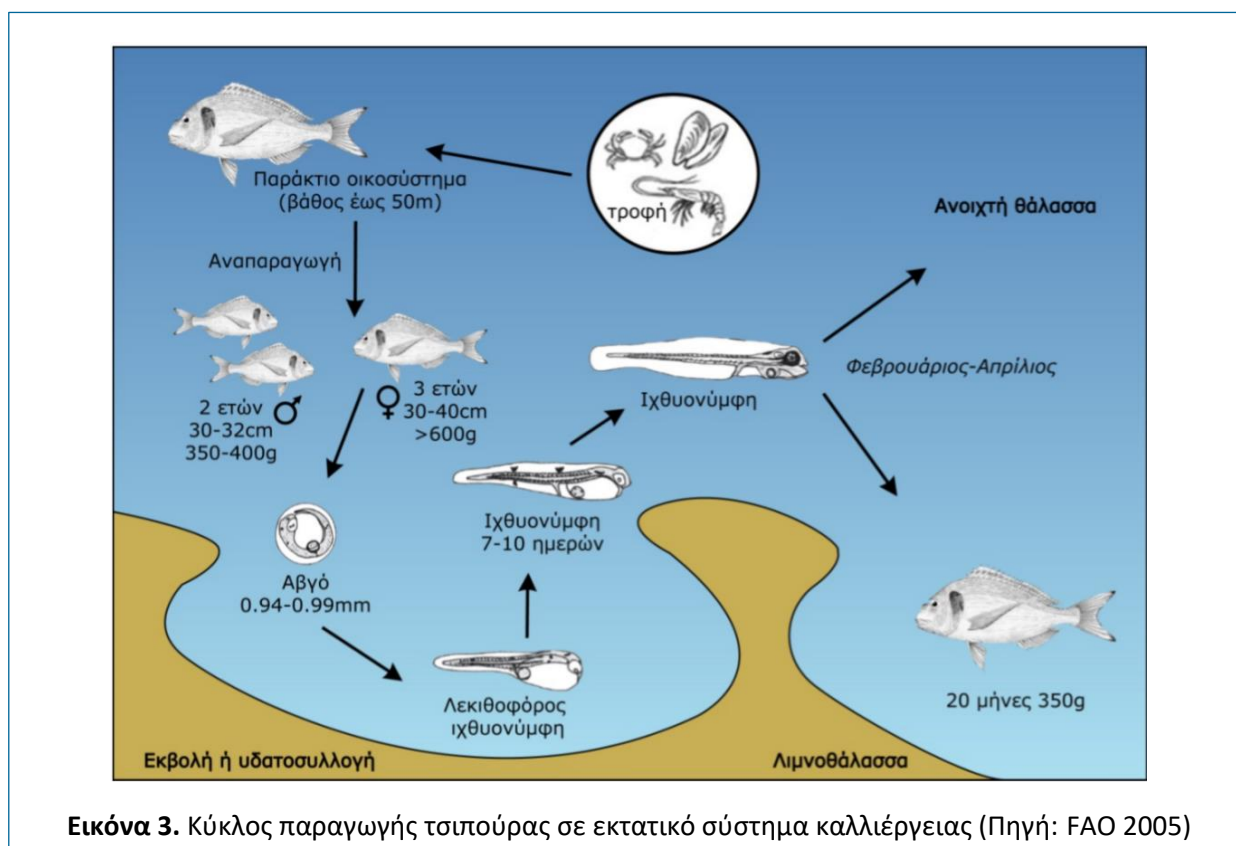
Η τεχνητή αναπαραγωγή της τσιπούρας έγινε για πρώτη φορά με επιτυχία στην Ιταλία το 1981-1982 και η μεγάλης κλίμακας παραγωγή ιχθυδίων τσιπούρας επιτεύχθηκε οριστικά το 1988-1989 στην Ισπανία, την Ιταλία και την Ελλάδα. Η παραγωγή από εκκολαπτήρια και μονάδες αύξησης του ψαριού αυτού είναι μια από τις ιστορίες επιτυχίας του κλάδου των υδατοκαλλιεργειών. Το είδος αυτό έδειξε πολύ γρήγορα μεγάλη προσαρμοστικότητα σε συνθήκες εντατικής εκτροφής, τόσο σε υδατοσυλλογές όσο και σε ιχθυοκλωβούς, και η ετήσια παραγωγή του παρουσίαζε σταθερή αύξηση μέχρι και το 2016, που έχουμε τα τελευταία στοιχεία από τον τη Federation of European Aquaculture Producers (FEAP), οπότε η παραγωγή του έφτασε τους 185.980 τόνους (FEAP, 2016).

## 7. Συστήματα Εκτροφής Τσιπούρας

Η τσιπούρα σήμερα εκτρέφεται με διάφορους τρόπους: (α) με εκτατικές και ημι-εντατικές μεθόδους, σε παράκτιες λίμνες και λιμνοθάλασσες, (β) σε εντατικά συστήματα εκτροφής, είτε σε χερσαίες εγκαταστάσεις ή σε θαλάσσιους κλωβούς. Οι μέθοδοι αυτές είναι αρκετά διαφορετικές, ιδίως όσον αφορά τις ιχθυοφορτίσεις και τη χορήγηση της τροφής (FAO, 2006).

### 7.1 Εκτατικά συστήματα

Τα συστήματα αυτά, (όπως παρουσιάζονται στην Εικόνα 3) βασίζονται στην αλίευση των ευρύαλων ψαριών, κατά τη φυσική τους μετανάστευση, και συνήθως στηρίζονται σε παραδοσιακές ιχθυοσυλληπτικές μεθόδους, όπως οι ιχθυοπαγίδες (π.χ. διβάρια). Δεδομένου ότι η παραδοσιακή αυτή πρακτική βασίζεται στην απρόβλεπτη και συχνά περιορισμένη παραγωγή ιχθυδίων στη φύση (γνωστή και ως στρατολόγηση), σε πολλά σύγχρονα εμπορικά συστήματα εκτατικής παραγωγής λαμβάνουν χώρα και εμπλουτισμοί με επιπλέον ιχθύδια που προέρχονται από εκκολαπτήρια ή από άλλες περιοχές. Συνήθως, ο εμπλουτισμός της λιμνοθάλασσας λαμβάνει χώρα κατά τον Απρίλιο-Μάιο με άτομα βάρους 2-3 g. Στα συστήματα αυτά, η τσιπούρα φτάνει το πρώτο εμπορικό μέγεθος (350 g) σε 20 μήνες και συνήθως εκτρέφεται μαζί με κέφαλους, χέλια και λαβράκια. Στις λιμνοθάλασσες της βόρειας Μεσογείου, για την προστασία και τη διατήρησή τους, τα νεαρά άτομα ηλικίας έως 1 έτους είναι απαραίτητο να διαχειμάζουν σε βαθιές λεκάνες, με διαστρωματώσεις γλυκού και θαλασσινού νερού (FAO, 2006). Η συνολική παραγωγή αυτού του τύπου πολυκαλλιέργειας κυμαίνεται από 30 έως 150 kg ανά εκτάριο (10.000 m<sup>2</sup>) ανά έτος, ανάλογα με την παραγωγικότητα της λιμνοθάλασσας. Κατά τη διάρκεια του κύκλου παραγωγής, τα ψάρια τρέφονται εξ ολοκλήρου με φυσικούς πόρους από τη λιμνοθάλασσα, καθώς δεν προβλέπεται συμπληρωματική χορήγηση τροφής. Στην εκτατική ιχθυοκαλλιέργεια, η πυκνότητα των ψαριών γενικά δεν υπερβαίνει τα 25 kg/m<sup>3</sup> νερού (FAO, 2006).



## 7.2 Ημι-εντατικά συστήματα

Στα συστήματα αυτά, ο ανθρώπινος έλεγχος του περιβάλλοντος της καλλιέργειας είναι μεγαλύτερος από ότι στα εκτατικά. Όπως και στα εκτατικά συστήματα, ο έλεγχος αυτός μπορεί να περιλαμβάνει τον εμπλουτισμό της λιμνοθάλασσας με ιχθύδια που έχουν προ-πάχυνθεί σε εκκολαπτήρια. Με τον τρόπο αυτό α) ελαχιστοποιείται η θνησιμότητα των ευαίσθητων πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων και β) συντομεύεται ο χρόνος της εκτροφής. Στα συστήματα αυτά πραγματοποιείται συχνά και προσθήκη λιπασμάτων στην περιοχή της καλλιέργειας, προκειμένου να αυξηθεί η διαθεσιμότητα των φυσικών τροφικών πόρων. Άλλοι τύποι ημι-εντατικής καλλιέργειας εμπεριέχουν περισσότερο έλεγχο και περιλαμβάνουν την παροχή τεχνητής τροφής και συμπληρωματικού οξυγόνου. Αυτό το είδος της ημι-εντατικής εκτροφής γίνεται συνήθως σε μάνδρες, σε περιορισμένες περιοχές των λιμνοθαλασσών. Η τελική παραγωγή μπορεί να ποικίλλει ευρέως, ανάλογα με το μέγεθος των ιχθυδίων που χρησιμοποιούνται στους εμπλουτισμούς και την ποσότητα της χορηγούμενης τροφής. Η πυκνότητα στα ημιεντατικά συστήματα δεν υπερβαίνει κανονικά το  $1 \text{ kg/m}^3$  και η παραγωγή κυμαίνεται μεταξύ 500 - 2.400 kg ανά εκτάριο ανά έτος (FAO, 2006).

## 7.3 Εντατικά συστήματα

Τα αρχικά στάδια στα εντατικά συστήματα καλλιέργειας ακολουθούν τις φάσεις που έχουν ήδη περιγραφεί, δηλαδή την τεχνητή αναπαραγωγή, την εκτροφή των ιχθυοφυκών, την αποκοπή και την προ-πάχυνση (Εικόνα 4). Η εντατική προ-πάχυνση της τσιπούρας μπορεί να πραγματοποιηθεί σε χερσαίες εγκαταστάσεις με ορθογώνιες δεξαμενές από σκυρόδεμα που ποικίλλουν σε μέγεθος ( $200\text{-}3000 \text{ m}^3$ ), ανάλογα με το μέγεθος των ψαριών και τις απαιτήσεις της παραγωγής. Η προπάχυνση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί σε θαλάσσιους κλωβούς, είτε σε προφυλαγμένες ή ημικτεθειμένες τοποθεσίες (πλωτοί κλωβοί) ή σε εντελώς εκτεθειμένες τοποθεσίες (ημιυποβρύχιοι ή υποβρύχιοι κλωβοί) (FAO, 2006).

Τα εντατικά συστήματα ενδέχεται να εφοδιάζονται με ιχθύδια που προέρχονται από ανεξάρτητα εκκολαπτήρια. Οι μεγάλες όμως μονάδες καλλιέργειας βασίζονται συνήθως σε παραγωγή γόνου που γίνεται στα δικά τους εκκολαπτήρια. Στα εντατικά συστήματα εκτροφής, ο συντελεστής μετατρεψιμότητας της τροφής (food conversion ratio, FCR) είναι συνήθως πολύ ευνοϊκός (περίπου 1,8: 1) (FAO, 2006).

Όταν η εκτροφή γίνεται σε δεξαμενές, επειδή οι ιχθυοφορτίσεις είναι πολύ μεγάλες (κυμαίνονται από  $1545 \text{ kg/m}^3$ ) είναι απαραίτητη αυξημένη παροχή οξυγόνου για να εξασφαλιστεί η επιβίωση των ψαριών. Υπό εξαιρετικές συνθήκες ( $18\text{-}26^\circ\text{C}$ ), τα νεαρά άτομα ( $\sim 5 \text{ g}$ ) που προέρχονται από μονάδες προ-πάχυνσης μπορούν να φθάσουν το πρώτο εμπορικό μέγεθος ( $350\text{-}400 \text{ g}$ ) σε περίπου ένα χρόνο (FAO, 2006).

Η εκτροφή σε θαλάσσιους κλωβούς είναι πιο απλή και οικονομική διαδικασία και αποτελεί το πλέον διαδεδομένο σύστημα πάχυνσης στη λεκάνη της Μεσογείου. Αν και οι πυκνότητες, ( $10\text{-}15 \text{ kg/m}^3$ ), είναι μικρότερες από ότι στις δεξαμενές, υπάρχουν μεγάλα πλεονεκτήματα που καθιστούν τους κλωβούς εκτροφής πιο κερδοφόρους. Για παράδειγμα, δεν υπάρχει ενεργειακό κόστος για την άντληση, τον εξαερισμό, ή την επεξεργασία του νερού. Ωστόσο, στους κλωβούς εκτροφής δεν είναι δυνατόν να ελεγχθεί η θερμοκρασία, με αποτέλεσμα: (α) η διάρκεια της πάχυνσης έως το αγοραστικό μέγεθος να είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τις δεξαμενές και (β) να δημιουργείται η ανάγκη χρησιμοποίησης ιχθυδίων μεγαλύτερου μεγέθους, τα οποία φυσικά θα έχουν και μεγαλύτερο κόστος. Κατά μέσο όρο, τα μεγαλύτερα άτομα ( $10 \text{ g}$ ) προερχόμενα από μονάδες προπάχυνσης φθάνουν στο πρώτο εμπορικό μέγεθος ( $350\text{-}400 \text{ g}$ ) σε περίπου ένα χρόνο, ενώ τα μικρότερα άτομα ( $5 \text{ g}$ ) μπορούν να φθάσουν στο ίδιο μέγεθος σε περίπου 16 μήνες (FAO, 2006).

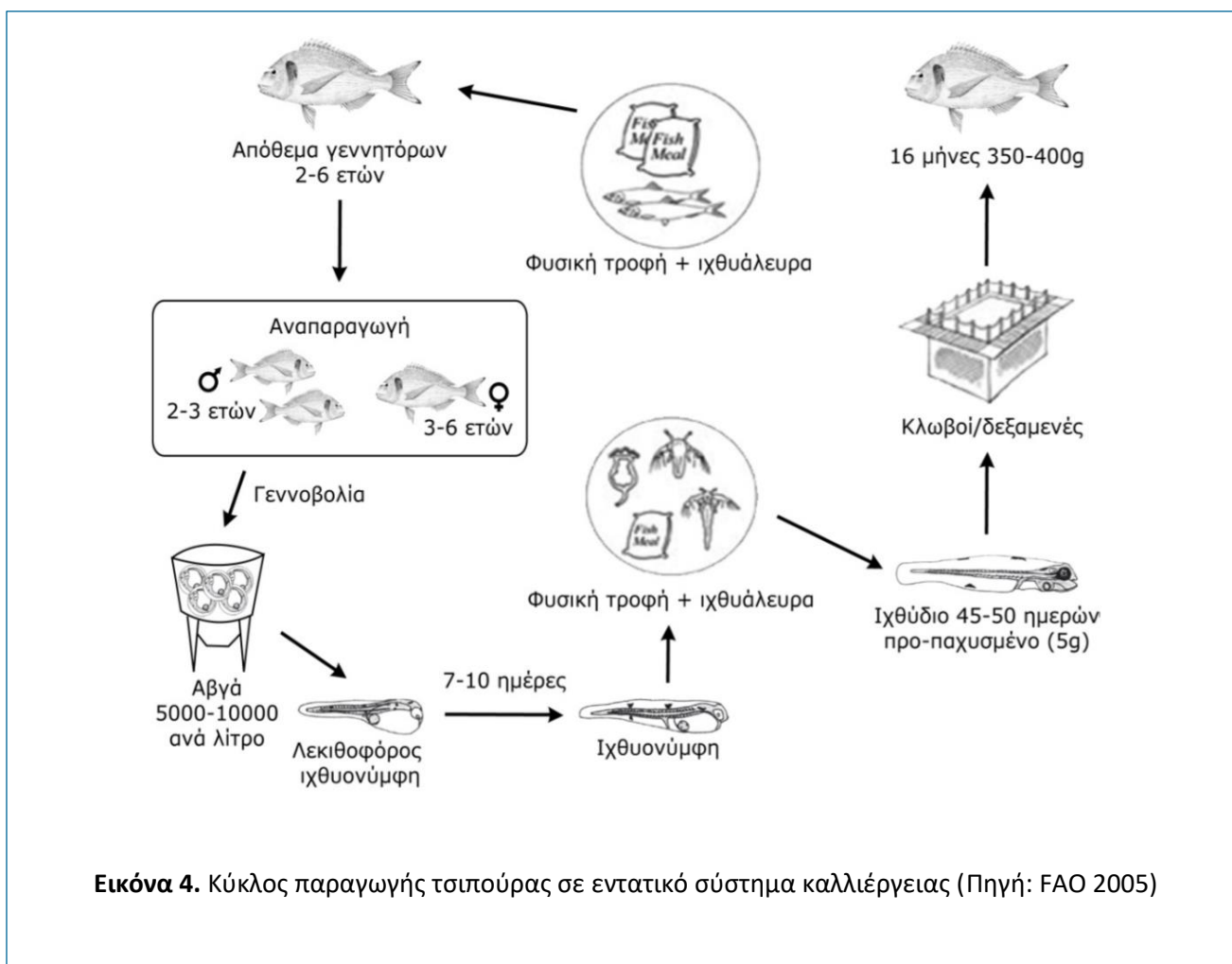
Κατά τη διαδικασία της εκτροφής και τη διάρκεια της πάχυνσης είναι απαραίτητο να γίνεται διαλογή, δηλαδή ταξινόμηση και τοποθέτηση ατόμων του ίδιου μεγέθους σε ξεχωριστές δεξαμενές ή κλωβούς. Η διαλογή



πρέπει να γίνεται τουλάχιστον δύο ή τρεις φορές ανά κύκλο αύξησης, έτσι ώστε να αποφεύγεται η διαφοροποιημένη αύξηση ατόμων που βρίσκονται στην ίδια δεξαμενή (FAO, 2006).

Πριν από κάθε συγκομιδή, είναι απαραίτητο τα ψάρια να περάσουν μερικές ημέρες σε ασιτία. Η διάρκεια αυτής της περιόδου ποικίλλει, ανάλογα με τη θερμοκρασία και τον ρυθμό σίτισης. Για παράδειγμα, στους 25°C οι 24 ώρες μπορεί να είναι αρκετές, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες είναι απαραίτητο η φάση αυτή να διαρκέσει 48-72 ώρες. Μετά τη φάση αυτή, τα ψάρια είναι έτοιμα για συγκομιδή. Πριν τη συγκομιδή είναι απαραίτητο να πραγματοποιηθεί έλεγχος για την παρουσία νεκρών ψαριών (FAO, 2006).

Όταν η πάχυνση γίνεται σε χερσαίες εγκαταστάσεις, η συγκομιδή είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί σε όλες τις καιρικές συνθήκες. Σε δεξαμενές από σκυρόδεμα, οι εργαζόμενοι ωθούν τα ψάρια προς την είσοδο του νερού χρησιμοποιώντας ένα δίχτυ που μοιάζει με τράτα. Έτσι, μπορούν να τα συλλέγουν με απόχες ή με αντλίες. Μεγάλη προσοχή δίνεται στον καθαρισμό του πυθμένα της δεξαμενής πριν από τη συγκομιδή, κάτι που διασφαλίζει την υγιεινή των ψαριών (αποτρέπει ανεπιθύμητα υλικά να εισέρθουν στα βράγχια και το στόμα τους). Από την άλλη πλευρά, η συγκομιδή σε κλωβούς πραγματοποιείται όποτε οι καιρικές συνθήκες το επιτρέπουν για την ασφάλεια των εργαζομένων. Στην περίπτωση αυτή, τα ψάρια συνωστίζονται τεχνητά σε μια σχετικά μικρή περιοχή του κλωβού, έτσι ώστε να μπορούν να συλλέγονται με απόχες ή με αντλίες κενού (FAO, 2006).



Μετά τη συγκομιδή, τόσο στους ιχθυοκλωβούς όσο και στις χερσαίες εγκαταστάσεις, οι τσιπούρες θανατώνονται συνήθως με θερμικό σοκ. Τα ψάρια τοποθετούνται σε λεκάνες (πλαστικές ή από ανοξείδωτο χάλυβα) με παγωμένο νερό, το οποίο θα πρέπει να είναι κορεσμένο με CO<sub>2</sub>, ώστε να μειωθεί η καταπόνηση τους και κατά συνέπεια η υποβάθμιση της ποιότητάς τους. Μετά τη διαδικασία αυτή, απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στη λήψη των ψαριών, προκειμένου να αποφευχθεί η απώλεια των λεπιών τους και να διατηρήσουν τόσο την εμφάνιση όσο και τη φωτεινότητα του δέρματός τους (FAO, 2006).

Σε γενικές γραμμές, για την πρόληψη των ασθενειών είναι απαραίτητο τα ψάρια να διατηρούνται σε ένα περιβάλλον υγιεινό και, με βάση την εμπειρία του προσωπικού, να γίνεται πρόβλεψη για το είδος και χρόνο εμφάνισης της ασθένειας που μπορεί να αναμένεται κάτω από τις επικρατούσες συνθήκες. Εάν οι συνθήκες υποδηλώνουν την πιθανότητα μιας επιζωοτίας, τότε πρέπει να μειώνεται η πυκνότητα εκτροφής και να περιορίζεται η σίτιση. Η απομάκρυνση των νεκρών ψαριών είναι το πρώτο βήμα για την πρόληψη της περαιτέρω εξάπλωσης της ασθένειας. Είναι απαραίτητο, τόσο τα άρρωστα όσο και τα νεκρά ψάρια να απομακρύνονται όσο το δυνατόν συντομότερα από τις πληγείσες δεξαμενές/κλωβούς. Οι εκτροφές γίνονται πιο ευάλωτες σε ξεσπάσματα ασθενειών όταν η θερμοκρασία του νερού αυξάνεται πάνω από τους 28°C (FAO, 2006).

### 8. Σκελετικός μυς στο *Sparus aurata*: Δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά

Οι τελεόστεοι είναι η πιο ποικίλη ομάδα σπονδυλωτών που διαβιούν στους περισσότερους υδρόβιους οικοτόπους, από απομονωμένες θερμές περιοχές μέχρι και τον βαθύ ωκεανό. Η μυοτομική αρχιτεκτονική και η οργάνωση των μυϊκών ινών των τελεόστεων σχετίζονται με τις απαιτήσεις για κάμψη του σώματος κατά τη διάρκεια του κολύμβησης. Κατά τη διάρκεια του κύκλου ζωής τους υπάρχουν σημαντικές αλλαγές στη δομή και λειτουργία των μυών τους που σχετίζονται με την ραγδαία αύξηση της σωματικής μάζας. Το μυοτόμιο έχει μια πολύπλοκη αρχιτεκτονική και περιλαμβάνει διάφορα δομικά στοιχεία όπως μυϊκές ίνες, μυογονικά πρόδρομα κύτταρα (MPC), νεύρα, συνδετικό ιστό, ινοβλάστες, σκελετικά οστεοκύτταρα, λιποκύτταρα και τριχοειδή ενδοθηλιακά κύτταρα. Παρόλο που οι πολυπύρηνες μυϊκές ίνες είναι το πιο άφθονο συστατικό, η ανάπτυξη απαιτεί την αλληλεπίδραση μεταξύ όλων των κυτταρικών τύπων και την ανταλλαγή πληροφοριών με άλλους ιστούς (Rowlerson et al. 2001).

Οι μύες των ψαριών αποτελούνται από τρεις κύριους τύπους μυϊκών ινών: τις κόκκινες, λευκές και ροζ μυϊκές ίνες. Αυτές μπορούν να διακριθούν οπτικά από το χρώμα λόγω διαφοράς της συγκέντρωσης μυοσφαιρίνης και παρουσιάζουν μια σειρά διαφορετικών λειτουργικών χαρακτηριστικών (Kiessling et al., 2006).

Τα χαρακτηριστικά των κόκκινων μυϊκών ινών αυτού του τύπου μυών είναι ότι έχουν καλή τριχοειδή παροχή και υψηλό αριθμό μιτοχονδρίων, λιπιδίων και αποθηκών γλυκογόνου. Επιπλέον, η συγκέντρωση μυοσφαιρίνης και ο αριθμός κυτοχρωμάτων είναι υψηλά. Ο ενεργειακός μεταβολισμός στον ερυθρό μυ είναι σχεδόν εξ ολοκλήρου αερόβιος, χρησιμοποιώντας ως καύσιμη πηγή τα λιπίδια και τους υδατάνθρακες. Οι κόκκινες μυϊκές ίνες είναι συνήθως αργής συστολής και ανθεκτικές στην κόπωση και έχουν υψηλό βαθμό οξειδωτικής δράσης (Kiessling et al., 2006).

Οι λευκές μυϊκές ίνες εμφανίζουν χαμηλό αριθμό μιτοχονδρίων και πολύ χαμηλή συγκέντρωση λιπιδίων και μυοσφαιρίνης. Η ενέργεια για τη σύσπαση των λευκών μυϊκών ινών παρέχεται κυρίως από τη διάσπαση του ενδομυϊκού γλυκογόνου και σε μικρότερο ποσοστό από τη φωσφοκρεατίνη και το ATP, ενώ παράλληλα παρέχεται και από μια πιο βραδεία και σταθερή διάσπαση λιπιδίων. Αυτού του τύπου οι μυϊκές ίνες χρησιμοποιούνται για γρήγορες συσπάσεις και εμφανίζουν μικρή οξειδωτική δράση (Kiessling et al., 2006).

Οι ροζ ίνες έχουν χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των κόκκινων και των λευκών και βρίσκονται ανάμεσά τους. Οι ροζ ίνες χαρακτηρίζονται ως γρήγορης συστολής με ενδιάμεση αντίσταση στην κόπωση και ενδιάμεση

ταχύτητα συστολής σε σχέση με τις κόκκινες και λευκές μυϊκές ίνες. Ενώ οι κατηγορίες κόκκινων, λευκών και ροζ ινών είναι γενικές περιγραφές, οι τύποι ινών καθορίζονται ειδικά από τη σύνθεση των ισομορφών μυοσίνης, οι οποίες μπορούν να προσδώσουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργικών ιδιοτήτων (KieSSLing et al., 2006).

Διαφορετικοί τύποι μυϊκών ινών συνεργάζονται, με διαφορετικούς τρόπους, με ίνες αργής συστολής που χρησιμοποιούνται σε βραδύτερη κολύμβηση και ίνες ταχείας συστολής που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια γρήγορων ανταποκρίσεων σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα (Bone 1966, Rome et al. 1988, Jayne & Lauder 1994). Κατά συνέπεια, οι αναλογίες γρήγορων και αργών ινών αντανακλούν την εξελικτική οικολογία των ψαριών, όπου τα πελαγικά ψάρια με συνεχή κολύμβηση διαθέτουν μεγαλύτερο ποσοστό αργών ινών σε σύγκριση με τα ψάρια που χρησιμοποιούν κυρίως απότομες και σύντομες τακτικές κολύμβησης (Greek-Walker & Pull 1975). Όπως στα θηλαστικά, έτσι και στα ψάρια, οι μύες ανταποκρίνονται με πλαστικότητα στην εξάσκηση όπως για παράδειγμα η εξάσκηση αντοχής σε χαμηλή σταθερή ταχύτητα οδηγεί γενικά σε αύξηση του ποσοστού αργών ινών (Davison 1989, 1997).

Ο σκελετικός μυϊκός ιστός, συγκροτείται από πολυπύρηνες μυϊκές ίνες. Η ανάπτυξη των μυών στα ψάρια εξαρτάται από τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των μυογονικών προδρόμων κυττάρων, που ονομάζονται μυοβλάστες. Όταν αυτά τα κύτταρα ενεργοποιούνται, πολλαπλασιάζονται και διαφοροποιούνται και οι πυρήνες τους εσωτερικεύονται από υπάρχουσες ίνες οι οποίες χαρακτηρίζονται από υπερτροφική μυϊκή ανάπτυξη. Οι πολλαπλασιαζόμενοι μυοβλάστες συσσωματώνονται στην επιφάνεια των ινών και δημιουργούν νέους μυοσωλήνες. Όταν διαχωρίζονται δημιουργούν νέες μυϊκές ίνες σε μια διαδικασία που ονομάζεται υπερπλασία (Johnston et al., 2000, Dal Pai-Silva et al., 2003).

### 8.1 Ρύθμιση υπερτροφίας και υπερπλασίας

Η υπερτροφία και η υπερπλασία ρυθμίζονται από τη διαδοχική έκφραση της οικογένειας των μυογενικών (myogenic) πρωτεϊνών, οι οποίες είναι μεταγραφικοί παράγοντες της οικογένειας bHLH και ονομάζονται Myogenic Regulatory Factors (MRFs), myoD, myf-5, myogenin και mrf4 (Muscle Regulatory Factor 4). Πρόκειται για μεταγραφικούς παράγοντες που συνδέονται σε μια συγκεκριμένη αλληλουχία DNA που ονομάζεται E-box (5'-CANNTG-3') και βρίσκεται στην περιοχή του υποκινητή πολλών μυϊκών ειδικών γονιδίων (Johansen et al., 2005, Rescan 2001, Sabourin et al., 2000, Watabe, 2001). Οι MyoD και myf-5 ελέγχουν τον προσδιορισμό της μυογονικής γενεαλογίας και ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό των μυοβλαστών (Goulding et al. 1994). Συγκεκριμένα, η MyoD ενεργοποιεί άμεσα γονίδια ορισμένων πρωτεϊνών χαρακτηριστικών του μυϊκού ιστού, όπως είναι η φωσφοκινάση της κρεατινίνης ή ο υποδοχέας της ακετυλοχολίνης, καθώς και τη μεταγραφή του δικού της γονιδίου. Κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη το γονίδιο myf-5 ενεργοποιείται στο επαξονικό μυοτόμιο και το γονίδιο myoD στο υπαξονικό μυοτόμιο. Το γονίδιο myogenin ενεργοποιείται αργότερα από τα myf-5 και myoD και εκφράζεται σε ολόκληρο το μυοτόμιο (Slack, 2007). Τα myogenin και MRF4 δρουν στο στάδιο διαφοροποίησης των μυοβλαστών, στο οποίο οι μυοσωλήνες συντήκονται για να σχηματίσουν νέες μυϊκές ίνες (Grobet et al., 1997).

Η μυσστατίνη (MSTN) είναι μέλος της υπερ-οικογένειας των παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης Transforming Growth Factor beta (TGF-β). Ρυθμίζει αρνητικά την ανάπτυξη των σκελετικών μυών των θηλαστικών (Lee, 2004). Η μυσστατίνη στα θηλαστικά περιορίζεται κυρίως στους σκελετικούς μύες, στους λιπώδεις ιστούς, στους μαστικούς αδένες και στους καρδιακούς μύες (Sharma et al., 1999). Έχει αναφερθεί ότι η μυσστατίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των μυοβλαστών με το να αυξάνει τη δράση της p21<sup>Waf,Cip1</sup> (cyclin-dependent kinase inhibitor 1) και να μειώνει την δράση της cyclin-E-Cdk2 (Thomas et al., 2000) και ενεργοποιεί τη διαφοροποίηση των μυοβλαστών με το να μειώνει την έκφραση των μεταγραφικών παραγόντων MyoD, Myf5 και Pax-3 (Yang et al., 2005).



## 8.2 Στάδια Μυογένεσης στο *Sparus aurata*

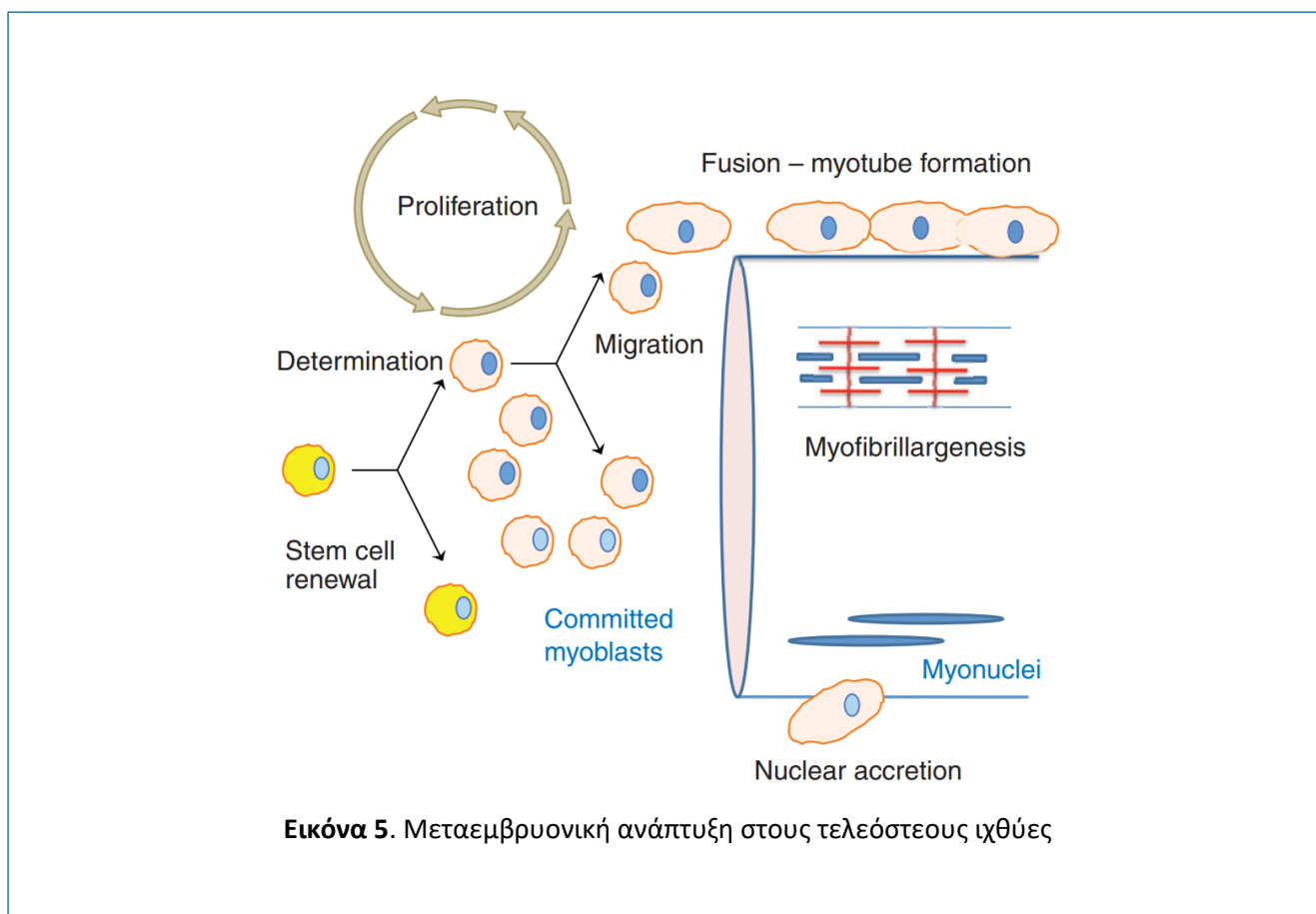
Η μυογένεση στα ψάρια ξεκινά σε ένα πρώιμο εμβρυϊκό στάδιο ανάπτυξης από ότι στα αμνιωτά όπως τα πτηνά και τα θηλαστικά. Αυτό πιθανότατα αντικατοπτρίζει την απαίτηση κατάκτησης ικανότητας κολύμβησης σε συνδυασμό με την εξωτερική γονιμοποίηση. Πληροφορίες σχετικά με τη δημιουργία των μυϊκών ινών στα έμβρυα τελεόστεων προέρχονται σε μεγάλο βαθμό από μελέτες πάνω στο ψάρι ζέβρα (*zebrafish*). Όλοι οι μύες του εμβρύου αναπτύσσονται σε μεσοδερμικά διαμερίσματα που ονομάζονται σωμίτες, τα οποία βρίσκονται σε ζεύγη κατά μήκος του άξονα του σώματος που διαχωρίζονται από τη νωτοχορδή και το νευρικό σωλήνα. Τα κύτταρα των σωμιτών διαφοροποιούνται σε μυοτόμιο που περιέχει τους τέσσερις βασικούς τύπους μυϊκών ινών που αναγνωρίζονται στα έμβρυα *zebrafish* δηλαδή πρόδρομες μυϊκές ίνες, αργές μυϊκές ίνες, γρήγορες μυϊκές ίνες και μυϊκές ίνες ενδιάμεσης ταχύτητας. Η εξειδίκευση των κυττάρων σε κάθε έναν από αυτούς τους τύπους μυών εξαρτάται από την οικογένεια των μυογενετικών μεταγραφικών παραγόντων (MRFs) (*myoD*, *myf5*, *mrf4*). Η μυογένεση περιλαμβάνει το σχηματισμό μυϊκών ινών, συμπεριλαμβανομένων, της διαφοροποίησης, της σύντηξης και της επακόλουθης συνένωσης των μυογονικών προδρόμων κυττάρων προς σχηματισμό συγκυτιακών μυϊκών ινών. Ακολουθεί η έναρξη της μυοϊνογένεσης (Johnston et al., 2011).

Η εμβρυϊκή ανάπτυξη των τελεόστεων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, ιδιαίτερα από τη θερμοκρασία και τις συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου. Το περιβάλλον καθορίζει το ρυθμό της μυογένεσης, τη σύνθεση των υποκυτταρικών οργανιδίων, τα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης, τον αριθμό και το μέγεθος κατανομής των μυϊκών ινών. Κατά τη διάρκεια των εμβρυϊκών και προνυμφικών σταδίων η μυϊκή πλαστικότητα στο περιβάλλον είναι συνήθως μη αναστρέψιμη λόγω του γρήγορου ρυθμού των οντογενετικών αλλαγών. Η μεταεμβρυϊκή ανάπτυξη περιλαμβάνει μυογονικά προγονικά κύτταρα (MPC) που προέρχονται από το έμβρυο. Το καθεστώς της εμβρυϊκής θερμοκρασίας μπορεί να έχει μακροπρόθεσμες συνέπειες για την ανάπτυξη του σκελετικού μυός σε ορισμένα είδη. Σε νεαρά και ενήλικα ψάρια, οι αβιοτικοί (θερμοκρασία, διάρκεια της ημέρας, χαρακτηριστικά ροής νερού, υποξία) και βιοτικοί παράγοντες (διαθεσιμότητα τροφής, παρασιτική λοίμωξη) έχουν πολύπλοκες επιδράσεις στις οδούς σηματοδότησης που ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των MPCs, τη σύνθεση και την αποδόμηση πρωτεϊνών, και τα πρότυπα της γονιδιακής έκφρασης (Johnston et al., 2006).

Η αύξηση της ολικής μάζας του μυός (αύξηση της μάζας του μυϊκού κυττάρου) ονομάζεται υπερτροφία, ενώ η αύξηση του αριθμού των μυϊκών κυττάρων ονομάζεται υπερπλασία του μυός (Rowlerson et al., 2001). Η μυϊκή ανάπτυξη και αύξηση είναι η συνδυασμένη δράση αυτών των δύο μηχανισμών (Johnston et al., 1998, Alami-Durante et al., 2010). Η μυϊκή ανάπτυξη, βασισμένη στη συνδυασμένη δράση της υπερπλασίας και της υπερτροφίας, συμβαίνει όχι μόνο πριν τη μεταμόρφωση αλλά και μετά από αυτή (Rowlerson et al., 2001). Σε κάποια στάδια της ανάπτυξης υπερισχύει η υπερπλασία ενώ σε άλλα η υπερτροφία. Το κάθε στάδιο ονομάζεται ανάλογα με τον υπερισχύοντα μηχανισμό. Συγκεκριμένα, η μυογένεση είναι διαδοχικά γεγονότα πολλαπλασιασμού, διαφοροποίησης, μετανάστευσης και σύντηξης πρόδρομων μυϊκών κυττάρων προς σχηματισμό πολυπύρηνων μυϊκών κυττάρων (Εικόνα 5) (Alfei et al., 1994, Akster et al., 1995). Η υπερπλασία είναι αργή διαδικασία αλλά η ταχύτητα της αυξάνεται στο μέσο του προνυμφικού σταδίου. Η εναπόθεση νέων μυϊκών ινών γίνεται κατά μήκος των ζωνών πολλαπλασιασμού που βρίσκονται τόσο στα άκρα του μυοτομίου όσο και σε ενδιάμεσες θέσεις αυτού. Κάποιες από τις ζώνες αυτές σχηματίζουν ερυθρές μυϊκές ίνες και κάποιες λευκές (Weatherley et al., 1980, 1981, 1988, Carpenè et al., 1981, Stickland 1983, Rowlerson et al., 1985, Romanello et al., 1987, Veggetti et al., 1990, Koumans et al., 1991).

Σε αντίθεση με την ανάπτυξη των μυών μετά τον τοκετό στα θηλαστικά, η οποία συμβαίνει αποκλειστικά μέσω υπερτροφίας των μυϊκών ινών που σχηματίζονται κατά την κύηση, η ανάπτυξη των μυών μετά την εκκόλαψη σε πολλά είδη ψαριών συνδυάζει τόσο υπερτροφία όσο και υπερπλασία. Η υπερπλασία μυϊκών ινών στα ψάρια εμφανίζεται σε δύο διαδοχικές φάσεις. Στην πρώτη φάση, η οποία συμβαίνει γενικά κατά τη

διάρκεια της περιόδου των προνυμφών, νέες ίνες σχηματίζονται σε ένα διακριτό, συνεχές στρώμα στην επιφάνεια του πρωτογενούς μυώματος. Αυτή η πρώτη φάση ονομάζεται στρωματοποιημένη υπερπλασία. Στη δεύτερη φάση της υπερπλασίας, νέες ίνες σχηματίζονται σε ολόκληρο το μυοτόμιο, παράγοντας την τυπική εμφάνιση μωσαϊκού που παρατηρείται σε μια μυϊκή διατομή. Η μωσαϊκή υπερπλασία που τροφοδοτείται από υπάρχοντα αδρανή δορυφορικά κύτταρα διασκορπισμένα σε όλο το μυοτόμιο στην επιφάνεια των μυϊκών ινών, σταματά τελικά όταν το ψάρι φτάσει περίπου στο 50% του μέγιστου μήκους του σώματος (Johnston et al., 2011).



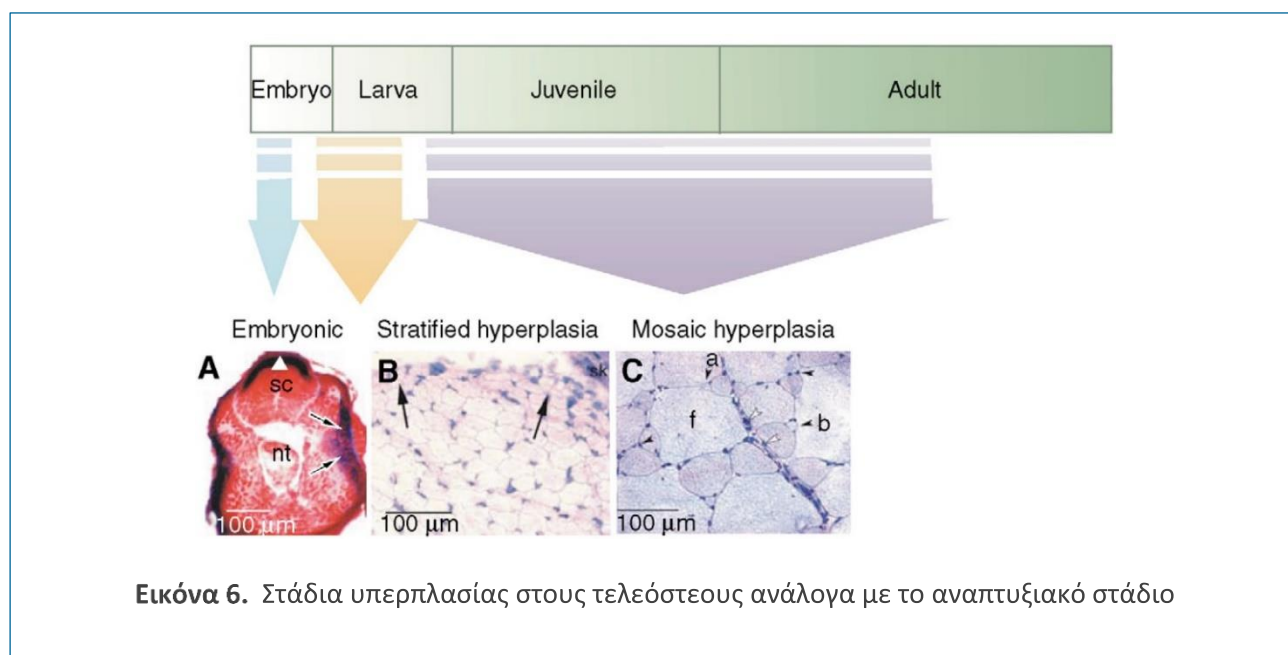
Η μυογένεση συντελείται στις παρακάτω τρεις φάσεις, ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο:

**Εμβρυονική φάση:** Αυτή η φάση εξελίσσεται στο εμβρυϊκό στάδιο όπου στο τέλος της γαστριδίωσης τα κύτταρα που εκφράζουν το μεταγραφικό παράγοντα MyoD (myoblast determination factor) προορίζονται για το σχηματισμό των μυών. Από το πλευρικό τμήμα των σωματιών και από τα οπίσθια σωματικά κύτταρα προκύπτουν δύο διαφορετικοί μορφολογικά και λειτουργικά μυϊκοί τύποι που σχηματίζουν το πρωταρχικό μυοτόμιο. Τα μυϊκά κύτταρα είναι μονοπύρρηνα (Rowelson et al. 1995). Οι νεοσχηματιζόμενοι μωσαϊκές μετακινούνται μέσω του μυοτομίου δίπλα στη νωτοχορδή και σχηματίζουν ένα επιφανειακό στρώμα μυϊκών ινών (αργού τύπου).

**Στρωματοποιημένη υπερπλασία:** Αυτή η φάση αρχίζει στο τέλος εμβρυϊκής ανάπτυξης και ολοκληρώνεται στην αρχή του προνυμφικού σταδίου με το σχηματισμό νέων λευκών μυϊκών ινών (γρήγορου τύπου) (Johnston et al., 1996). Στην αρχή του προνυμφικού σταδίου, κύτταρα που εκφράζουν Pax7 (Seale et al., 2000)

φαίνεται ότι επάγουν την παραγωγή πρόδρομων μυογενών κυττάρων που βρίσκονται σε όλη την έκταση του μυοτομίου. Κατά την οργανογένεση, κύτταρα αποσπώμενα από το δερμομυοτόμιο είναι η κύρια πηγή πρόδρομων μυογενών κυττάρων που οδηγούν σε στρωματοποιημένη υπερπλασία στο ραχιαίο και κοιλιακό όριο του μυοτομίου αλλά και στα πλάγια όρια των περιοχών ανάπτυξης μυϊκών ινών γρήγορου τύπου (Rowlerson et al., 1995). Συγκεκριμένα, τα μυογονικά πρόδρομα κύτταρα (MPCs) είναι ικανά να πολλαπλασιάζονται και να μεταναστεύουν μέσω του μυός πριν το τέλος του κυτταρικού κύκλου και την τελική διαφοροποίηση. Οι νεοσχηματιζόμενοι μυοβλάστες μπορούν να ακολουθήσουν μία από τις εξής δύο πορείες: είτε να συντηγηθούν μαζί για να σχηματίσουν κοντούς μυοσωλήνες στην επιφάνεια των μυϊκών ινών (fibre recruitment) είτε να μετατραπούν σε μυϊκές ίνες καθώς επεκτείνονται σε μήκος και διάμετρο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης (nuclear accretion) (Εικόνα 5). Σε πολλά είδη ιχθύων διατηρείται ένα στρώμα αδιαφοροποίητων κυττάρων στην εξωτερική επιφάνεια του μυοτομίου έως και τα πρώτα στάδια της ενήλικης ζωής. Η στρωματοποιημένη υπερπλασία παράγει και λευκές και ερυθρές μυϊκές ίνες (Johnston et al., 2011).

**Μωσαϊκή υπερπλασία:** Αρχίζει στο προνυμφικό στάδιο και συνεχίζεται σε όλη τη διάρκεια ζωής του ιχθύος και περιλαμβάνει το σχηματισμό των πρωτοεμφανιζόμενων μυοσωλήνων στην επιφάνεια υπάρχουσών μυϊκών ινών σε όλο το μήκος του μυοτομίου. Συγκεκριμένα, η μωσαϊκή υπερπλασία προκαλείται από τον πολλαπλασιασμό πρόδρομων μυογενών κυττάρων (MPC) που βρίσκονται διάσπαρτα σε όλη την έκταση του μυοτομίου (Rowlerson et al., 2001). Η παραγωγή νέων μυϊκών ινών προχωρά δια μέσου του μυοτομίου σχηματίζοντας ένα μωσαϊκό από μυϊκές ίνες διαφορετικών διαμέτρων (Rowlerson et al., 2001). Αποτελεί την τελική φάση της μυογένεσης, δηλαδή το σχηματισμό μυϊκών ινιδίων στην επιφάνεια των λευκών μυϊκών ινών σε όλο το μήκος της μυοτομίου (Mascarello et al., 1995) ανάμεσα στις οποίες βρίσκονται δορυφορικά κύτταρα έτοιμα να δεχθούν σήματα και να αρχίσουν τη λειτουργία τους. Η παραγωγή λευκών μυϊκών ινών συνεχίζεται μέχρι το μήκος του σώματος να φτάσει το 40% του τελικού. Στη συνέχεια η ανάπτυξη συνεχίζεται μέσω αύξησης του μήκους και της διαμέτρου των ήδη υπάρχουσών μυϊκών ινών (υπερτροφία) (Rowlerson et al., 2001, Johnston et al., 2004, 2006).



Τελικό στάδιο στη μυογένεση αποτελεί η σύντηξη των μυοβλαστών. Κυτταρικά συμβάντα που σχετίζονται με αυτήν τη διαδικασία περιλαμβάνουν αναγνώριση, προσρόφηση, ευθυγράμμιση και διάσπαση των μεμβρανών των μυοβλαστών και έχει αποδειχθεί ότι τα γονίδια που εμπλέκονται σε αυτή τη διαδικασία φαίνεται να έχουν συντηρηθεί από το είδος της *Drosophila* έως και τα σπονδυλωτά (Richardson et al., 2008). Η αναδιαμόρφωση του κυτταροσκελετού φαίνεται να αποτελεί σημαντικό ρόλο στη διαδικασία σύντηξης. Αρχικά, η *de novo* σύντηξη μυοβλάστη με μυοβλάστη έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολυπύρηνων συγκυτιακών ινών. Σε μια δεύτερη φάση, μονοπύρηνιοι μυοβλάστες συντηκονται με πολυπύρηνους μωσωλήνες, με αποτέλεσμα τη σύντηξη μυοβλάστη με μωσωλήνα. Ωστόσο, αν και υπάρχει μια αυξανόμενη λίστα πρωτεϊνών με γνωστή συμμετοχή στη σύντηξη μυοβλαστών, οι λεπτομέρειες παραμένουν μάλλον ασαφείς (Richardson et al., 2008).

### 8.3 Γονίδια υπό μελέτη που εκφράζονται στο λευκό μυ

Στη παρούσα εργασία μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων δύο ελαφριών αλυσίδων της μωσίνης με ικανότητα φωσφορυλίωσης στους ταχείς σκελετικούς μύες τύπου A και B (MYLPF A & MYLPF B), της μωστατίνης 1 (MSTN1), της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (LPL) και της ορμονοευαίσθητης λιπάσης (HSL).

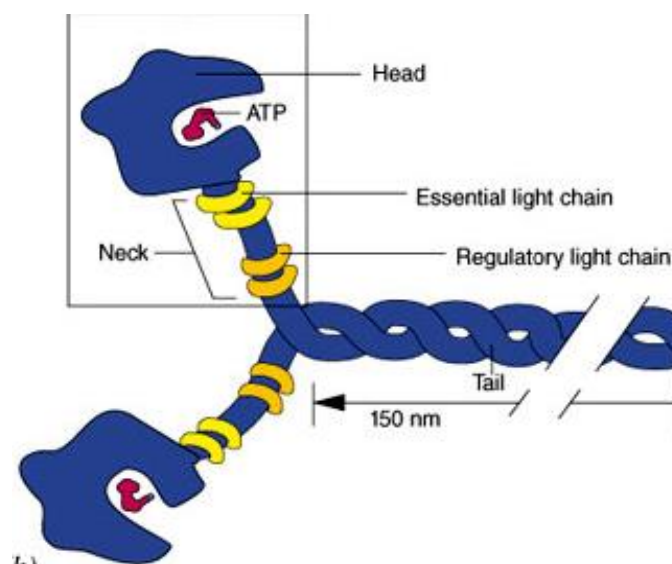
#### 8.3.1 Ελαφριές αλυσίδες της μωσίνης με ικανότητα φωσφορυλίωσης στους ταχείς σκελετικούς μύες τύπου A και B (MYLPF A & MYLPF B)

Η μωσίνη είναι η κύρια πρωτεΐνη του γραμμωτού μυός και είναι υπεύθυνη για τη συστολή των μυών καθώς και για την ενδοκυτταρική μεταφορά. Είναι ο μοριακός κινητήρας που μετατρέπει την ενέργεια από την υδρόλυση του ATP σε προσανατολισμένη κίνηση και έτσι οδηγεί στη μείωση του μεγέθους του σαρκομεριδίου και τη συστολή των μυών. Συγκεκριμένα, αποτελείται από δύο βαριές αλυσίδες (MHCs) και τέσσερις ελαφριές αλυσίδες (MLCs), οι οποίες συνδυάζονται για να σχηματίσουν μια μακριά α-ελικοειδή ουρά με δύο κεφαλές (Εικόνα 7). Κάθε κεφαλή περιέχει μια θέση δέσμησης της ακτίνης και δρα ως ATPάση. Ο σχηματισμός κάθε κεφαλής περιλαμβάνει το μισό αμινοτελικό άκρο των δύο βαριών αλυσίδων και ένα ζεύγος ελαφρών αλυσίδων (Lowey, 1994).

Οι ελαφριές αλυσίδες ανήκουν στην υπεροικογένεια γονιδίων τροπονίνης-C που περιλαμβάνει επίσης τις πρωτεΐνες δέσμησης  $Ca^{2+}$  καλμοδουλίνη και παραλβουμίνη (Periasamy et al., 1984). Οι ελαφριές αλυσίδες ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες: τις αφαιρούμενες υπό αλκαλικές συνθήκες ελαφριές αλυσίδες (alkali light chain) και τις αφαιρούμενες μέσω δινιτροβενζοϊκού οξέος (DTNB light chain) ελαφριές αλυσίδες (Weeds et al., 1971). Στον σκελετικό μυ, υπάρχουν δύο διαφορετικοί τύποι αλκαλικής ελαφριάς αλυσίδας, MLC1 και MLC3. Έχει τεκμηριωθεί ένας συσχετισμός μεταξύ των αλκαλικών ελαφρών αλυσίδων και της κεφαλής MHC, που πιστεύεται ότι εμπλέκεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ μωσίνης και ακτίνης, και έχει αναφερθεί γραμμική συσχέτιση μεταξύ του λόγου MLC1: MLC3 και της ταχύτητας κάμψης της συστολής (Lowey et al., 1995). Οι αφαιρούμενες από DTNB ελαφριές αλυσίδες ονομάζονται MLC2 και έχουν ένα ρυθμιστικό, αν όχι καταλυτικό ρόλο δεσμεύοντας  $Ca^{2+}$  και, ως εκ τούτου, συνήθως αναφέρονται ως ρυθμιστικές ελαφριές αλυσίδες (Weeds et al., 1971).

Τόσο οι βαριές όσο και οι ελαφριές αλυσίδες υπάρχουν σε πολλές ισομορφές, καθεμία από τις οποίες υπόκειται σε ιστο-ειδική ρύθμιση, σε περιβαλλοντική ρύθμιση (θερμοκρασία, διατροφή), σε ορμονικό έλεγχο ή σε ρύθμιση που εξαρτάται από το αναπτυξιακό στάδιο (Gauthier et al., 1982, Izumo et al., 1986, Hill et al., 2000). Στην τσιπούρα, η ελαφριά αλυσίδα 2 της μωσίνης (MLC2) υπάρχει σε δύο ισομορφές, A και B, οι οποίες είναι γνωστό ότι σηματοδοτούν υπερπλασία και υπερτροφία αντίστοιχα και κωδικοποιούνται από δύο διαφορετικά γονίδια. Η έκφρασή τους ρυθμίζεται από μωγενετικούς παράγοντες και από το

αναπτυξιακό στάδιο. Η ισομορφή A της MLC2 αποτελείται από 170 αμινοξέα και περιέχει τρία διαφορετικά σήματα πολυαδενυλίωσης στην 3'-UTR (Moutou et al., 2001). Η MLC2A εκφράζεται αποκλειστικά στο λευκό μυ, κυριαρχεί στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και μετά τη μεταμόρφωση περιορίζεται στα δορυφορικά κύτταρα (αδρανή, αδιαφοροποίητα κύτταρα που βρίσκονται στον ενδιάμεσο χώρο των μυϊκών ινών). Η ισομορφή B (MLC2B) αποτελείται από 170 αμινοξέα και βρίσκεται σε όλους τους ιστούς (ερυθρός μυς, λευκός μυς, βράγχια κ.ά.). Ακόμη, η έκφραση της ισομορφής B δεν περιορίζεται τόσο χρονικά, καθώς αυξάνεται μετά τη μεταμόρφωση και εμφανίζει ένα ευρύτερο ιστο-ειδικό πρότυπο (Moutou et al., 2005).



Εικόνα 7. Δομή μυοσίνης

### 8.3.2 Λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL)

Τα ενδογενή λιπίδια, που συντίθενται μέσω λιπογένεσης και τα λιπίδια από την πρόσληψη τροφής, που δεν χρησιμοποιούνται για παροχή ενέργειας, οδεύουν σε αποθήκες λιπιδίων στους ιστούς. Ο σχηματισμός αποθηκών λιπιδίων στους ιστούς συνεπάγεται μεταφορά τόσο απορροφούμενων όσο και *de novo* συνθετικών λιπιδίων σε περιφερειακούς ιστούς ως λιποπρωτεΐνες και απελευθέρωση λιπαρών οξέων από τον πλούσιο σε τριακυλογλυκερόλες πυρήνα των κυκλοφορούντων λιποπρωτεϊνών από την λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) για πρόσληψη από τους ιστούς (Wang et al., 2013).

Τα λιπίδια αποτελούν την κύρια πηγή ενέργειας στην διατροφή των ψαριών, εκτός του ότι αποτελούν την πηγή για τα απαραίτητα λιπαρά οξέα (EFA), που είναι συστατικά των κυτταρικών μεμβρανών και πρόδρομα μόρια των εικοσανοειδών. Τα ψάρια, όπως όλα τα σπονδυλωτά, είναι ανίκανα να συνθέσουν n-3 και n-6 πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA), τα οποία όμως είναι απαραίτητα στην διατροφή (Tocher et al., 2008). Τα τριγλυκερίδια που προέρχονται από τη διατροφή και πακετάρονται από το έντερο σε χυλομικρά, ενώ τα ενδογενώς παραγόμενα τριγλυκερίδια απελευθερώνονται από το ήπαρ με την μορφή VLDL σωματιδίων. Οι δυο αυτοί τύποι λιποπρωτεϊνών μπαίνουν στην κυκλοφορία με σκοπό να προμηθεύσουν τριγλυκερίδια στους ιστούς (Wang et al., 2013).



Η λιποπρωτεϊνική λιπάση είναι ένα γλυκοπρωτεϊνικό ένζυμο που παράγεται σε πολλούς ιστούς στα θηλαστικά, όπως ο λιπώδης ιστός, ο σκελετικός μυς, η καρδιά, τα μακροφάγα, ο θηλαστικός μαστικός αδένας, αλλά όχι στο ενήλικο ήπαρ (Garfinkel et al., 1987). Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, η δραστηριότητα και η έκφραση LPL έχει επίσης ανιχνευθεί στο ήπαρ ενήλικων ψαριών. Μόλις συντεθεί η LPL, το ένζυμο εκκρίνεται και μεταφέρεται στην επιφάνεια του αυλού των τριχοειδών ενδοθηλιακών κυττάρων όπου εκτελεί τη λειτουργία του (Camps et al., 1990, Auwerx et al., 1992). Η LPL υδρολύει τα τριγλυκερίδια που κυκλοφορούν με τη μορφή χυλομικρών και λιποπρωτεϊνών πολύ χαμηλής πυκνότητας (VLDL) σε ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFA) και 2-μονοακυλογλυκερόλες. Τα FFA μπορεί να χρησιμοποιηθούν από διαφορετικούς ιστούς, όπως λιπώδη ιστό (όπου το FFA επαναεστεροποιείται και αποθηκεύεται) ή από άλλους περιφερειακούς ιστούς, όπως μύες και καρδιά (όπου τα FFA μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πηγή ενέργειας) (Auwerx et al., 1992). Για αυτούς τους λόγους, η LPL παίζει κεντρικό ρόλο στο μεταβολισμό των λιπιδίων.

Στα θηλαστικά, η ιστοειδικότητα και οι διατροφικές συνθήκες ρυθμίζουν την LPL. Η δραστηριότητα της LPL μειώνεται κατά τη διάρκεια της νηστείας στον λιπώδη ιστό, ενώ είτε δεν μεταβάλλεται είτε αυξάνεται στον σκελετικό μυ ή στην καρδιά. Στα θηλαστικά, ο κύριος ρυθμιστής της LPL είναι η ινσουλίνη. Η ινσουλίνη διεγείρει άμεσα τη δραστηριότητα της LPL στον λιπώδη ιστό, όπως φαίνεται από *in vivo* και *in vitro* μελέτες (Ong et al., 1988, Picard et al., 1999), αλλά την μειώνει στον σκελετικό μυ των ανθρώπων και των αρουραίων.

Στα ψάρια, λίγες μελέτες έχουν εξετάσει τη ρύθμιση της LPL στα ψάρια και μόνο στη μελέτη που διεξήχθη στην ιριδίζουσα πέστροφα, (Richard et al., 2006) εξετάστηκαν ταυτόχρονα η δραστηριότητα και η έκφραση της LPL σε διαφορετικούς ιστούς. Σε επόμενη μελέτη παρουσιάστηκε μια μειωμένη ρύθμιση της δραστηριότητας LPL λιπώδους ιστού λόγω νηστείας στην πέστροφα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στον ερυθρό μυ (Black et al., 1986, Albalat et al., 2006). Πιο πρόσφατα, μια μελέτη στην τσιπούρα έδειξε παραλλαγές στην έκφραση της LPL του λιπώδους ιστού με βάση τις αλλαγές στις πηγές διατροφικών πρωτεϊνών (Saera-Vila et al., 2005). Ωστόσο, υπάρχουν πολύ λίγες πληροφορίες σχετικά με την πιθανή επίδραση της διατροφής στις ορμόνες που σχετίζονται με τη δράση ή την έκφραση της LPL στα ψάρια.

### 8.3.3 Ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL)

Η ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL) είναι ένα ένζυμο με δράση υδρολάσης σερίνης που συμμετέχει στη λιπόλυση. Σε σύγκριση με άλλες λιπάσες, η ευαίσθητη στις ορμόνες λιπάση παρουσιάζει μια ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος. Υδρολύει όλες τις ακυλογλυκερόλες (τριακυλογλυκερόλη, διακυλογλυκερόλη και μονοακυλογλυκερόλη) καθώς και εστέρες χοληστερόλης, εστέρες στεροειδών λιπαρών οξέων, ρετινυλεστέρες και ρ-νιτροφαινυλεστέρες. Η ενζυμική της δραστηριότητα εντείνεται αποκρινόμενη σε ορμόνες που αυξάνουν τα ενδοκυτταρικά επίπεδα του cAMP (Kraemer et al., 2002).

Η υδρόλυση των τριακυλογλυκερολών (TAG) στα λιποκύτταρα είναι μια σταδιακή αντίδραση που καταλύεται από τρεις λιπάσες. Ανάλογα με τη ζήτηση ενέργειας, η λιπάση τριακυλογλυκερολών λιπώδους ιστού (ATGL) υδρογονώνει TAGs, δημιουργώντας διακυλογλυκερόλες (DAGs) και μη εστεροποιημένα λιπαρά οξέα (NEFAs). Η ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL) στη συνέχεια καταλύει την υδρόλυση των DAGs σε μονοακυλογλυκερόλες (MAGs) και NEFAs, και τέλος η λιπάση μονοακυλογλυκερολών (MGL) υδρολύει τα MAGs σε γλυκερόλες και NEFAs. Τα προκύπτοντα NEFA μεταφέρονται σε άλλα όργανα μέσω της κυκλοφορίας του αίματος και χρησιμοποιούνται για τα υποστρώματα β-οξειδωσης ή επαναεστεροποίησης (Khieokhajonkhet et al., 2014).

Ποντίκια με ανεπάρκεια σε ATGL, HSL και MGL παρουσίασαν χαμηλά επίπεδα NEFA σε κυκλοφορία υπό ορισμένες συνθήκες, υποδηλώνοντας ότι αυτές οι λιπάσες είναι κρίσιμοι ρυθμιστές του μεταβολισμού των λιπιδίων ολόκληρου του σώματος στα ποντίκια. Είναι σημαντικό ότι η HSL έχει μια ευρεία εξειδίκευση υποστρώματος και συμμετέχει στον καταβολισμό ενός ευρέος φάσματος εστέρων, συμπεριλαμβανομένων

των TAG, DAG, MAG, χοληστερυλεστέρα (CE), ρετινυλεστέρα και στεροειδούς εστέρα. Έτσι, η HSL θα συμμετείχε στον καταβολισμό των TAG και MAG στα λιποκύτταρα, αν και η δραστηριότητα της HSL κατά των DAG είναι δεκαπλάσια και πενταπλάσια από εκείνη των TAG και MAG, αντίστοιχα (Lehner et al., 2016).

Η ορμονική ρύθμιση έχει μελετηθεί για την HSL χρησιμοποιώντας λιποκύτταρα θηλαστικών. Η δραστηριότητα της HSL ενισχύεται από αρκετές ορμόνες, όπως η κατεχολαμίνη, η αδρενοκορτικοτροπίνη (ACTH) και η γλυκαγόνη. Αυτές οι ορμόνες αυξάνουν το επίπεδο ενδοκυτταρικής cAMP και επομένως της δραστηριότητας πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), οδηγώντας στη φωσφορυλίωση της HSL σε τουλάχιστον τρία υπολείμματα σερίνης. Από την άλλη πλευρά, η δραστηριότητα της HSL είναι γνωστό ότι καταστέλλεται από την ινσουλίνη. Αυτή η αντι-λιπολυτική επίδραση της ινσουλίνης οφείλεται κυρίως στην ικανότητά της να μειώνει τα επίπεδα ενδοκυτταρικού cAMP ενεργοποιώντας τη φωσφοδιεστεράση (Lehner et al., 2016).

Τα cDNAs που κωδικοποιούν την HSL έχουν κλωνοποιηθεί σε διάφορα θηλαστικά συμπεριλαμβανομένων των πρωτεύοντων, των τρωκτικών και των σαρκοφάγων. Η HSL θεωρείται μωσαϊκή πρωτεΐνη, και σχετίζεται με άλλες λιπάσες όπως η παγκρεατική λιπάση, η λιπάση λιποπρωτεϊνών και η ηπατική λιπάση. Ωστόσο, μέχρι στιγμής έχουν αναγνωριστεί λίγα γονίδια της HSL και η λειτουργία και η μοριακή εξέλιξή της παραμένουν σε μεγάλο βαθμό άγνωστες. Πρόσφατα, ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά δύο γονίδια της HSL, τα HSL1 και HSL2, στην πέστροφα. Είναι πιθανό ότι η HSL έχει λιπολυτικό ρόλο δεδομένου ότι τα επίπεδα mRNA αυτών των γονιδίων της HSL στον λιπώδη ιστό, επηρεάζονται από τη νηστεία (Jian et al., 2016).

#### 8.3.4 Μυοστατίνη 1 (MSTN1)

Η μυοστατίνη (MSTN) ή αυξητικός παράγοντας διαφοροποίησης 8 (GDF-8) είναι μέλος της υπερικογένειας των αυξητικών παραγόντων μετασχηματισμού β (TGF-β) και αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή της ανάπτυξης των σκελετικών μυών. Η αναστολή της ανάπτυξης των μυών πιστεύεται ότι συμβαίνει με αρνητική ρύθμιση τόσο του πολλαπλασιασμού των μυοβλαστών όσο και της διαφοροποίησης. Τα ποντίκια knock-out σε MSTN έχουν δύο έως τρεις φορές μεγαλύτερη μυϊκή μάζα από τα ποντίκια άγριου τύπου, κυρίως λόγω της αύξησης του αριθμού των μυϊκών ινών (υπερπλασία) και της διαμέτρου των ινών (υπερτροφία) (Welle et al., 2009).

Η μυοστατίνη εκκρίνεται από τα αναπτυσσόμενα μυϊκά κύτταρα και μειώνει τόσο το ρυθμό της κυτταρικής διαίρεσης των μυοβλαστών όσο και την αύξηση του μεγέθους των μυϊκών ινών. Στο έμβρυο, το γονίδιο MSTN αρχικά εκφράζεται στο κεντρικό τμήμα του δερμομυοτομίου, ανάμεσα σε περιοχές που παράγουν τους μυοβλάστες. Σε επόμενα στάδια, εκφράζεται στους μυοβλάστες αλλά και σε κάποια άλλα τμήματα του μεσεγχυματικού ιστού στις καταβολές των άκρων. Η πρώιμη έκφραση του γονιδίου MSTN σε ιστούς που γειτνιάζουν με τον αναπτυσσόμενο μυϊκό ιστό υποδεικνύει ότι ενδεχομένως να παίζει ρόλο αρχικά στον καθορισμό των ορίων των μυογενών περιοχών, ενώ έπειτα εμπλέκεται στη ρύθμιση της αύξησης μέσω αρνητικής ανατροφοδότησης (Slack, 2007).

Μελέτες έχουν δείξει ότι σε αντίθεση με τα θηλαστικά, τα ψάρια διαθέτουν τουλάχιστον δύο διακριτά γονίδια MSTN με διαφορετική έκφραση, πιθανώς ως αποτέλεσμα του διπλασιασμού ολόκληρου του γονιδιώματος (WGD). Μια ολοκληρωμένη φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι πολλά από τα γονίδια στα σολομοειδή, που προηγουμένως ταυτοποιήθηκαν ως MSTN-2, είναι στην πραγματικότητα MSTN-1 ορθόλογα και επαναταξινομήθηκαν ως MSTN-1a και MSTN-1b. Ωστόσο, η ομοιότητα και η ομαδοποίηση αλληλουχιών υποστήριξαν την ύπαρξη MSTN-2 στη σουπούρα (*Sparus aurata*). Αυτές οι μελέτες έχουν επίσης δείξει ότι, σε αντίθεση με τα θηλαστικά, τα ψάρια εκφράζουν MSTN όχι μόνο σε ερυθρό και λευκό μυ, αλλά και σε άλλους ιστούς, υποδηλώνοντας ότι το MSTN μπορεί να λειτουργεί στα ψάρια όχι μόνο στην ανάπτυξη αλλά και σε άλλες φυσιολογικές διαδικασίες. Το πρότυπο έκφρασης των δύο γονιδίων διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ειδών ψαριών. Στη *Sparus aurata*, το MSTN-1 εκφράζεται σε όλους τους ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των

μυών, ενώ το MSTN-2 εκφράζεται κυρίως στον εγκέφαλο συμπεριλαμβανομένων των οσφρητικών και οπτικών λοβών (Maccatrozzo et al. 2001).

Ο διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος (WGD) είναι μια σημαντική κινητήρια δύναμη στην εξέλιξη της πολυπλοκότητας. Έχει προταθεί ότι τα σπονδυλωτά υποβλήθηκαν σε τουλάχιστον δύο γύρους αναπαραγωγής ολόκληρου του γονιδιώματος: η πρώτη στην περίοδο εμφάνισης των γναθοστομάτων και η δεύτερη κάπου κατά μήκος της γενεαλογίας που οδηγεί σε τελεόστεους. Ο διπλασιασμός ολόκληρου του γονιδιώματος (WGD) είχε ως αποτέλεσμα τη δυνατότητα απόκτησης νέων λειτουργιών, καθώς και τη δυνατότητα πιο μακροχρόνιας επιβίωσης σε περίπτωση που ένα από τα δύο αντίγραφα των διπλασιασμένων γονιδίων παρουσίαζαν απώλεια λειτουργίας λόγω συσσωρευμένων μεταλλάξεων.

Η μυστατίνη (MSTN) και ο παράγοντας ανάπτυξης/διαφοροποίησης 11 (GDF-11) είναι πολύ συγγενή μέλη της υπερικογένειας των αυξητικών παραγόντων μετασχηματισμού β (TGF-β). Αυτοί οι δύο αναπτυξιακοί παράγοντες φαίνεται να έχουν εξελιχθεί μέσα από τα πολλαπλά γεγονότα του διπλασιασμού του γονιδιώματος από το ίδιο MSTN/GDF-11 γονίδιο. Έτσι οι τελεόστεοι έχουν ένα γονίδιο GDF-11 και τουλάχιστον δύο παράλογα του γονιδίου MSTN (MSTN-1 και MSTN-2) (Maccatrozzo et al., 2001).



## ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟ ΠΛΑΙΣΙΟ

Η αντικατάσταση του ιχθυάλευρου στις ζωοτροφές είναι μία από τις κύριες προκλήσεις στην υδατοκαλλιέργεια προκειμένου να διασφαλιστεί η βιωσιμότητα της παραγωγής των ειδών υδατοκαλλιέργειας, ειδικά σε σαρκοφάγα είδη. Οι φυτικές ζωοτροφές έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποκατάστατα προκειμένου να μειωθεί η χρήση των ιχθυάλευρων καθώς τα φυτικά υποκατάστατα υποστηρίζουν πιο οικονομικές και περιβαλλοντικά βιώσιμες ζωοτροφές σε σύγκριση με τα ιχθυάλευρα.

Η παραγωγή αποδοτικών ζώων, συμπεριλαμβανομένων των ψαριών, αποτελεί σημαντικό ζήτημα για τους κλάδους της ζωικής παραγωγής καθώς συνεπάγεται τη μείωση της ποσότητας ζωοτροφών ανά κιλό ζωικής μάζας που παράγεται και συμβάλλει στη μείωση των περιβαλλοντικών αποβλήτων και των εκπομπών αερίων θερμοκηπίου. Η απόδοση των ζωοτροφών βελτιώνεται συστηματικά με στρατηγικές αναπαραγωγής και διατροφής. Ωστόσο, η χρήση εναλλακτικών πηγών ζωοτροφών, με χαμηλό οικολογικό αποτύπωμα, που δεν ανταγωνίζονται τα τρόφιμα για τον άνθρωπο, αποτελεί πρόκληση για τις σημερινές και τις μελλοντικές στρατηγικές διατροφής.

Η καταγεγραμμένη τάση και ανάγκη για λιγότερη χρήση των ιχθυαλεύρων και ιχθυελαίων στις ιχθυοτροφές οδηγεί στην χρήση όλο και περισσότερων φυτικών πρώτων υλών, που εισάγουν καινοφανείς επιδράσεις στη φυσιολογία των εκτρεφόμενων ψαριών. Οι φυτικές πρώτες ύλες περιέχουν σημαντικό ποσοστό αντιδιατροφικών παραγόντων που οδηγούν σε μειωμένο ρυθμό αύξησης και υποβαθμισμένη μετατρεψιμότητα τροφής. Η επιλογή ατόμων που θα αξιοποιούν καλύτερα ιχθυοτροφές που έχουν στην σύνθεσή τους πρώτες ύλες με τα παραπάνω χαρακτηριστικά, θα συντελέσει στη διασφάλιση της βιώσιμης συνέχειας της Μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας.

Μία σημαντική συνιστώσα του κόστους παραγωγής αποδοτικών ψαριών είναι ο λόγος μετατρεψιμότητας της τροφής (Feed Conversion Rate, FCR) όπου το συνολικό βάρος των ζωοτροφών διαιρείται με την καθαρή παραγωγή (τελικό βάρος μείον το αρχικό βάρος) όπως παρουσιάζεται στον τύπο:

$$FCR = \frac{\text{Παρεχόμενη Τροφή (Kg)}}{\text{Αύξηση βάρους ζώου (Kg)}}$$

Έτσι είναι απαραίτητη η μέτρηση της ποσότητας τροφής που καταναλώνει το κάθε ψάρι, ιδιαίτερα σε περιβάλλοντα κοινής εκτροφής με άλλα ψάρια (κλωβοί ή δεξαμενές), καθώς συνεπάγεται τη μείωση της ποσότητας ζωοτροφών ανά κιλό ζωικής μάζας που παράγεται και συμβάλλει στη μείωση των περιβαλλοντικών αποβλήτων και των εκπομπών.

## Σκοπός Εργασίας

Η τσιπούρα αποτελεί ένα βασικό εκτρεφόμενο είδος ψαριού στη περιοχή της Μεσογείου και για αυτό το λόγο παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον. Συνεπώς, υπάρχει αυξημένη ζήτηση ανάπτυξης μεθόδων που να ελέγχουν την ποιότητα και την ανάπτυξη αυτού του είδους σε όλα τα στάδια παραγωγής του. Έτσι, απαραίτητο στοιχείο είναι η γνώση των μηχανισμών αύξησης του ψαριού που σχετίζονται με την αύξηση των μυών, με στόχο τη βελτιστοποίηση του παραγόμενου προϊόντος όσο αφορά είτε στη διατροφική του αξία είτε στο οικονομικό του όφελος.

Σκοπός της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας μεθοδολογίας επιλογής γεννητόρων ιχθύων με βάση την αποτελεσματικότητα που επιδεικνύουν στην διατροφή τους. Για την ανάπτυξη της νέας μεθοδολογίας, μελετήθηκαν υποψήφια γονίδια που σχετίζονται σημαντικά με το ρυθμό μετατρεψιμότητας σιτηρεσίων διαφορετικής σύστασης. Συγκεκριμένα, έγινε μελέτη των επιπέδων έκφρασης των γονιδίων της ελαφριάς αλυσίδας με ικανότητα φωσφορυλίωσης του ταχέως μυός της μουσίνης τύπου A (*MYLPF A*) και τύπου B (*MYLPF B*), του γονιδίου της μουστατίνης 1 (*MSTN1*), της λιποπρωτεϊνικής λιπάσης (*LPL*) και της ορμονοευαίσθητης λιπάσης (*HSL*) στο λευκό μυ της τσιπούρας (*Sparus aurata*). Η υλοποίηση της παραπάνω εργασίας θα οδηγήσει στην ανίχνευση γονιδίων που σχετίζονται σημαντικά με το ρυθμό μετατρεψιμότητας ιχθυοτροφών διαφορετικής σύστασης και κατ' επέκταση στην επιλογή ιχθυδίων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γεννήτορες και τα οποία επιδεικνύουν αποτελεσματικότερη μετατρεψιμότητα σιτηρεσίων υψηλής περιεκτικότητας σε φυτικά συστατικά, πράγμα που θα οδηγήσει στη μείωση του κόστους παραγωγής και στην αύξηση της μαζικής εκτροφής της τσιπούρας.

## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

### 1. Δειγματοληψία ιχθύων και διατροφικές πληροφορίες

Τα δείγματα ιχθύων *Sparus aurata* προήλθαν από δειγματοληψία που έγινε το καλοκαίρι του 2019 σε ιχθυοκαλλιέργειες εντατικής εκτροφής της εταιρίας ΝΗΡΕΑΣ στην Πάλαιρο Αιτωλοακαρνανίας. Τα ψάρια της δειγματοληψίας ήταν ενήλικα αλλά όχι αναπαραγωγικά ώριμα και ανάλογα με την τροφή που τους χορηγήθηκε προκύπτουν δύο ομάδες. Η κάθε ομάδα αποτελούνταν από 10 οικογένειες.

Οι ομάδες διαχωρίστηκαν αρχικά σε control (ομάδα μάρτυρας) & plant (πειραματική ομάδα), ανάλογα με τον τύπο τροφής που τους χορηγήθηκε. Στην ομάδα plant χορηγήθηκε ιχθυοτροφή πλούσια σε πρώτες ύλες φυτικής προέλευσης, ενώ στην κατηγορία control χορηγήθηκε η εμπορική ιχθυοτροφή που χρησιμοποιεί η συγκεκριμένη μονάδα ιχθυοκαλλιέργειας στην οποία έγινε η δειγματοληψία. Και οι δύο τροφές θα περιέχουν πρώτες ύλες τόσο θαλάσσιας όσο και φυτικής προέλευσης. Η τρέχουσα εμπορική τροφή (control) έχει ως κύριες πρώτες ύλες είναι το ιχθυάλευρο και το ιχθυέλαιο. Στην plant τροφή έγινε αντικατάσταση του 50% των ιχθυαλεύρων από φυτικές πρώτες ύλες (Πίνακας 1). Οι κύριες πρώτες ύλες που χρησιμοποιήθηκαν για την αντικατάσταση του ιχθυαλεύρου είναι τα υποπροϊόντα σόγιας (σογιάλευρο - συμπυκνωμένη πρωτεΐνη σόγιας) και το κραμβάλευρο. Τα συστατικά της κάθε ιχθυοτροφής φαίνονται αναλυτικά στον Πίνακα 2. Οι δύο τροφές ήταν ισο-ενεργές (18,2Mj/Kg), ισο-πρωτεϊνικές (45%) και ισο-λιπαρές (20%) με ισοδύναμη αναλογία αμινοξέων και λιπαρών οξέων.

Επίσης, σε κάθε μία από τις δύο παραπάνω ομάδες, οι οικογένειες F3, F5, F6, F8 είναι οικογένειες με επιθυμητά χαρακτηριστικά υψηλό μέσο βάρος και μικρή παραλλακτικότητα βάρους μεταξύ των μελών της εκάστοτε οικογένειας. Αντίθετα, οι οικογένειες F11, F13, F14, F15, F17, F20 είναι οικογένειες με μικρό μέσο βάρος και αυξημένη παραλλακτικότητα.

**Πίνακας 1.** Σύνοψη των βασικών προδιαγραφών των τροφών που χρησιμοποιήθηκαν

| A/A | ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ             | ΤΡΟΦΗ ΜΑΡΤΥΡΑΣ<br>(Control) | ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΤΡΟΦΗ (Plant) |
|-----|--------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 1   | ΥΓΡΑΣΙΑ %                      | max 10%                     | max 10%                   |
| 2   | ΟΛΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ (Ο.Π.) %      | 45                          | 45                        |
| 3   | ΘΑΛΑΣΣΙΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ %ΟΠ        | 30                          | 15                        |
| 4   | ΦΥΤΙΚΕΣ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ %ΟΠ          | 70                          | 85                        |
| 5   | ΟΛΙΚΑ ΛΙΠΑΡΑ (Ο.Λ.) %          | 20                          | 20                        |
| 6   | ΛΙΠΟΣ ΘΑΛΑΣΣΙΑΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ %ΟΛ | 100                         | 100                       |
| 7   | ΛΙΠΟΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ %ΟΛ   | -                           | -                         |
| 8   | ΟΛΙΚΕΣ ΙΝΩΔΕΙΣ %               | 2,6                         | 3,6                       |
| 9   | ΟΛΙΚΗ ΤΕΦΡΑ %                  | 8                           | 5,5                       |
| 10  | ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ %                 | 17                          | 19,5                      |
| 11  | ΠΕΠΤΗ ΕΝΕΡΓΕΙΑ Mj/Kg           | 18,2                        | 18,2                      |
| 12  | Ω-3 ΛΙΠΑΡΑ %                   | 3                           | 3                         |
| 13  | ΕΡΑ %                          | 1                           | 1                         |
| 14  | ΔΗΑ %                          | 1,2                         | 1,2                       |
| 15  | Ω-3/Ω-6                        | >1,1                        | >1,1                      |

**Πίνακας 2.** Αναλυτική σύσταση των τροφών που χρησιμοποιήθηκαν

| ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ                        | % πρώτη ύλη/Kg ιχθυοτροφής  |                              |
|------------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
|                                    | ΤΡΟΦΗ ΜΑΡΤΥΡΑΣ<br>(Control) | ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΤΡΟΦΗ<br>(Plant) |
| ΣΙΤΑΡΙ ΜΑΛΛΑΚΟ                     | 8,40%                       | 8,10%                        |
| ΚΡΑΜΒΑΛΕΥΡΟ                        |                             | 15,00%                       |
| ΓΛΟΥΤΕΝΗ ΚΑΛΑΜΠΟΚΙΟΥ 60%           | 22,00%                      | 10,00%                       |
| ΣΥΜΠΥΚΝΩΜΕΝΗ ΠΡΩΤΕΙΝΗ ΣΟΓΙΑΣ       | 5,20%                       | 23,80%                       |
| ΣΟΓΙΑΛΕΥΡΟ                         | 19,20%                      | 5,20%                        |
| ΓΛΟΥΤΕΝΗ ΣΙΤΟΥ                     |                             | 11,00%                       |
| ΗΛΙΑΛΕΥΡΟ                          | 9,50%                       |                              |
| ΙΧΘΥΑΛΕΥΡΟ STANDARD ΡΕΡΟΥ 67%      | 20,00%                      | 10,00%                       |
| ΙΧΘΥΕΛΑΙΟ                          | 5,10%                       | 5,00%                        |
| ΣΟΛΟΜΟΝΕΛΑΙΟ                       | 9,00%                       | 10,30%                       |
| ΦΩΣΦΟΡΙΚΟ ΜΟΝΟΑΣΒΕΣΤΙΟ             | 0,60%                       | 0,60%                        |
| ΠΡΟΜΙΓΜΑ ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ - ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΩΝ | 1,00%                       | 1,00%                        |
| ΣΥΝΟΛΟ                             | 100,00%                     | 100,00%                      |

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Απομόνωση του RNA

Τα δείγματα λευκού μυός ήταν αποθηκευμένα στον καταψύκτη στους -20°C. Η προστασία των δειγμάτων στην κατάψυξη γίνεται με τη χρήση του αντιδραστηρίου RNeasy<sup>®</sup> RNA stabilization reagent, το οποίο εισχωρεί στο εσωτερικό των κυττάρων και απενεργοποιεί τις πρωτεΐνες παρεμποδίζοντας τόσο τη μεταγραφή νέων γονιδίων όσο και τη δράση των μορίων RNάσης.

Πριν ξεκινήσει η αναλυτική περιγραφή των σταδίων για την απομόνωση RNA, κρίνεται απαραίτητο να επισημανθεί ότι η λαβίδα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τη ζύγιση κατάλληλης ποσότητας ιστού, αλλά και οποιοδήποτε υλικό χρησιμοποιηθεί κατά τη διαδικασία είναι αποστειρωμένα. Επίσης, όλη η διαδικασία απομόνωσης του RNA έγινε μέσα σε απαγωγό.

Η απομόνωση του RNA έγινε με το αντιδραστήριο NucleoZOL. Το NucleoZOL έχει σχεδιαστεί για την απομόνωση του ολικού RNA (μικρό και μεγάλο RNA) σε ένα μόνο κλάσμα ή σε ξεχωριστά κλάσματα από μια ποικιλία υλικών δειγματος, όπως κύτταρα, ιστοί και υγρά ανθρώπινης ή ζωικής προέλευσης, φυτά, μαγιά, βακτήρια και ιικά υλικά. Ένας από τους πιο σημαντικούς παράγοντες κατά την απομόνωση του RNA είναι η

αποτροπή της αποδόμησης. Πρώτον, τα κύτταρα και οι ιστοί λύνονται και ομογενοποιούνται σε αντιδραστήριο NucleoZOL σε θειοκυανική γουανιδίνη και φαινόλη. Η θειοκυανική γουανιδίνη (Guanidinium thiocyanate) αποδιατάσσει πρωτεΐνες και RNάσες και διαχωρίζει το rRNA από τις ριβοσωμικές πρωτεΐνες, ενώ η φαινόλη, (και η ισοπροπανόλη) έχουν μικρή διαλυτότητα. Μόρια επιμόλυνσης όπως DNA, πολυσακχαρίτες, και πρωτεΐνες καθιζάνουν με την προσθήκη νερού και απομακρύνονται με φυγοκέντρηση. Η διαδικασία NucleoZOL επιτρέπει την ξεχωριστή απομόνωση μικρών και μεγάλων RNA με προσθήκη αιθανόλης και ισοπροπανόλης, αντίστοιχα. Το RNA μπορεί να ανασυσταθεί με νερό χωρίς RNase (RNase-free water). Δεν απαιτείται ο διαχωρισμός φάσης που προκαλείται από χλωροφόρμιο για απομόνωση RNA υψηλής ποιότητας.

Αναλυτικά τα στάδια του πειραματικού πρωτοκόλλου για την απομόνωση του RNA είναι τα εξής:

- ❖ Τα αποθηκευμένα δείγματα στο αντιδραστήριο RNAlater® RNA stabilization reagent μεταφέρονται από τον καταψύκτη (στους -20°C) στον πάγο
- ❖ Με αποστειρωμένη εργαλεία τα δείγματα τεμαχίζονται και ζυγίζεται 25mg λευκού μυός
- ❖ Τα 25mg λευκού μυός μεταφέρονται σε σωληνάρια που περιέχουν ένα γυάλινα και ασάλινα μικροσφαιρίδια και 500ml από το αντιδραστήριο NucleoZOL
- ❖ Τα δείγματα ομογενοποιούνται με ανακίνηση για 1 λεπτό στις 8.000rpm. Με αυτό τον τρόπο τα μικροσφαιρίδια ομογενοποιούν τον ιστό λύοντας τα κύτταρα οπότε απελευθερώνονται DNA, RNA, πρωτεΐνες και όλα τα υποκυτταρικά οργανίδια
- ❖ Τα ομογενοποιημένα δείγματα φυγοκεντρώνται για 5 λεπτά στις 10.000rpm, ώστε να διαχωριστούν τα μικροσφαιρίδια από το ομογενοποιημένο δείγμα
- ❖ Μεταφέρεται το υπερκείμενο σε νέα σωληνάρια
- ❖ Ακολουθεί προσθήκη 200μl νερού χωρίς RNase (RNase free water) ή DEPC water (Diethyl pyrocarbonate), γίνεται ανακίνηση για 15 δευτερόλεπτα και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά
- ❖ Έπεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 λεπτά στις 12.000rpm σε θερμοκρασία δωματίου. Έτσι, δημιουργείται ένα ημιστερέο ίζημα που περιέχει DNA, πρωτεΐνες και πολυσακχαρίδια. Το RNA είναι ακόμα διαλυτοποιημένο στο υπερκείμενο. Το ίζημα που περιέχει DNA, πρωτεΐνη και πολυσακχαρίδια αποτελεί περίπου το 10% του όγκου του συνολικού μείγματος ομογενοποιήματος-νερού
- ❖ Γίνεται μεταφορά 500μl από το υπερκείμενο σε νέα σωληνάρια
- ❖ Προστίθενται 500μl ισοπροπανόλης έτσι ώστε να δεσμευτεί και να κατακρημνιστεί το RNA και γίνεται επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- ❖ Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 12.000rpm και έτσι κατακρημνίζεται το RNA ως λευκό ίζημα
- ❖ Απορρίπτεται το υπερκείμενο με προσοχή έτσι ώστε να μη χαθεί ποσότητα από το ίζημα
- ❖ Προστίθενται 500μl αιθανόλης 75% για την έκπλυση του RNA και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 8.000rpm. Γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου
- ❖ Επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα
- ❖ Τέλος, για την επαναδιάλυση του RNA προστίθενται 20μl DEPC/nuclease free water, ανακινείται σε vortex και επωάζεται για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης και καθαρότητας του RNA χρησιμοποιήθηκαν 2μl από το κάθε δείγμα και ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης σε μήκη κύματος 260nm και 280nm. Για την εκτίμηση της καθαρότητας του RNA υπολογίζεται ο λόγος A260 / A280. Τιμές από 1,8 έως 2,1 αντιστοιχούν σε πολύ καθαρό RNA.

## 2.2 Πέψη με DNάση

Η πέψη με DNάση είναι το επόμενο βήμα μετά την εκχύλιση του RNA που αποσκοπεί στην αποτελεσματικότερη απομάκρυνση του γενομικού DNA του ιστού, έτσι ώστε το δείγμα RNA που παραλαμβάνεται να είναι πλήρως απαλλαγμένο από τυχόν επιμόλυνση με γενομικό DNA. Η DNase είναι ένζυμο που αποτελεί ένα είδος νουκλεάσης διότι καταλύει την υδρολυτική διάσπαση των φωσφοδιεστερικών δεσμών του DNA. Συγκεκριμένα, είναι μια ενδονουκλεάση που διασπά μονόκλωνα και δίκλωνα μόρια DNA υδρολύοντας φωσφοδιεστερικούς δεσμούς που παράγουν μονο- και ολιγοδεοξυριβονουκλεοτίδια με 5'-φωσφορικές και 3'-OH ομάδες. Η ενζυμική δραστηριότητα του ενζύμου εξαρτάται αυστηρά από το  $\text{Ca}^{2+}$  και ενεργοποιείται από ιόντα  $\text{Mg}^{2+}$  ή  $\text{Mn}^{2+}$ . Πρόκειται για ανασυνδυασμένο ένζυμο (recombinant DNase, rDNase I) που παρέχεται σε κιτ (DNA-free™ DNase treatment Kit) της εταιρείας Invitrogen, στο οποίο περιέχονται ακόμη τα Nuclease-free water, Buffer, Inactivation reagent. Μετά το τέλος της δράσης της DNάσης είναι απαραίτητη η απομάκρυνσή της. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιείται ο παράγοντας απενεργοποίησης (Inactivation reagent) που προστίθεται στα τελευταία στάδια της διαδικασίας, με σκοπό να απενεργοποιήσει τη DNάση και να αφαιρέσει τα δυσθνή κατιόντα (όπως μαγνήσιο και ασβέστιο) που μπορεί να προκαλέσουν υποβάθμιση της ποιότητας του RNA.

Αναλυτικά τα στάδια του πειραματικού πρωτοκόλλου για την πέψη με DNase είναι τα εξής:

- ❖ Αρχικά, σε ένα σωληνάριο αναμιγνύεται το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) και το ένζυμο rDNase I.
- ❖ Σε σωληνάρια προστίθενται 3μl από το μίγμα και 20μl του δείγματος.
- ❖ Τα δείγματα επωάζονται στον θερμοκυκλοποιητή για 30 λεπτά στους 37°C όπου είναι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση του ενζύμου
- ❖ Μετά το τέλος της αντίδρασης προστίθενται στα σωληνάρια 2μl DNase Inactivation reagent. Γίνεται συνεχής ανακίνησή τους και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 λεπτά
- ❖ Μετά από 2 λεπτά τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 1,5 λεπτό στις 10.000rpm. Σχηματίζεται έτσι ένα λευκό ίζημα το οποίο περιέχει το σύμπλοκο της rDNase I και του Inactivation reagent
- ❖ Το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης που περιέχει το RNA μεταφέρεται σε νέο σωληνάριο.

Για την εκτίμηση της συγκέντρωσης και καθαρότητας του RNA μετά τη χρήση της DNase χρησιμοποιήθηκαν 2μl από το κάθε δείγμα και ακολούθησε μέτρηση της απορρόφησης σε μήκος κύματος 260nm και 280 nm.

Παράλληλα, για την εκτίμηση της συγκέντρωσης και καθαρότητας του RNA τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Το άθικτο ολικό RNA που ηλεκτροφορείται υπό αποδιατακτικές συνθήκες εμφανίζει αιχμηρές ζώνες 28S και 18S rRNA (ευκαρυωτικά δείγματα). Η ζώνη 28S rRNA πρέπει να είναι περίπου δύο φορές πιο έντονη από τη ζώνη 18S rRNA. Αυτή η αναλογία 2:1 (28S:18S) είναι μια καλή ένδειξη ότι το RNA είναι ανέπαφο. Μερικώς αποικοδομημένο RNA εμφανίζει νεφέλωμα (smear) και δεν εμφανίζει τις αιχμηρές ζώνες rRNA ή δεν εμφανίζει αναλογία 2:1. Το πλήρως αποικοδομημένο RNA θα εμφανιστεί ως ζώνη πολύ χαμηλού μοριακού βάρους.

## 2.3 Σύνθεση cDNA

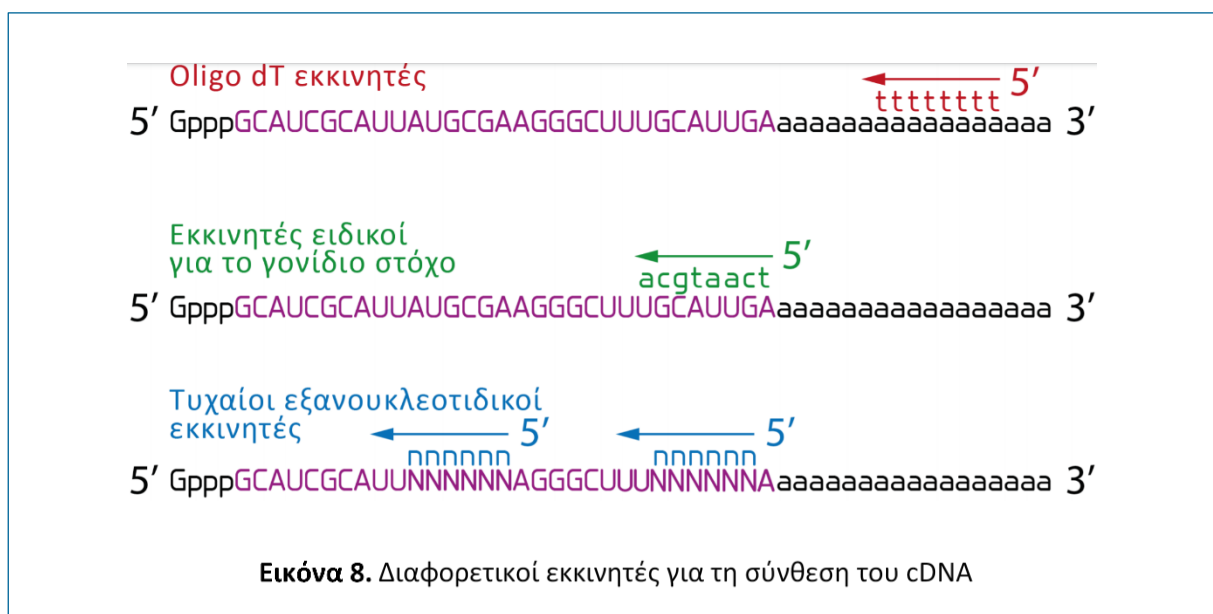
Στα cDNA strips, τα οποία προετοιμάζονται αμέσως μετά την απομόνωση του RNA, προστίθενται το κατάλληλο μίγμα που περιέχει τους εκκινητές για την παραγωγή του cDNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής. Αντίστροφη μεταγραφή, Reverse Transcription (RT), ονομάζεται η σύνθεση μιας συμπληρωματικής (complementary) αλυσίδας DNA (cDNA) έχοντας ως εκμαγείο ένα μόριο RNA. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφή (ή αντίστροφη τρανσκριπτάση), το οποίο στη φύση βρίσκεται σε RNA-ιούς (ρετροϊούς) όπως ο ιός HIV. Το ένζυμο μετατρέπει το γενετικό υλικό του ιού από τη μορφή του

μονόκλωνου RNA σε δίκλωνο DNA, έτσι ώστε να μπορεί να ενσωματωθεί στο γενετικό υλικό των κυττάρων ξενιστών.

Η αντίδραση σύνθεσης cDNA πραγματοποιείται στον θερμικό κυκλοποιητή και τα απαραίτητα αντιδραστήρια είναι η αντίστροφη μεταγραφάση, το αρχικό υλικό RNA, τα dNTPs και οι κατάλληλοι εκκινητές. Για τη σύνθεση cDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρία είδη εκκινητών (Εικόνα 8):

1. *Oligo-dT*: Οι εκκινητές αυτοί είναι ολιγονουκλεοτίδια θυμίνης που υβριδίζονται στην πολυ-A ουρά των mRNAs. Με τη χρήση τους μπορούν να συντεθούν ακέραια (ολόκληρα) τα μόρια mRNA, η χρήση τους όμως δεν συνιστάται σε περιπτώσεις μεγάλων μορίων mRNA, >4 Kb (το 5' άκρο τους δεν θα αντιπροσωπεύεται επαρκώς) ή όταν τα μόρια του RNA στόχου δεν έχουν πολυ-A ουρά (RNA προκαρυωτικών οργανισμών).
2. *Μίγμα τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών*: Οι εκκινητές αυτοί απαρτίζονται από ένα μίγμα ολιγονουκλεοτιδίων μήκους 6 βάσεων που έχουν τυχαία νουκλεοτιδική σύσταση. Θεωρείται ότι με τη χρήση του μίγματος των τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινητών επιτυγχάνεται πληρέστερη κάλυψη όλων των μορίων RNA (ανεξαρτήτως πολυ-A ουράς και σε όλο το μήκος τους).
3. *Εκκινητές ειδικοί για το γονίδιο στόχο*: Όταν το ζητούμενο είναι η αυξημένη ευαισθησία και ο έλεγχος ενός μόνο ή μικρού αριθμού γονιδίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν εκκινητές ειδικοί για τα επιθυμητά γονίδια. Στην πράξη, αυτή η μέθοδος δεν έχει ευρεία εφαρμογή, γιατί απαιτείται προτύπωση των συνθηκών της αντίδρασης για κάθε ξεχωριστό εκκινητή.

Η σύνθεση cDNA εκτελείται για χρονικό διάστημα 1 ώρας. Η αντίδραση καταλύεται από την αντίστροφη μεταγραφάση που συνθέτει DNA χρησιμοποιώντας σαν μήτρα RNA. Ο πολυμερισμός πραγματοποιείται, στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, με τη βοήθεια κατάλληλων εκκινητών, οι οποίοι υβριδοποιούνται στις αλληλουχίες-στόχους του RNA. Τότε η αντίστροφη μεταγραφάση δεσμεύεται και χρησιμοποιώντας τα dNTPs συνθέτει τη μονόκλωνη αλληλουχία DNA (cDNA). Μετά το πέρας της αντίδρασης σχηματίζεται ένα δίκλωνο υβριδικό μόριο που περιέχει μια αλυσίδα RNA και μια αλυσίδα DNA. Το νεοσυντεθέν cDNA είναι συμπληρωματικό του αρχικού RNA και η ουρακίλη έχει αντικατασταθεί από τη θυμίνη. Στη συνέχεια, η RNase H καταλύει τον αποχωρισμό των αλυσίδων DNA/RNA και με τη χρήση ενός δεύτερου εκκινητή δημιουργείται δίκλωνο μόριο DNA. (Εικόνα 9) Η σύνθεση του συμπληρωματικού DNA κλώνου γίνεται από το ένζυμο DNA πολυμεράση.



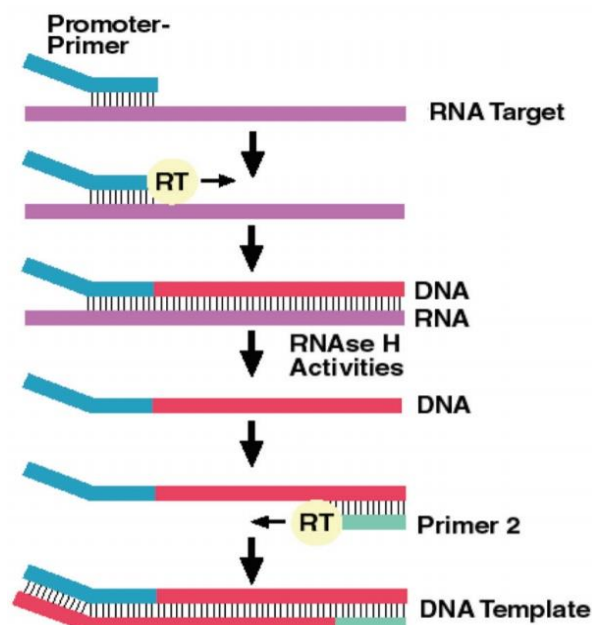


## 2.4 Στάδια σύνθεσης cDNA

Για κάθε οικογένεια επιλέχθηκαν τα οκτώ (8) καλύτερα δείγματα RNA για τη σύνθεση cDNA. Η ποσότητα ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του cDNA ήταν 1000ng σε όγκο 10μl. Το κιτ που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του cDNA είναι το High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor της εταιρείας Applied Biosystems. Οι ποσότητες που χρειάστηκαν για το master mix είναι οι εξής:

| Συστατικά                          | Όγκος (μl) |
|------------------------------------|------------|
| 10X RT Buffer                      | 2,0        |
| RT Random Primers Fw/Rv            | 2,0        |
| dNTP Mix                           | 0,8        |
| MultiScribe™ Reverse Transcriptase | 1,0        |
| RNase Inhibitor                    | 1,0        |
| Nuclease free water                | 3,2        |
| RNA (post DNase treatment)         | 10,0       |

Πρώτα προστέθηκε στα cDNA stripes το RNA και έπειτα το mix. Στη συνέχεια έγινε γρήγορο spin και τα cDNA strips τοποθετήθηκαν στο θερμοκυκλοποιητή. Οι συνθήκες που επικράτησαν στο θερμοκυκλοποιητή ήταν 25°C για 10min, 37°C για 120min που είναι η ιδανική θερμοκρασία για τη λειτουργία του ενζύμου και τέλος 85°C για 5min. Μετά τη σύνθεση του cDNA, τα cDNA δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20°C μέχρι τη χρήση τους.



Εικόνα 9. Στάδια σύνθεσης του cDNA

### 3. Real-Time PCR ή qPCR (quantitative PCR)

#### 3.1 Αρχή της μεθόδου

Η ποσοτική PCR έχει εξελιχθεί πολύ από το 1993 μέχρι σήμερα και πλέον αποτελεί μια γρήγορη, ευαίσθητη και αξιόπιστη μέθοδο ποσοτικοποίησης της γονιδιακής έκφρασης και χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό, την ανίχνευση καθώς και την ποσοτικοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA σε πραγματικό χρόνο. Στη συμβατική PCR, το ενισχυμένο προϊόν DNA, ή amplicon, ανιχνεύεται στο τελικό σημείο της αντίδρασης. Στην PCR πραγματικού χρόνου, η αύξηση του ενισχυμένου προϊόντος μετράται καθώς η αντίδραση εξελίσσεται, δηλαδή σε πραγματικό χρόνο, με ποσοτικοποίηση του προϊόντος μετά από κάθε κύκλο. Υπάρχει επομένως εκθετική αύξηση προϊόντων σε κάθε κύκλο. Υπάρχουν τρία βασικά βήματα στην αντίδραση PCR πραγματικού χρόνου η οποία επαναλαμβάνεται για 40 κύκλους.

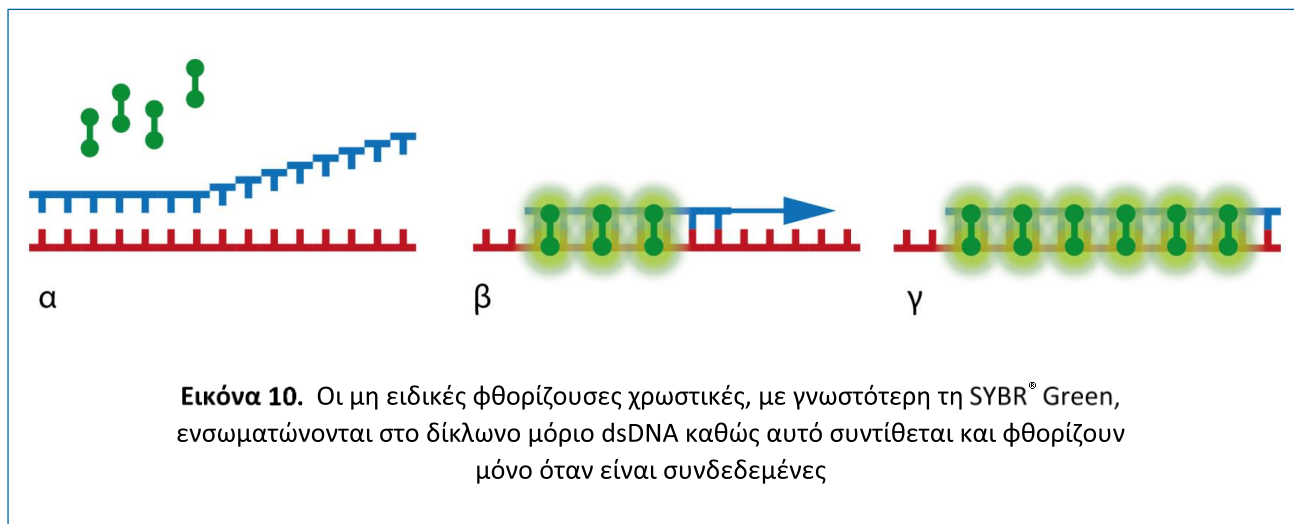
*Αποδιάταξη:* Η υψηλή θερμοκρασία χρησιμοποιείται για την «τήξη» δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο DNA αλλάζοντας τη δευτεροταγή δομή. Χρησιμοποιείται συνήθως η υψηλότερη θερμοκρασία στην οποία δεν καταστρέφεται η DNA πολυμεράση (συνήθως 95°C). Ο χρόνος αποδιάταξης μπορεί να αυξηθεί εάν το περιεχόμενο του προϊόντος σε GC είναι υψηλό.

*Υβριδισμός εκκινητών:* Κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου, οι συμπληρωματικές αλληλουχίες των εκκινητών έχουν την ευκαιρία να υβριδιστούν στο DNA υπό μια κατάλληλη θερμοκρασία που βασίζεται στην υπολογισμένη θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) των εκκινητών (5°C χαμηλότερη από την  $T_m$  του εκκινητή).

*Επιμήκυνση:* Στους 70-72°C, η δραστηριότητα της DNA πολυμεράσης είναι η βέλτιστη και η επέκταση των εκκινητών λαμβάνει χώρα με ρυθμούς έως και 100 βάσεις ανά δευτερόλεπτο. Όταν ένα amplicon στην PCR πραγματικού χρόνου είναι μικρό, αυτό το βήμα συχνά συνδυάζεται με το στάδιο υβριδισμού των εκκινητών χρησιμοποιώντας τους 60°C ως θερμοκρασία.

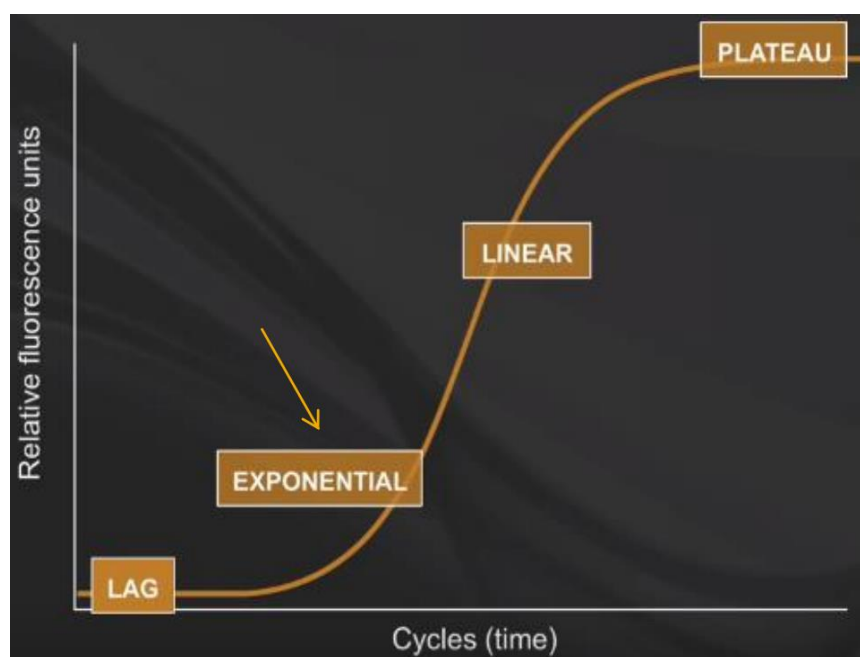
Η ανίχνευση των προϊόντων PCR σε κάθε κύκλο της αντίδρασης καθίσταται δυνατή με τη χρήση ειδικών φθορίζουσών χρωστικών που διεγείρονται και εκπέμπουν συγκεκριμένου μήκους κύματος φως και η εκπομπή φθορισμού τους αυξάνεται όσο αυξάνεται η ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος. Οι φθορίζουσες χρωστικές που χρησιμοποιούνται σήμερα στην ποσοτική PCR διακρίνονται σε ειδικές και μη ειδικές. Οι μη ειδικές φθορίζουσες χρωστικές, όπως η SYBR<sup>®</sup> Green (Εικόνα 10), παρουσιάζουν ελάχιστο ή μηδενικό φθορισμό όταν είναι ελεύθερες στο διάλυμα (A) και φθορίζουν όταν ενσωματώνονται στη μικρή αύλακα των δίκλωνων μορίων DNA (B και Γ). Οι ειδικές χρωστικές δεν είναι ελεύθερες στο διάλυμα, αλλά είναι προσδεμένες πάνω σε μικρά μόρια DNA (25-30 βάσεις) και υβριδίζονται στο γονίδιο στόχο ανάμεσα στους δύο εκκινητές. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες χρωστικές είναι οι ιχνηθέτες τύπου Taqman (Taqman Probes). Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκε η φθορίζουσα χρωστική SYBR<sup>®</sup> Green. Η χρωστική αυτή εμφανίζει ασθενή δέσμευση σε μονόκλωνο DNA αλλά ισχυρή δέσμευση σε δίκλωνο DNA. Η δεσμευμένη χρωστική φθορίζει στο πράσινο φάσμα και η ανίχνευση του φθορισμού γίνεται με τη βοήθεια laser (Life Technologies Corporation, 2012).

Η ποσοτική PCR εκτελείται σε εξειδικευμένα μηχανήματα (θερμικοί κυκλοποιητές πραγματικού χρόνου), εξοπλισμένα με ένα πολύπλοκο σύστημα κατόπτρων και φίλτρων που «διαβάζουν» τον φθορισμό που εκπέμπεται από διάφορες φθορίζουσες χρωστικές, καθώς αυτές ενσωματώνονται στα προϊόντα της PCR. Ο φθορισμός που υπολογίζεται κάθε φορά είναι ανάλογος με τη συνολική ποσότητα του προϊόντος. Το σήμα του φθορισμού, που αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της ποσότητας του amplicon που παράγεται σε κάθε κύκλο (Life Technologies Corporation, 2012).



### 3.2 Καμπύλη Ενίσχυσης (amplification plot)

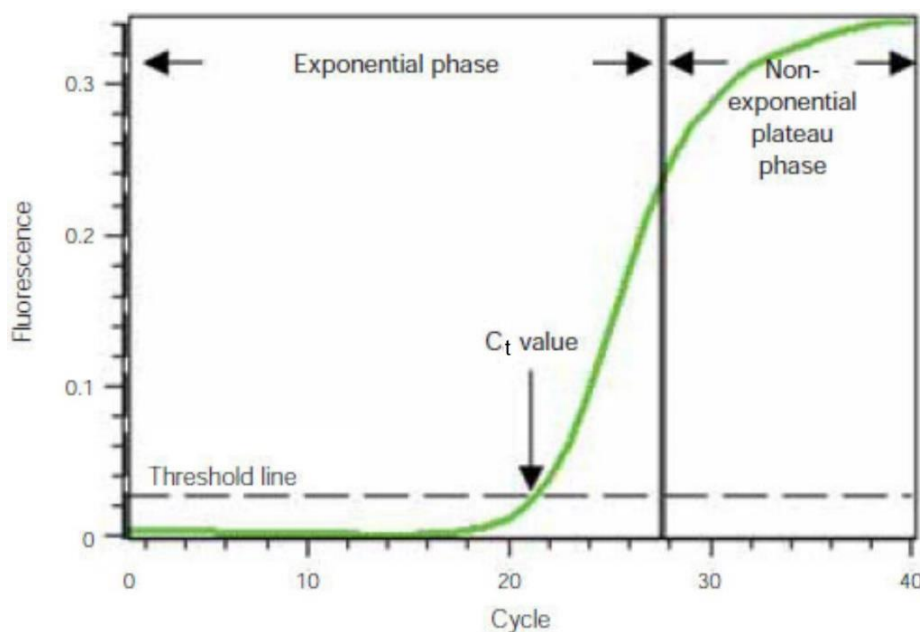
Από την ποσοτική PCR προκύπτει η καμπύλη ενίσχυσης (amplification plot) η οποία παρουσιάζει τέσσερις φάσεις κατά την ενίσχυση των προϊόντων: τη λανθάνουσα φάση (lag phase), την εκθετική φάση (exponential phase), τη γραμμική φάση (linear phase) και τη φάση πλατώ (plateau phase) (Εικόνα 11). Σε αυτό το διάγραμμα, ο αριθμός των κύκλων PCR φαίνεται στον άξονα X και ο φθορισμός από την αντίδραση ενίσχυσης, ο οποίος είναι ανάλογος με την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος, φαίνεται στον άξονα Y. Οι μετρήσεις γίνονται πάντα στην εκθετική φάση καθώς κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης, η ποσότητα του προϊόντος PCR διπλασιάζεται περίπου σε κάθε κύκλο. Καθώς προχωρά η αντίδραση, τα συστατικά της καταναλώνονται και τελικά ένα ή περισσότερα από αυτά την επιβραδύνουν ώστε να εισέλθει στη φάση plateau (κύκλοι 28-40 στην Εικόνα 11) (Life Technologies Corporation, 2012).



**Εικόνα 11.** Οι 4 φάσεις της καμπύλης ενίσχυσης

Αρχικά, στη λανθάνουσα φάση ο φθορισμός δεν ξεπερνά το βασικό επίπεδο και οι αυξήσεις του φθορισμού δεν είναι ανιχνεύσιμες (κύκλοι 1-18, Εικόνα 11) παρόλο που το προϊόν αυξάνεται εκθετικά. Τελικά, το ενισχυμένο προϊόν συσσωρεύεται για να δώσει ένα ανιχνεύσιμο σήμα φθορισμού. Ο αριθμός του κύκλου στον οποίο συμβαίνει αυτό ονομάζεται κύκλος ποσοτικοποίησης  $C_q$  (Quantitation cycle) ή τιμή  $C_t$  (threshold cycle). Η τιμή  $C_t$  δηλαδή, αντιστοιχεί στον κύκλο της αντίδρασης στον οποίο η ένταση του φθορισμού θα ξεπεράσει το βασικό επίπεδο και θα φτάσει μία συγκεκριμένο ουδό (κατώφλι) καταγραφής (Εικόνα 12). Το όριο αυτό υπολογίζεται αυτόματα από το μηχάνημα ανάλογα με τη διακύμανση των τιμών του βασικού επιπέδου. Επειδή η τιμή  $C_t$  μετράται στην εκθετική φάση όταν τα αντιδραστήρια δεν είναι περιορισμένα, η PCR πραγματικού χρόνου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον αξιόπιστο και ακριβή υπολογισμό της αρχικής ποσότητας του προϊόντος που υπάρχει στην αντίδραση με βάση τη γνωστή εκθετική συνάρτηση που περιγράφει την πρόοδο της αντίδρασης (Life Technologies Corporation, 2012).

Η τιμή  $C_t$  μιας αντίδρασης προσδιορίζεται κυρίως από την ποσότητα του προϊόντος που υπάρχει στην αρχή της αντίδρασης. Εάν υπάρχει μεγάλη ποσότητα αντιγράφων του γονιδίου στόχου στην αρχή της αντίδρασης, θα απαιτηθούν σχετικά λίγοι κύκλοι ενίσχυσης για να συσσωρευτεί αρκετό προϊόν για να δώσει ένα σήμα φθορισμού πάνω από το βασικό επίπεδο. Έτσι, η αντίδραση θα έχει χαμηλή ή σύντομη τιμή  $C_t$ . Αντίθετα, εάν υπάρχει μικρή ποσότητα αντιγράφων του γονιδίου στόχου κατά την έναρξη της αντίδρασης, θα απαιτηθούν περισσότεροι κύκλοι ενίσχυσης ώστε το σήμα φθορισμού να ανέβει πάνω από το βασικό επίπεδο. Έτσι, η αντίδραση θα έχει υψηλή ή αργή τιμή  $C_t$ . (Life Technologies Corporation, 2012).

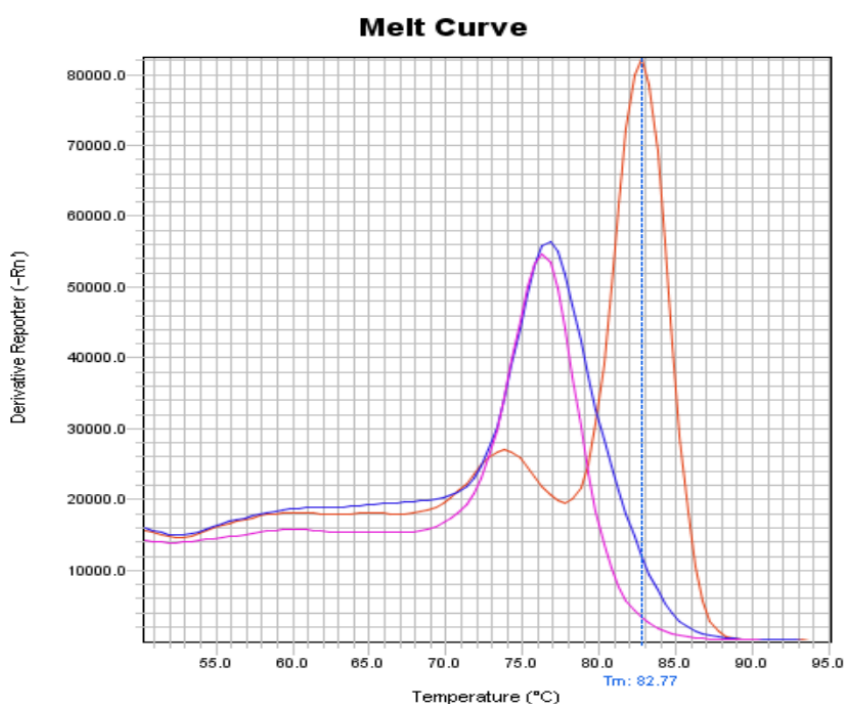


**Εικόνα 12.** Γραφική παράσταση της καμπύλης της αντίδρασης της ποσοτικής PCR. Η οριζόντια γραμμή δείχνει το κατώφλι (threshold) στο οποίο ο φθορισμός των προϊόντων της PCR αρχίζει να ξεχωρίζει από το βασικό επίπεδο (baseline). Ο κύκλος στον οποίο συμβαίνει αυτό αποδίδεται με την τιμή  $C_t$ , και είναι εκείνος κατά τον οποίο ο φθορισμός ξεπερνά το κατώφλι ανίχνευσης. Η τιμή  $C_t$  είναι απαραίτητη για την ποσοτικοποίηση του δείγματος. Δείγματα με πολλά αντίγραφα του γονιδίου στόχου έχουν μικρότερο  $C_t$  από δείγματα με λιγότερα αντίγραφα του γονιδίου στόχου

### 3.3 Καμπύλη Τήξης (Melting Curve)

Επιπλέον μία δυνατότητα που παρέχεται με τη τεχνολογία της Real Time PCR είναι η κατασκευή της καμπύλης αποδιάταξης ή καμπύλης τήξης (Melting Curve) (Εικόνα 13). Στηρίζεται στην απώλεια φθορισμού λόγω θερμοεπαγόμενης αποδιάταξης. Μια καμπύλη τήξης χαρτογραφεί την αλλαγή στον φθορισμό που παρατηρείται όταν δίκλωνο DNA (dsDNA) με ενσωματωμένη τη φθορίζουσα χρωστική διαχωρίζεται σε μονόκλωνο DNA (ssDNA) καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία της αντίδρασης. Για παράδειγμα, όταν θερμαίνεται το δίκλωνο DNA στο οποίο είναι προσδεσμένη η SYBR<sup>®</sup> Green ανιχνεύεται μια ξαφνική μείωση του φθορισμού όταν η θερμοκρασία φτάσει στο σημείο τήξης ( $T_m$ ), λόγω του διαχωρισμού των κλώνων DNA και της επακόλουθης απελευθέρωσης της SYBR<sup>®</sup> Green. (Life Technologies Corporation 2012).

Η ανάλυση της καμπύλης τήξης μετά την ενίσχυση του προϊόντος χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της εμφάνισης διμερών εκκινητών καθώς και για να διασφαλιστεί η ειδικότητα της αντίδρασης. Επειδή η θερμοκρασία τήξης των νουκλεϊκών οξέων εξαρτάται από το μήκος της αλυσίδας, το περιεχόμενο σε GC, την παρουσία αναντιστοιχιών στις βάσεις και άλλους παράγοντες, μπορεί να γίνει ο διαχωρισμός των διαφορετικών προϊόντων της PCR μπορεί συχνά να διαχωριστούν από τα βάσει των χαρακτηριστικών τήξης τους. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να εντοπιστούν παραπροϊόντα και διμερή εκκινητών καθώς αυτά θα έχουν πολύ διαφορετική θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) από το προϊόν-στόχο (Life Technologies Corporation 2012).



**Εικόνα 13.** Καμπύλη αποδιάταξης ή καμπύλη τήξης. Παρουσιάζεται η εμφάνιση της καμπύλης του ενισχυμένου προϊόντος (μεγάλη κορυφή με πορτοκαλί χρώμα), των παραπροϊόντων (κορυφές με ροζ & μωβ χρώμα) και των διμερών των εκκινητών (μικρή κορυφή με πορτοκαλί χρώμα) Οι κορυφές των παραπροϊόντων και των διμερών των εκκινητών αντιστοιχούν σε διαφορετικά  $T_m$  από το  $T_m$  της κορυφής του κύριου προϊόντος

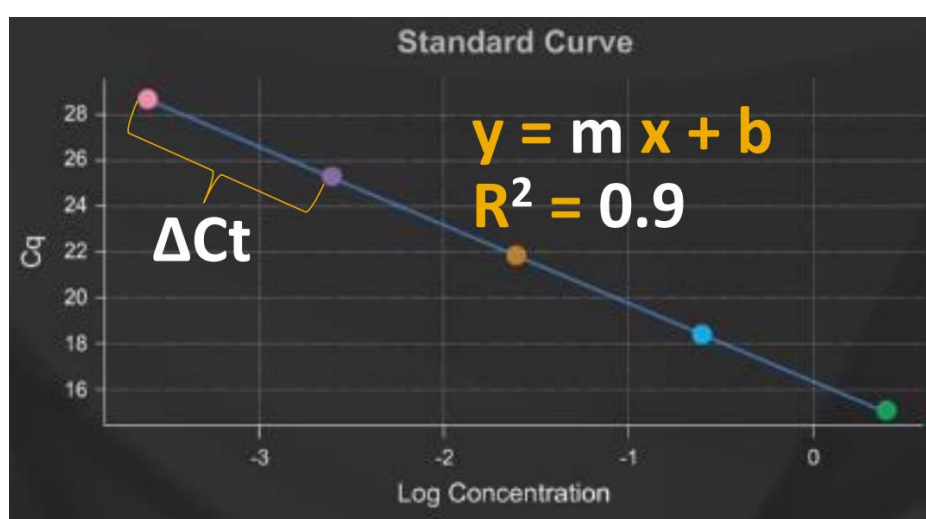
### 3.4 Κατασκευή πρότυπης καμπύλης και απόδοση

Κατά την ποσοτικοποίηση των προϊόντων αντίδρασης της Real-Time PCR αξιοποιείται η πρότυπη καμπύλη. Για τον προσδιορισμό της αρχικής ποσότητας του προϊόντος στα πειραματικά δείγματα ή για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας (efficiency) της αντίδρασης κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη του γνωστού προϊόντος μέσω μιας σειράς αραιώσεων του σε διάφορες συγκεντρώσεις. Έτσι απεικονίζεται ο λογάριθμος της συγκέντρωσης (άξονας x) στην αντίστοιχη τιμή Ct (άξονας y). Από αυτήν την πρότυπη καμπύλη, μπορούν να αντληθούν πληροφορίες σχετικά με την απόδοση της αντίδρασης καθώς και για διάφορες παραμέτρους της αντίδρασης (συμπεριλαμβανομένων της κλίσης της ευθείας και του συντελεστή συσχέτισης). Οι συγκεντρώσεις που επιλέγονται για την πρότυπη καμπύλη πρέπει να περιλαμβάνουν το αναμενόμενο εύρος συγκεντρώσεων του στόχου στα πειραματικά δείγματα.

Ο συντελεστής συσχέτισης  $R^2$  είναι ένα μέτρο του πόσο καλά τα δεδομένα ταιριάζουν με την πρότυπη καμπύλη. Η τιμή  $R^2$  αντικατοπτρίζει τη γραμμικότητα της πρότυπης καμπύλης. Στην ιδανική περίπτωση,  $R^2 = 1$ , αν και το 0,999 είναι γενικά η μέγιστη τιμή.

Η κλίση της εκθετικής φάσης της αντίδρασης ενίσχυσης είναι ένα μέτρο της αποτελεσματικότητας της αντίδρασης. Για να επιτευχθούν ακριβή αποτελέσματα, οι αντιδράσεις πρέπει να έχουν απόδοση μεγαλύτερη από 95% και μικρότερη από 105%.

Η απόδοση PCR 100% αντιστοιχεί σε κλίση -3,32, όπως καθορίζεται από την ακόλουθη εξίσωση: **Efficiency%** =  $(10^{(-1 / \text{κλίση (m)})} - 1) \times 100\%$  (Εικόνα 14). Στην ιδανική περίπτωση, η απόδοση (E) μιας αντίδρασης PCR πρέπει να είναι 100%, που σημαίνει το προϊόν να διπλασιάζεται μετά από κάθε θερμικό κύκλο κατά την εκθετική ενίσχυση. Η πραγματική απόδοση μπορεί να δώσει πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με την αντίδραση. Πειραματικοί παράγοντες όπως το μήκος, η δευτερεύουσα δομή και το περιεχόμενο GC του amplicon μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα. Άλλες καταστάσεις που μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα είναι η δυναμική της ίδιας της αντίδρασης, η χρήση μη βέλτιστων συγκεντρώσεων αντιδραστήριων και η ποιότητα των ενζύμων, που μπορούν να οδηγήσουν σε αποτελεσματικότητα κάτω του 90%. Η παρουσία αναστολέων PCR σε ένα ή περισσότερα από τα αντιδραστήρια μπορεί να παραγάγει αποτελεσματικότητα μεγαλύτερη από 110%.



Εικόνα 14. Πρότυπη καμπύλη, απόδοση (efficiency) και παράγοντας συσχέτισης ( $R^2$ )



### 3.5 Απόλυτη και Σχετική ποσοτικοποίηση

Ανάλογα με το σκοπό του πειράματος, υπάρχουν δύο διαφορετικές μέθοδοι ποσοτικοποίησης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν: η Απόλυτη ποσοτικοποίηση (Absolute quantification) και η Σχετική ποσοτικοποίηση (Relative quantification).

Στην απόλυτη ποσοτικοποίηση χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της πρότυπης καμπύλης, γίνεται ποσοτικοποίηση της άγνωστης ποσότητας με βάση μια γνωστή ποσότητα. Πρώτα δημιουργείται μια πρότυπη καμπύλη από δείγματα με γνωστή συγκέντρωση ή καλύτερα με γνωστό αριθμό αντιγράφων του γονιδίου που πρόκειται να ποσοτικοποιηθεί (standards) και τότε γίνεται σύγκριση της άγνωστης ποσότητας με την πρότυπη καμπύλη και από τα γνωστά δεδομένα και προκύπτει μια τιμή.

Στη σχετική ποσοτικοποίηση, γίνεται ανάλυση των αλλαγών στην έκφραση του γονιδίου σε ένα δεδομένο δείγμα σε σχέση με ένα άλλο δείγμα αναφοράς (όπως ένα δείγμα ελέγχου που έχει γονίδιο αναφοράς). Σε αυτή την περίπτωση κατασκευάζονται πρότυπες καμπύλες τόσο για το γονίδιο στόχο όσο και για το γονίδιο αναφοράς και συγκρίνονται τα  $C_t$  του γονιδίου στόχου και του γονιδίου αναφοράς ανάμεσα σε δύο δείγματα και το αποτέλεσμα είναι του τύπου: «x φορές υψηλότερη ή χαμηλότερη έκφραση του γονιδίου στο δείγμα 1 σε σχέση με το δείγμα 2». Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε η σχετική ποσοτικοποίηση.

## 4. Προσδιορισμός των επιπέδων γονιδιακής έκφρασης

Τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων-στόχων στο λευκό μυ της τσιπούρας, προσδιορίστηκαν με τη χρήση της μεθόδου Real-Time PCR. Το πρώτο βήμα για τον προσδιορισμό αυτό είναι ο σχεδιασμός κατάλληλων εκκνητών ώστε να ενισχυθούν οι αλληλουχίες των γονιδίων-στόχων. Ωστόσο, για την κανονικοποίηση της ποσότητας του cDNA, σε όλα τα δείγματα προσδιορίστηκε παράλληλα η έκφραση των εξής γονιδίων αναφοράς: RPL13, RPS18 και του γονιδίου EF1a. Πρόκειται για ιδιосуστατα γονίδια (housekeeping genes) που παρουσιάζουν σταθερή και ανεξάρτητη των συνθηκών έκφραση σε όλους τους ιστούς, έτσι ώστε να συγκριθούν τα αποτελέσματα της έκφρασής τους με εκείνα των γονιδίων-στόχων.

Το γονίδιο RPL13 κωδικοποιεί την ριβοσωμική πρωτεΐνη L13, μέλος της 60S μεγάλης υπομονάδας του ριβοσώματος και βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Το γονίδιο RPS18 κωδικοποιεί την ριβοσωμική πρωτεΐνη 18S της 40S μικρής ριβοσωμικής και βρίσκεται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Το γονίδιο EF1a κωδικοποιεί τον πρωτεϊνικό παράγοντα επιμήκυνσης 1α. Αυτή η πρωτεΐνη καταλύει την εξαρτώμενη από το GTP σύνδεση του αμινοακυλοtRNA στην Α-θέση των ριβοσωμάτων κατά τη διάρκεια της πρωτεϊνικής βιοσύνθεσης. Όλα τα ιδιосуστατα γονίδια εκφράζονται σε όλους τους ιστούς.

#### 4.1 Αλληλουχίες εκκινητών γονιδίων

Τα εκκινητικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν για τα γονίδια αναφοράς και τα γονίδια-στόχους παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 3). Οι εκκινητές προστίθενται στην αντίδραση σε συγκέντρωση 10pmol/μl. Έτσι για συγκέντρωση 200nM απαιτούνται 0,2μl.

**Πίνακας 3.** Αλληλουχίες εκκινητών για γονίδια αναφοράς και γονίδια στόχους

| ΓΟΝΙΔΙΟ  | ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ         |
|--|------------------------------|
| <b>RPL13A:</b> ribosomal protein L13a  | Fw: TCTGGAGGACTGTCAGGGGCATGC |
|  | Rv: AGACGCACAATCTTAAGAGCAG   |
| <b>RPS18:</b> 40S ribosomal protein S18                                      | Fw: 5'AGGGTGTGGCAGACGTTAC    |
|  | Rv: 5' GAGGACCTGGCTGTATTTGC  |
| <b>EF1:</b> elongation factor 1-alpha  | Fw: TCAAGGGATGGAAGGTTGAG     |
|  | Rv: AGTTCCAATACCGCCGAT       |
| <b>MYLPF B:</b> myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle b | Fw: CAGCAAGGACGATCTTAGGG     |
|  | Rv: CATGGTCAGAAAGACGGTGA     |
| <b>MYLPF A:</b> myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle a | Fw: GCTCCTCCAATGTGTTCTCC     |
|  | Rv: TCCCTCAGGTCATCTTTGCT     |
| <b>MSTN1:</b> growth/differentiation factor 8                                | Fw: TTTTGGACACAACCGATC       |
|  | Rv: GTGTGTGTGTTCTGCATCC      |
| <b>LPL:</b> lipoprotein lipase   | Fw: CAACCAGCACTACCCACAT      |
|  | Rv: GATGAATCCTGTCCCAGGGC     |
| <b>HSL:</b> hormone sensitive lipase   | Fw: ACACAGCGTGCTACTCAGA      |
|  | Rv: TCAGCGTGAGGAGAGGAGAT     |

#### 4.2 Απόδοση (Efficiency)

Η απόδοση των αντιδράσεων υπολογίστηκε για κάθε ζεύγος εκκινητών χρησιμοποιώντας τα αποτελέσματα από διαδοχικές αραιώσεις σε ένα συλλογικό δείγμα που δημιουργήθηκε από την ανάμιξη 1μl cDNA από κάθε δείγμα cDNA (pool sample). Το αρχικό συλλογικό δείγμα είχε όγκο 160μl. Οι διαδοχικές αραιώσεις καθορίστηκαν από τον νόμο της αραιώσης  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ , όπου κάθε tube αραιώσης έχει τελικό όγκο 100μl, ως εξής:

1:5 → 49μl pool cDNA + 196μl ενέσιμο ύδωρ

1:10 → 145μl από την αραιώση 1:5 + 145μl ενέσιμο ύδωρ

1:15 → 190μl από την αραιώση 1:10 + 95μl ενέσιμο ύδωρ

1:20 → 185,1μl από την αραιώση 1:15 + 61,7μl ενέσιμο ύδωρ

1:30 → 146,8μl από την αραιώση 1:20 + 73,2μl ενέσιμο ύδωρ

1:40 → 120μl από την αραιώση 1:30 + 40μl ενέσιμο ύδωρ

1:100 → 60μl από την αραιώση 1:40 + 90μl ενέσιμο ύδωρ

1:200 → 50μl από την αραιώση 1:100 + 50μl ενέσιμο ύδωρ



Χρησιμοποιήθηκαν plates με 96 πηγαδάκια όπου το καθένα περιείχε το 8μl από το master mix για κάθε γονίδιο και 2μl από τις παραπάνω αραιώσεις, μία κάθε φορά. Άρα, κάθε πηγαδάκι είχε τελικό όγκο 10μl. Κάθε μία αραιώση αξιολογήθηκε εις διπλούν. Επίσης, ως αρνητικά δείγματα ελέγχου (negative control) για κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν 8μl από το master mix (διαφορετικό για κάθε γονίδιο) και 2μl ddH<sub>2</sub>O για να διαπιστώσουμε αν υπήρξε επιμόλυνση στο master mix ή στο νερό ή ακόμα αν υπήρχαν και διμερή εκκινητών. Το master mix για κάθε γονίδιο περιείχε SYBR<sup>®</sup> Green master mix, forward εκκινητή και reverse εκκινητή για το συγκεκριμένο γονίδιο κάθε φορά και ενέσιμο ύδωρ (double distilled water). Η συγκέντρωση των εκκινητών τροποποιούνταν, όπου ήταν απαραίτητο, ώστε να προκύψουν αξιόπιστες τιμές απόδοσης για κάθε ζεύγος εκκινητών. Η κλίση της πρότυπης καμπύλης που κατασκευάστηκε από τα αποτελέσματα των διαδοχικών αραιώσεων και των γονιδίων αναφοράς και των γονιδίων στόχων, χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της απόδοσης της αντίδρασης σύμφωνα με τη μαθηματική εξίσωση:

$$\text{Efficiency\%} = (10^{-1/\text{κλίση}} - 1) \times 100\%$$

Οι αποδόσεις των αντιδράσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 4. Τα αποτελέσματα αυτής της επεξεργασίας κατέδειξαν ότι η καταλληλότερη αραιώση σύμφωνα με την οποία έπρεπε να αραιωθούν τα πειραματικά δείγματα είναι η 1:5.

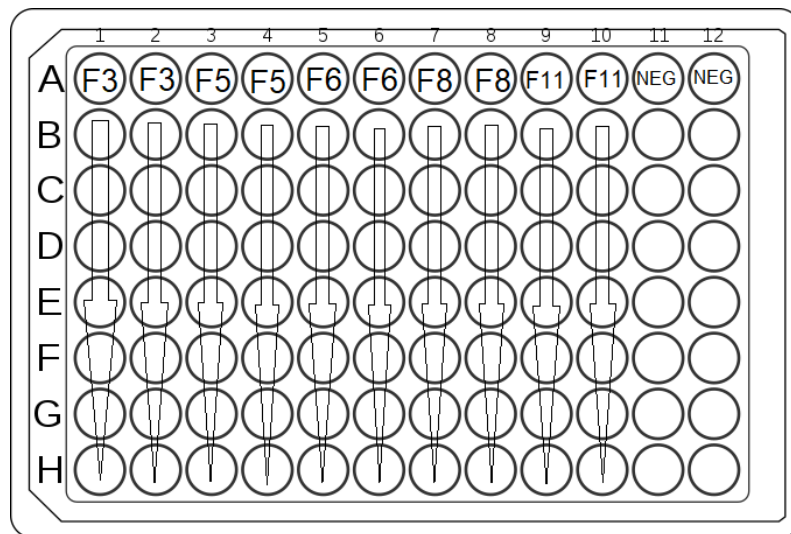
**Πίνακας 4.** Τιμές επί τις εκατό αποδόσεων των γονιδίων αναφοράς και των γονιδίων-στόχων

| ΓΟΝΙΔΙΟ     | ΓΟΝΙΔΙΑ ΑΝΑΦΟΡΑΣ |       |       | ΓΟΝΙΔΙΑ ΣΤΟΧΟΙ |         |      |      |       |
|-------------|------------------|-------|-------|----------------|---------|------|------|-------|
|             | RPL13            | RPS18 | EF1a  | MYLPF A        | MYLPF B | HSL  | LPL  | MSTN1 |
| EFFICIENCY% | 99,51            | 97,24 | 96,95 | 100,6          | 100,77  | 95,5 | 97,5 | 99,49 |

#### 4.3 Προετοιμασία αντίδρασης για τα πειραματικά δείγματα

Αρχικά, ετοιμάστηκαν τα δύο cDNA plates (96-well plates) που το ένα περιείχε τα δείγματα από την ομάδα ελέγχου και το άλλο τα δείγματα από την πειραματική ομάδα με αραιώση 1:5. Τα οχτώ δείγματα κάθε οικογένειας από κάθε cDNA strip αντιστοιχούσαν σε μία κάθετη στήλη στο πιάτο της Real Time PCR. Σε κάθε πιάτο υπήρχαν δέκα οικογένειες που η κάθε μία αποτελούνταν από οχτώ δείγματα. Κάθε πηγαδάκι είχε τελικό όγκο 50μl.

Για κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα πιάτα, δύο για την ομάδα ελέγχου και δύο για την πειραματική ομάδα. Κάθε οικογένεια τοποθετήθηκε σε δύο διαδοχικές κάθετες στήλες έως τη στήλη δέκα (Εικόνα 15), έτσι ώστε κάθε αντίδραση να επαναληφθεί εις διπλούν. Σε κάθε πηγαδάκι προστέθηκαν 8μl από το master mix για το συγκεκριμένο γονίδιο κάθε φορά και 2μl από τα δείγματα από τα προηγούμενα cDNA plates με αραιώση 1:5. Τα δύο πρώτα πηγαδάκια στις στήλες 11 και 12 ήταν τα αρνητικά δείγματα ελέγχου που περιείχαν 8μl mix και 2μl ddH<sub>2</sub>O.



**Εικόνα 15.** Παράδειγμα απεικόνισης ενός από τα τέσσερα πιάτα Real Time PCR για κάθε γονίδιο

Το master mix περιείχε SYBR<sup>®</sup> Green, ενέσιμο ύδωρ (ddH<sub>2</sub>O), forward εκκινητή και reverse εκκινητή όπου για κάθε γονίδιο οι συγκεντρώσεις ήταν διαφορετικές και επελέγησαν βάσει της απόδοσης της αντίδρασης. Συγκεκριμένα, για κάθε γονίδιο χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συγκεντρώσεις:

RPL13, EF1a και MYLPF B με συγκεντρώσεις εκκινητών forward=300nM, reverse=300nM

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| SYBR <sup>®</sup> Green | 5,0 μl |
| Fw primer               | 0,3 μl |
| Rv primer               | 0,3 μl |
| ddH <sub>2</sub> O      | 2,4 μl |

RPS18 και HSL με συγκεντρώσεις εκκινητών forward=250nM, reverse=250nM

|                         |         |
|-------------------------|---------|
| SYBR <sup>®</sup> Green | 5,00 μl |
| Fw primer               | 0,25 μl |
| Rv primer               | 0,25 μl |
| ddH <sub>2</sub> O      | 2,40 μl |

MYLPF A με συγκεντρώσεις εκκινητών forward=100nM, reverse=100nM

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| SYBR <sup>®</sup> Green | 5,0 μl |
| Fw primer               | 0,1 μl |
| Rv primer               | 0,1 μl |
| ddH <sub>2</sub> O      | 2,4 μl |

MSTN1 και LPL με συγκεντρώσεις εκκινητών forward=150nM, reverse=150nM

|             |         |
|-------------|---------|
| SYBR® Green | 5,00 μl |
| Fw primer   | 0,15 μl |
| Rv primer   | 0,15 μl |
| ddH2O       | 2,40 μl |

Για τις αντιδράσεις χρησιμοποιείται ο θερμοκυκλοποιητής StepOne™ Real-Time PCR System της εταιρίας Applied Biosystems με τις εξής συνθήκες: δυο αρχικά στάδια αποδιάταξης, πρώτα στους 95°C για 5min, 40 κύκλοι πολλαπλασιασμού (κάθε κύκλος περιλαμβάνει από 20sec στους 95°C και 20sec στους 60°C) ώστε να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός του κύριου προϊόντος, και τέλος, ακολουθεί το στάδιο της καμπύλης τήξης (melting curve) (15sec στους 95°C, 1min στους 50°C και 15sec στους 95°C).

#### 4.4 Ανάλυση δεδομένων και κανονικοποίηση

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας του αρχικού εκμαγείου cDNA χρησιμοποιήθηκε η συγκριτική μέθοδος (Comparative Ct Method, Čikoš et al., 2007). Σε αυτή τη μέθοδο το Ct προσδιορίζεται στο ίδιο επίπεδο φθορισμού για όλα τα δείγματα στην εκθετική φάση της αντίδρασης. Το επίπεδο φθορισμού στην έναρξη της αντίδρασης είναι ανάλογο της ποσότητας του αρχικού εκμαγείου cDNA και προσδιορίζεται σύμφωνα με τον τύπο:

$$R_0 = 1/(E + 1)^{Ct} \text{ ή } R_0 = (E + 1)^{-Ct}$$

όπου:

**R<sub>0</sub>**: το επίπεδο φθορισμού στην έναρξη της αντίδρασης, το οποίο είναι ανάλογο της ποσότητας του αρχικού εκμαγείου cDNA,

**R<sub>c</sub>**: το επίπεδο φθορισμού που επιλέχθηκε για τη συγκριτική ανάλυση,

**E**: η απόδοση της αντίδρασης,

**Ct**: ο αριθμός κύκλων της αντίδρασης για ένα συγκεκριμένο επίπεδο φθορισμού στην εκθετική φάση της αντίδρασης.

Η ίδια μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για τον υπολογισμό της R<sub>0</sub> των γονιδίων-αναφοράς και των γονιδίων-στόχων. Εξαιτίας της ευαισθησίας της Real-Time PCR και της εμφάνισης πειραματικού σφάλματος είναι πιθανό να υπάρχει απόκλιση των πειραματικών δεδομένων από δείγμα σε δείγμα. Αρκετές παράμετροι που δεν σχετίζονται με την αντίδραση PCR, για παράδειγμα η αστάθεια του RNA, η παρουσία αναστολέων κατά τη διαδικασία απομόνωσης, καθώς και η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA μπορεί να συμβάλλουν στη διακύμανση και στην έλλειψη αναπαραγωγιμότητας των αποτελεσμάτων. Συνεπώς, η χρήση των γονιδίων αναφοράς αμβλύνει τις διαφορές από δείγμα σε δείγμα. Η έκφραση των γονιδίων στόχων κανονικοποιήθηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$\text{Κανονικοποιημένη έκφραση} = R_0 \text{ γονιδίου-στόχου} / R_0 \text{ γονιδίου αναφοράς}$$

Ως παράγοντας κανονικοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο γεωμετρικός μέσος της έκφρασης των τριών γονιδίων αναφοράς σε κάθε δείγμα (Vandesompele et al. 2002).

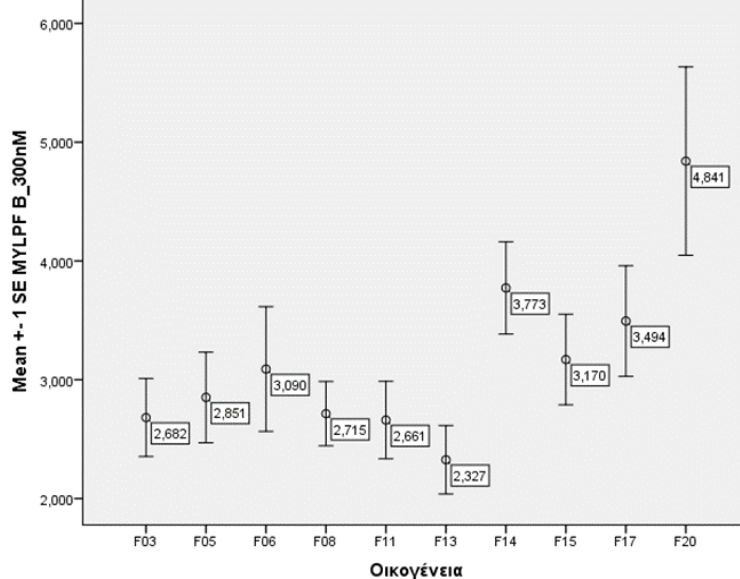
#### 4.5 Στατιστική ανάλυση

Οι τιμές της κανονικοποιημένης έκφρασης των γονιδίων δεν ακολουθούν την κανονική κατανομή ενώ οι τετραγωνικές τους ρίζες έδωσαν ένα σύνολο δεδομένων που ακολουθούν κανονική κατανομή. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε η στατιστική μέθοδος two-way ANOVA για να ελεγχθεί αν η παράμετρος τροφή ή η παράμετρος γενετικό υπόβαθρο (διαφορετική οικογένεια) ή η αλληλεπίδραση μεταξύ τους έχει στατιστικά σημαντική επίδραση στην έκφραση κάθε γονιδίου. Το επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε  $p < 0,05$ .

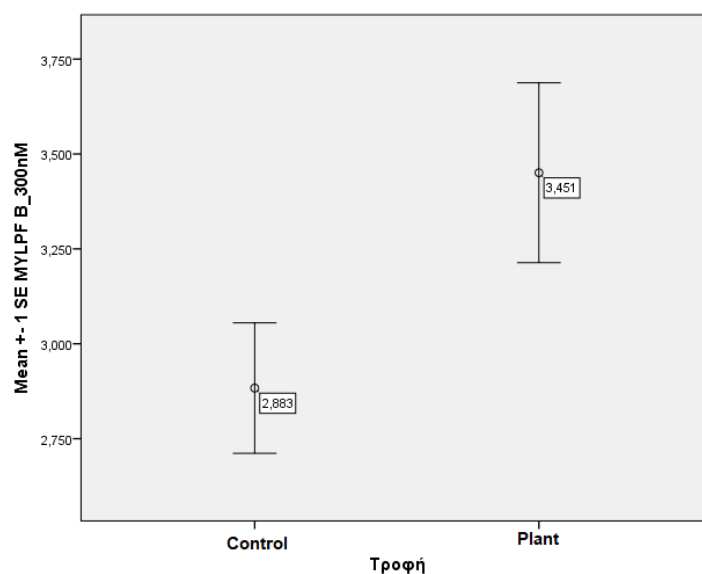
## ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 1. MYLPF B

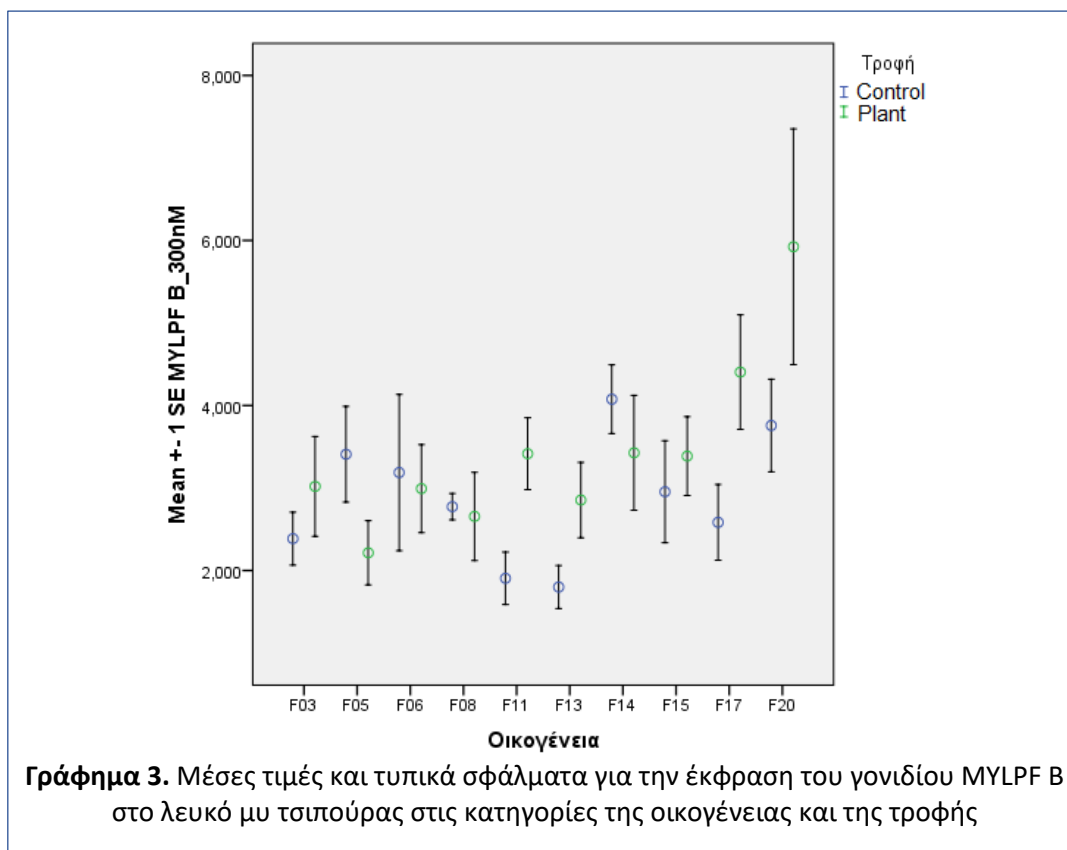
Από τα αποτελέσματα των ελέγχων two-way ANOVA χρησιμοποιώντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή την έκφραση του γονιδίου MYLPF B και ανεξάρτητες την οικογένεια και την τροφή θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική η επίδραση της οικογένειας ( $p=0,004$ ) και της τροφής ( $p=0,047$ ), ενώ μη στατιστικά σημαντική η αλληλεπίδραση της οικογένειας με την τροφή ( $p=0,113$ ).



**Γράφημα 1.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα για την έκφραση του γονιδίου MYLPF B στο λευκό μυ τσιπούρας στα δείγματα των οικογενειών



**Γράφημα 2.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα για την έκφραση του γονιδίου MYLPF B στο λευκό μυ τσιπούρας στην τροφή control και στην τροφή plant

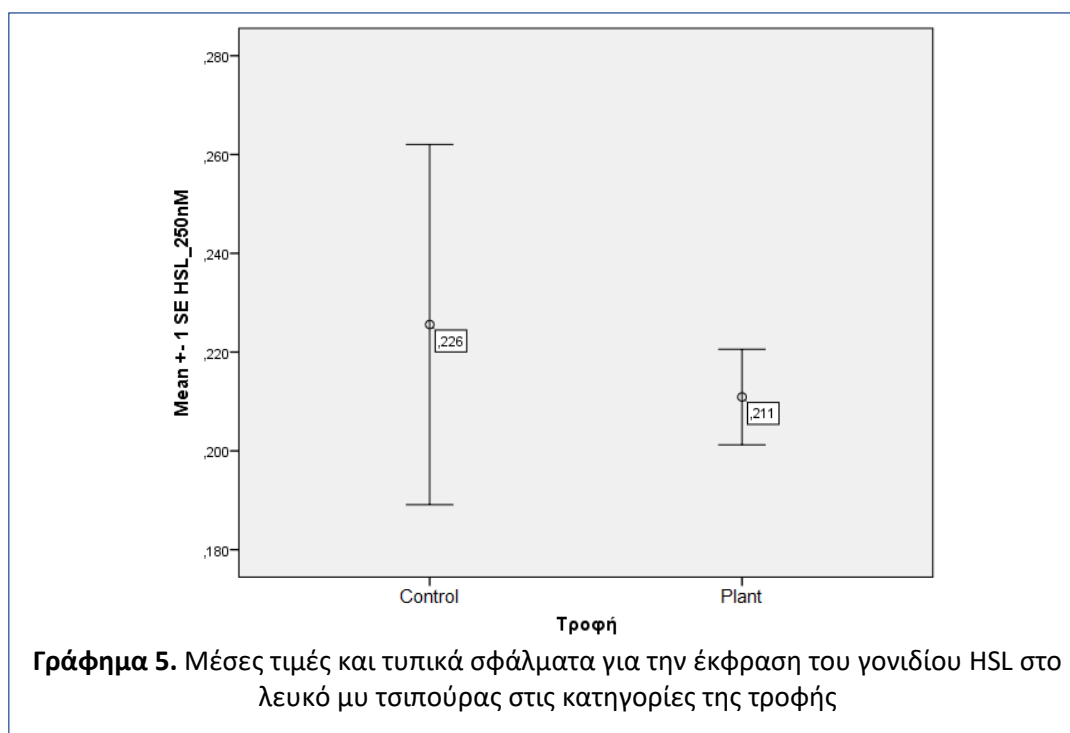
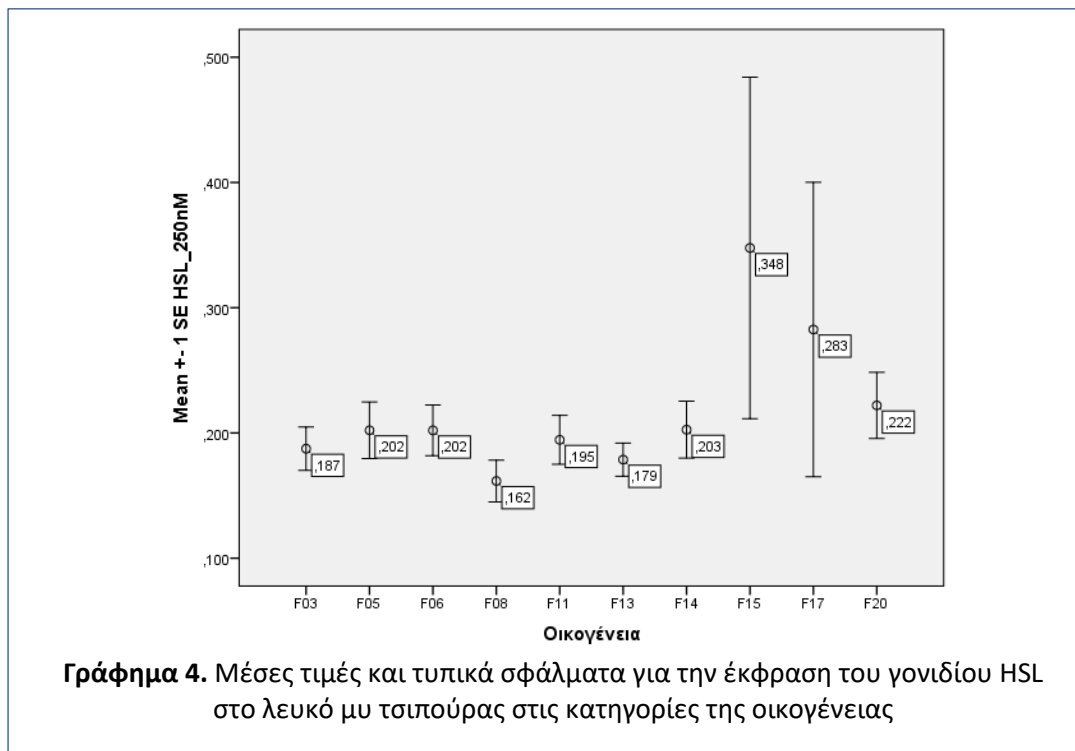


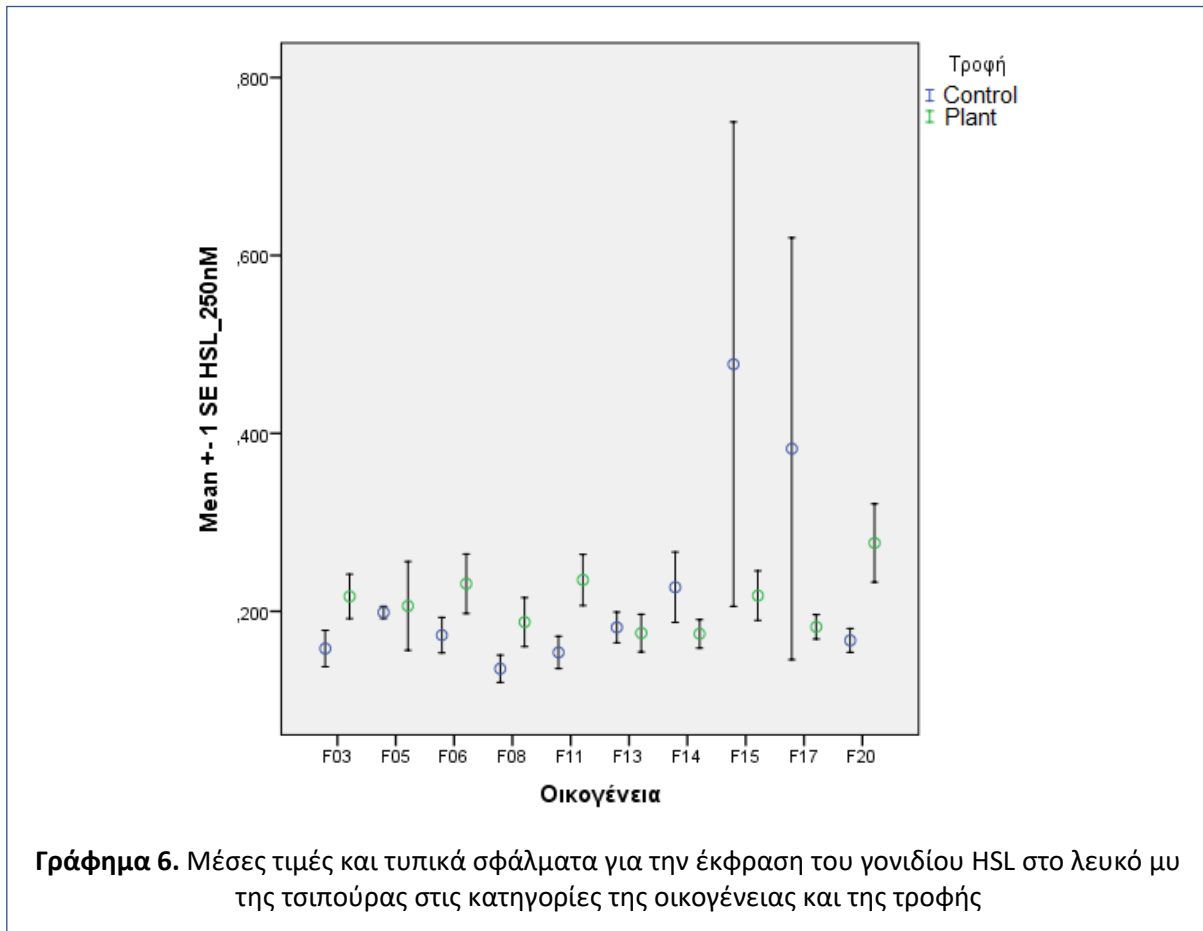
Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση και τα παραπάνω διαγράμματα (Γραφήματα 1,2 και 3) προκύπτει ότι η μέση τιμή της οικογένειας F20 (M.O.=4,841) είναι στατιστικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των οικογενειών F03 (M.O.=2,703,  $p=0,001$ ), F05 (M.O.=2,812,  $p=0,001$ ), F06 (M.O.=3,090,  $p=0,004$ ), F08 (M.O.=2,715,  $p=0,001$ ), F11 (M.O.=2,661,  $p<0,001$ ), F13 (M.O.=2,327,  $p<0,001$ ), F15 (M.O.=3,170,  $p=0,006$ ) και F17 (M.O.=3,494,  $p=0,027$ ). Ακόμη, προκύπτει ότι η μέση τιμή της οικογένειας F14 (M.O.=3,752) είναι στατιστικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της οικογένειας F13 (M.O.=2,327,  $p=0,019$ ). Τέλος, προκύπτει ότι η μέση τιμή για την ομάδα control (M.O.=2,883) είναι μικρότερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη της ομάδας plant (M.O.=3,429).



## 2. HSL (Ορμονοευαίσθητη λιπάση)

Από την ανάλυση διακύμανσης χρησιμοποιώντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή την έκφραση του γονιδίου της HSL και ανεξάρτητες την οικογένεια και την τροφή δε θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική η επίδραση της οικογένειας ( $p=0,562$ ), της τροφής ( $p=0,692$ ) και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης ( $p=0,405$ ), όπως παρουσιάζεται και από τα παρακάτω γραφήματα (Γραφήματα 4,5 και 6).

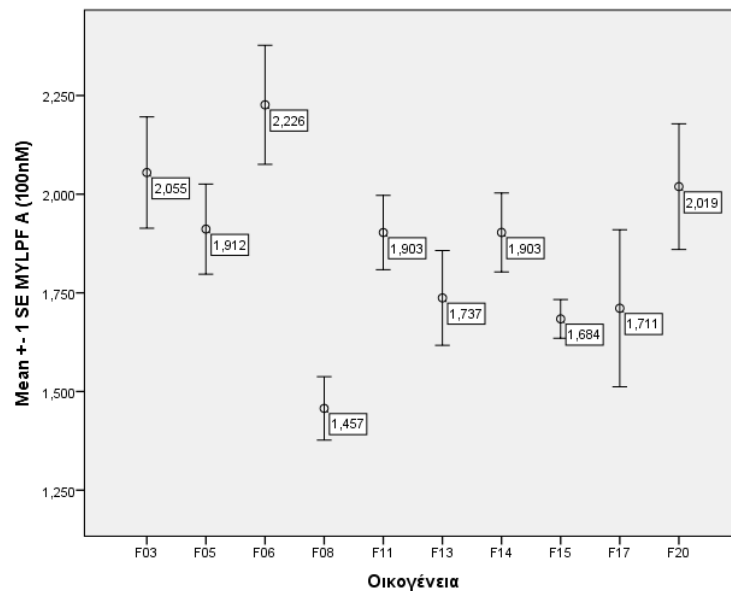




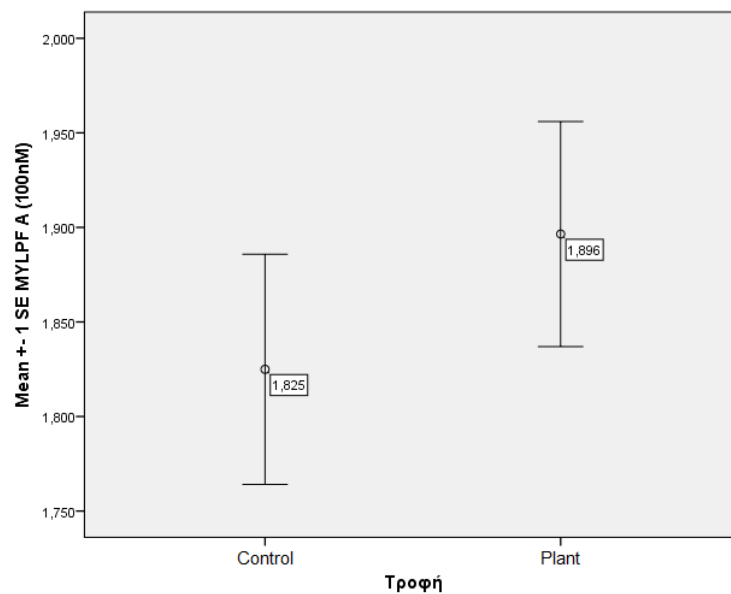
**Γράφημα 6.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα για την έκφραση του γονιδίου HSL στο λευκό μυ της τσιπούρας στις κατηγορίες της οικογένειας και της τροφής

### 3. MYLPF A

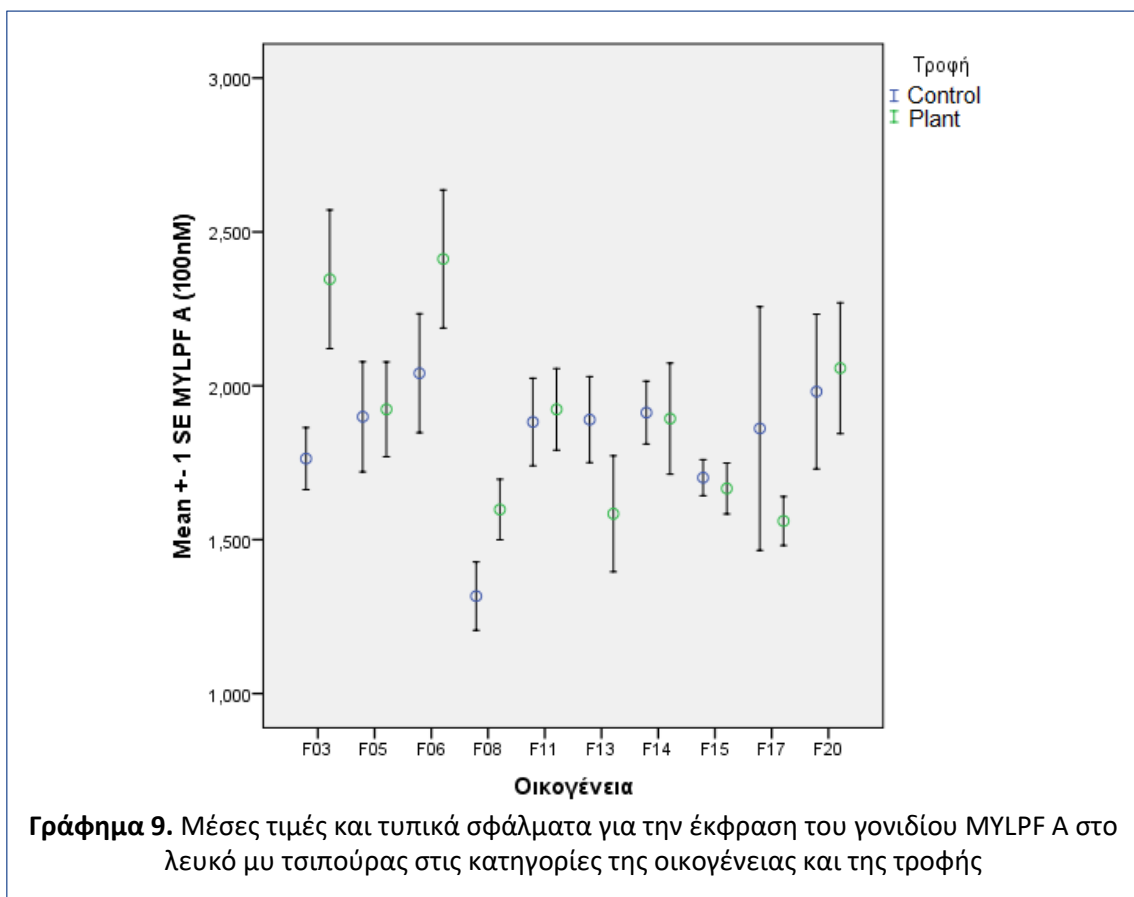
Από την ανάλυση διακύμανσης με εξαρτημένη μεταβλητή την έκφραση του γονιδίου MYLPF A και ανεξάρτητες την οικογένεια και την τροφή, θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική η επίδραση της οικογένειας ( $p=0,003$ ). Μη στατιστικά σημαντική θεωρήθηκε η επίδραση της τροφής ( $p=0,374$ ) και της αλληλεπίδρασης οικογένεια με τροφή ( $p=0,296$ ).



**Γράφημα 7.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα για την έκφραση του γονιδίου MYLPF A στο λευκό μυ στην τσιπούρα στις κατηγορίες της οικογένειας



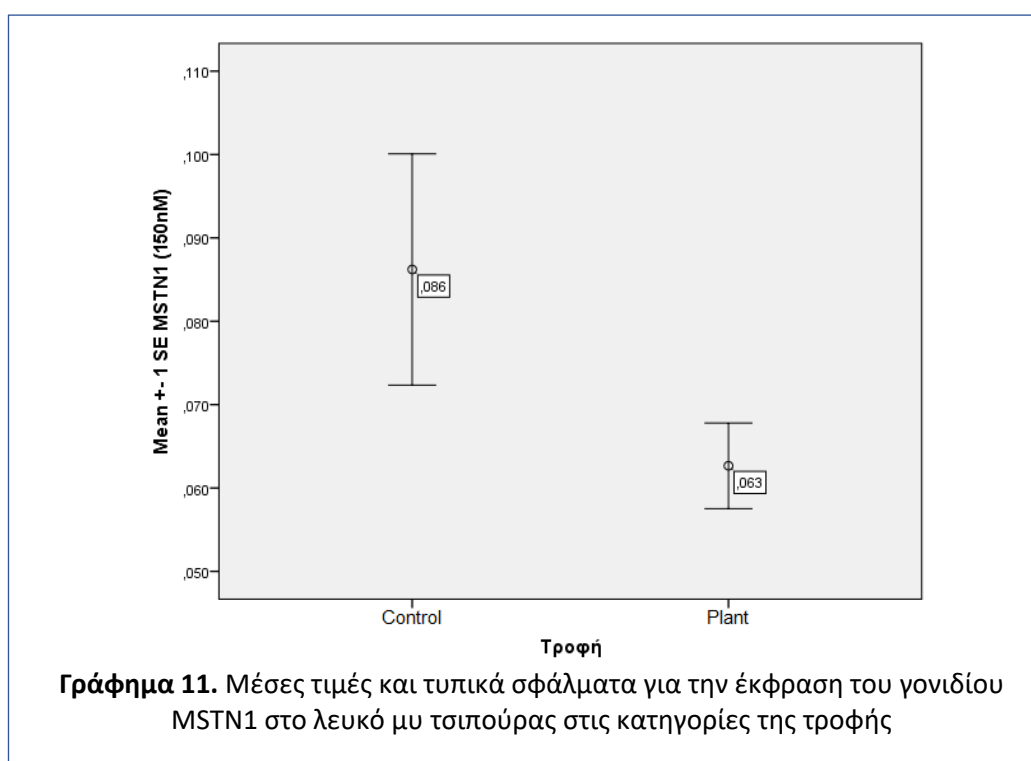
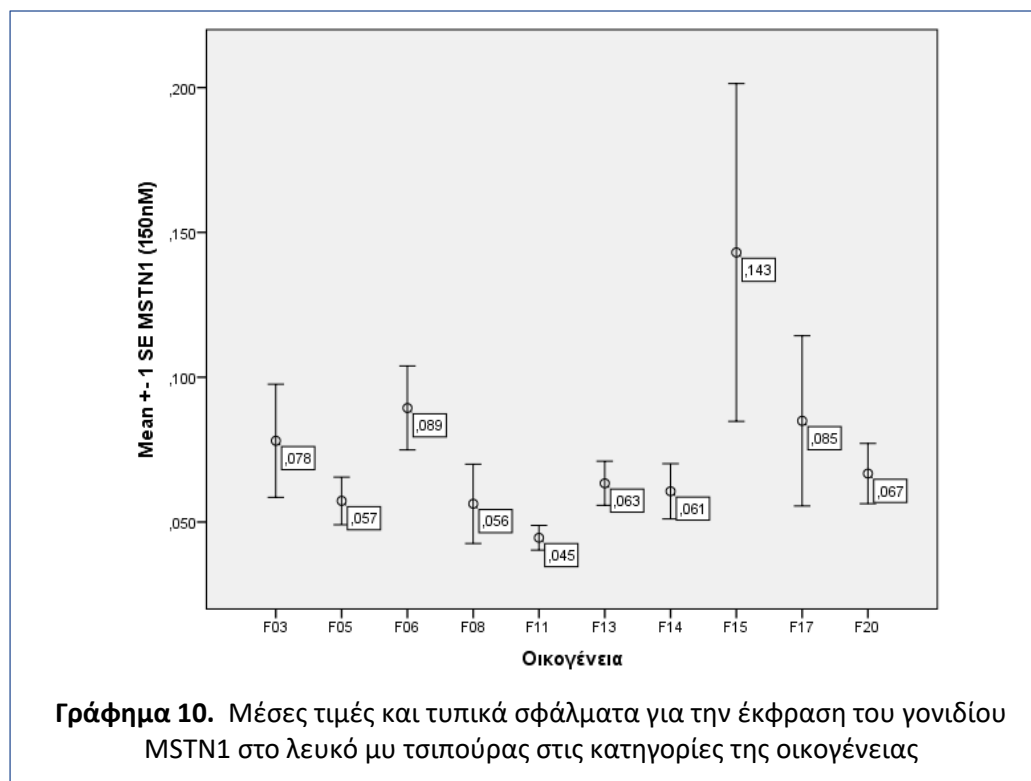
**Γράφημα 8.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα για την έκφραση του γονιδίου MYLPF A στο λευκό μυ τσιπούρας στις κατηγορίες της τροφής

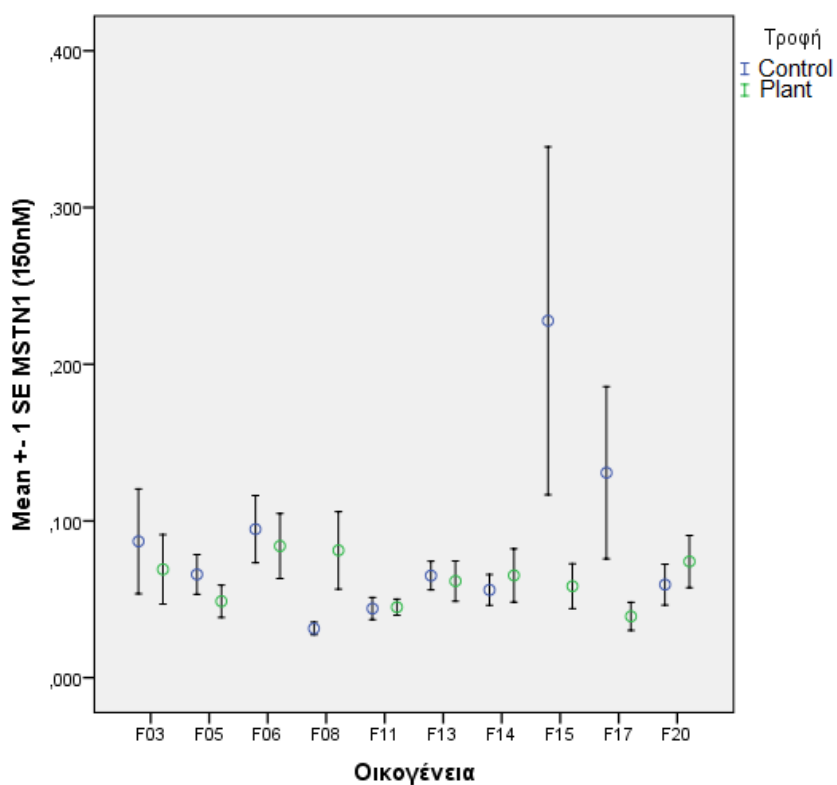


Από τα παραπάνω γραφήματα (Γραφήματα 7,8 και 9) προκύπτει ότι η μέση τιμή της οικογένειας F08 (M.O.=1,457) είναι στατιστικά μικρότερη από την αντίστοιχη των οικογενειών F03 (M.O.=2,055,  $p=0,001$ ), F05 (M.O.=1,912,  $p=0,012$ ), F06 (M.O.=2,226,  $p<0,001$ ), F11 (M.O.=1,903,  $p=0,014$ ), F14 (M.O.=1,903,  $p=0,014$ ) και F20 (M.O.=2,019,  $p=0,002$ ). Ομοίως, προκύπτει ότι η μέση τιμή της οικογένειας F06 (M.O.=2,226) είναι στατιστικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη των οικογενειών F13 (M.O.=1,737,  $p=0,007$ ), F15 (M.O.=1,684,  $p=0,003$ ) και F17 (M.O.=1,711,  $p=0,005$ ). Τέλος, προκύπτει ότι η μέση τιμή της οικογένειας F15 (M.O.=1,684) είναι στατιστικά μικρότερη από την αντίστοιχη της οικογένειας F03 (M.O.=2,055,  $p=0,041$ ).

#### 4. MSTN1 (Μυοστατίνη)

Από την ανάλυση διακύμανσης χρησιμοποιώντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή την έκφραση του γονιδίου MSTN1 και ανεξάρτητες την οικογένεια και την τροφή δε θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική η επίδραση της οικογένειας ( $p=0,143$ ), της τροφής ( $p=0,100$ ) και της αλληλεπίδρασης οικογένεια με τροφή ( $p=0,052$ ), όπως παρουσιάζεται και από τα παρακάτω γραφήματα (Γραφήματα 10,11 και 12).

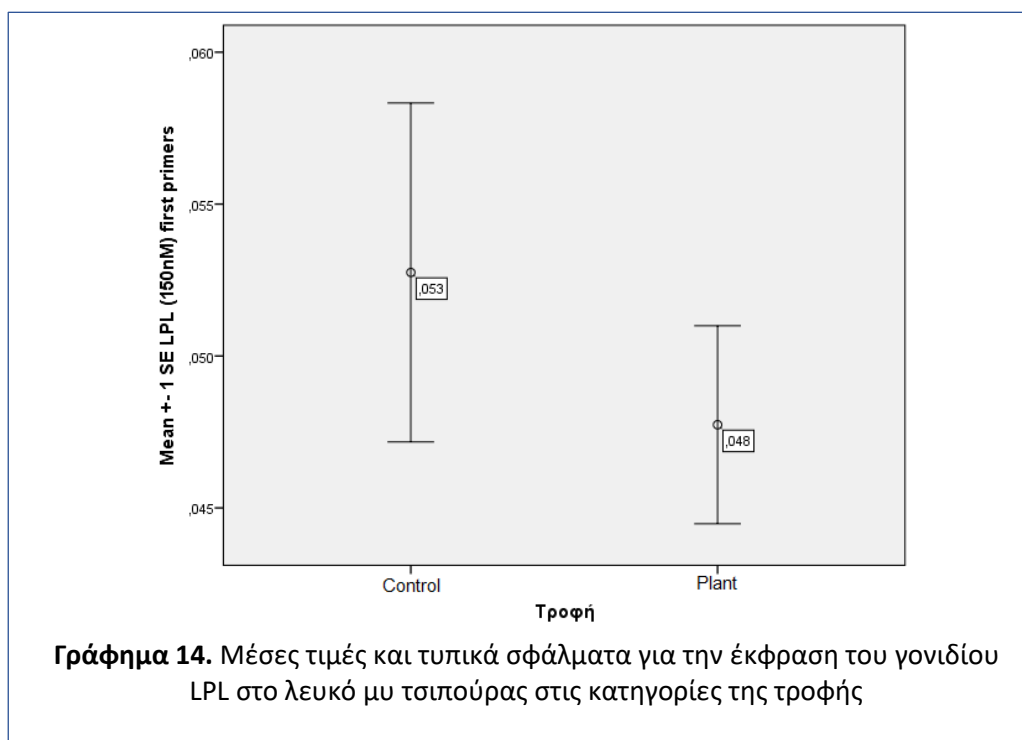
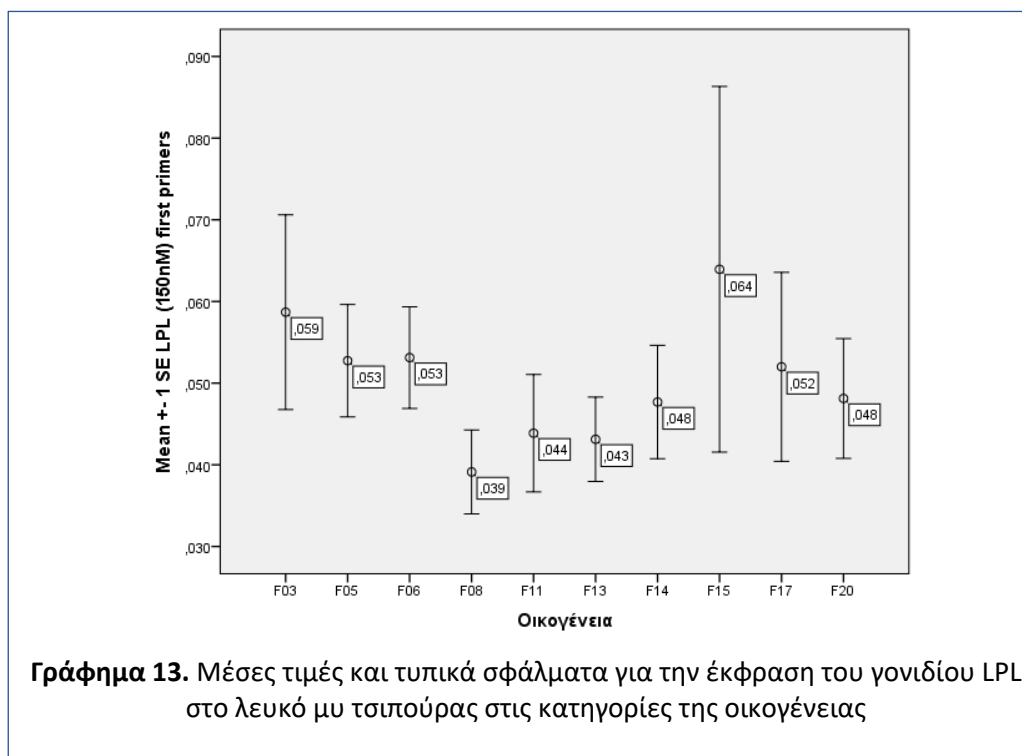




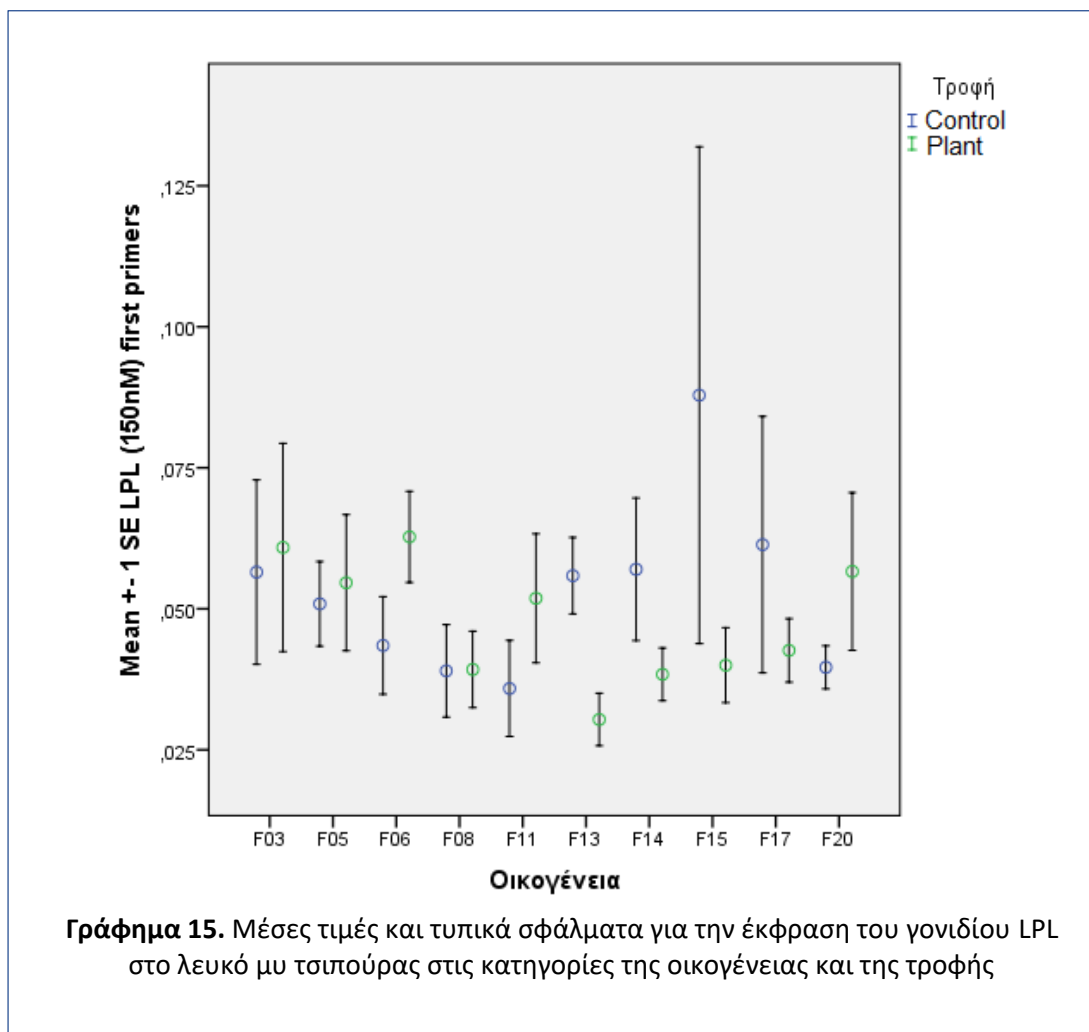
**Γράφημα 12.** Μέσες τιμές και τυπικά σφάλματα για την έκφραση του γονιδίου MSTN1 στο λευκό μυ τσιπούρας στις κατηγορίες της οικογένειας και της τροφής

## 5. LPL (Λιποπρωτεϊνική λιπάση)

Από τα αποτελέσματα των ελέγχων two-way ANOVA χρησιμοποιώντας σαν εξαρτημένη μεταβλητή την έκφραση του γονιδίου LPL και ανεξάρτητες την οικογένεια και την τροφή δε θεωρήθηκε στατιστικά σημαντική η επίδραση της οικογένειας ( $p=0,855$ ), της τροφής ( $p=0,444$ ) και της αλληλεπίδρασης οικογένεια με τροφή ( $p=0,344$ ). Στα παρακάτω γραφήματα (Γραφήματα 13-15) παρουσιάζονται τις μέσες τιμές, τα τυπικά σφάλματα και τα 95% δ.ε. για την έκφραση του γονιδίου LPL στις κατηγορίες της οικογένειας και της τροφής και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης.







## 6. Πειραματικά συμπεράσματα

Στην παρούσα έρευνα εξετάστηκαν 160 δείγματα τσιπούρας, ισόποσα κατανεμημένα σε ομάδα control και plant όσον αφορά το είδος τροφής και στις οικογένειες F03, F05, F06, F08, F11, F13, F14, F15, F17, F20 όσον αφορά το γενετικό υπόβαθρο. Μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων MYLFP B, HSL, MYLFP A, MSTN1 και LPL χρησιμοποιώντας two-way ANOVA σε στάθμη σημαντικότητας 5%.

Τα αποτελέσματα της έρευνας για την έκφραση του γονιδίου MYLFP B ανέδειξαν υψηλότερες τιμές για την οικογένεια F20 σε σύγκριση με τις οικογένειες F03, F05, F06, F08, F11, F13, F15, F17 και υψηλότερες τιμές για την οικογένεια F14 από την οικογένεια F13. Επίσης υψηλότερες τιμές παρατηρήθηκαν για την ομάδα plant σε σύγκριση με την ομάδα control. Δεν παρατηρήθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ της τροφής και της οικογένειας.

Για την έκφραση του γονιδίου MYLFP A, προέκυψαν χαμηλότερες τιμές για την οικογένεια F08 σε σύγκριση με τις οικογένειες F03, F05, F06, F11, F14, F20. Επίσης υψηλότερη ήταν η τιμή της F06 έναντι των F13, F15, F17 καθώς και της F03 έναντι της F15. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την τροφή ούτε αλληλεπίδραση μεταξύ της τροφής και της οικογένειας.

Για την έκφραση των γονιδίων HSL, MSTN1 και LPL δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της οικογένειας, της τροφής και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Οι ιχθυοκαλλιέργειες παρέχουν τώρα το 43% των ψαριών για κατανάλωση από τον άνθρωπο (FAO, 2006). Τα τελευταία χρόνια, η ζήτηση για ιχθυάλευρα και ιχθυέλαια ως τις κύριες πρώτες ύλες για ιχθυοτροφές έχει αυξηθεί δραματικά, γεγονός που κατέστησε δύσκολη την ύπαρξη ενός συστήματος που χρησιμοποιεί μόνο θαλάσσια συστατικά. Για αυτούς τους λόγους, χρειάζονται περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τις φυσιολογικές συνέπειες της συνολικής ή της μερικής αντικατάστασης ιχθυάλευρων και ιχθυέλαιων από εναλλακτικές πηγές. Αρκετές μελέτες έχουν εξετάσει τη χρήση εναλλακτικών ελαίων ή φυτικών πρωτεϊνών στις ιχθυοτροφές. Μερική ή ολική αντικατάσταση των ζωικών πρωτεϊνών από φυτικές πρωτεΐνες ήταν επιτυχής σε έναν αριθμό τελεόστεων ψαριών (Kaushik et al, 1995, Watanabe et al. 1998, Burel et al. 2000). Παρ' όλα αυτά, για τη χρήση εναλλακτικών πηγών πρωτεϊνών πρέπει να εξετασθούν τόσο οι τυχόν ανισορροπίες αμινοξέων όσο και η παρουσία αντιδιατροφικών παραγόντων (Francis et al. 2001).

Από προηγούμενες πειραματικές μελέτες στην τσιπούρα (*Sparus aurata*) έχει βρεθεί ότι τα φυτικά υποκατάστατα των ζωικών πρωτεϊνών μπορούν να αντικαταστήσουν έως και το 75% του ιχθυάλευρων των ιχθυοκαλλιεργειών χωρίς επιβλαβή αποτελέσματα στην ανάπτυξή της (Gómez-Requeni et al., 2004, De Francesco et al. 2007). Ομοίως, τα υποκατάστατα φυτικών ιχθυάλευρων αποτελούν μια καλή εναλλακτική λύση ως τροφή για τα ψάρια του γλυκού νερού και των σολομοειδών (Bell et al. 2003, Francis et al. 2006). Ωστόσο, σε άλλες πειραματικές μελέτες έχει καταδειχθεί ότι η επίδραση των φυτικών πρωτεϊνών στις ζωοτροφές των εκτρεφόμενων ψαριών στη χημική σύνθεση των μυών παρουσιάζει αντίθετα αποτελέσματα. Ορισμένες μελέτες έχουν αναφέρει ότι η χρήση αυξανόμενων επιπέδων (από 10% έως 30%) των φυτικών συστατικών στις ζωοτροφές για το Ευρωπαϊκό λαβράκι (Gouveia et al., 2000) και την τσιπούρα (Pereira et al., 2002) δεν επηρεάζει συνολικά την περιεκτικότητα λιπιδίων στο σώμα. Από την άλλη πλευρά, οι Robaina et al. (1998) παρατήρησαν μείωση της συνολικής περιεκτικότητας λιπιδίων στους μύες τσιπούρας όταν η τροφή περιείχε 30% σόγια, ενώ οι Kissil et al. (2000) ανέφεραν μείωση της περιεκτικότητας σε λιπίδια ολόκληρου του σώματος στη τσιπούρα που τρέφονταν με 100% υποκατάστατα ιχθυάλευρων με βάση είτε τα συμπυκνώματα πρωτεΐνης σόγιας ή ελαιοκράμβης. Σε αντίθεση με αυτά τα αποτελέσματα, παρατηρήθηκε αύξηση του λίπους στην πέστροφα (Burel et al., 2000) και στο λαβράκι (Kaushik et al., 2004) όταν ακολούθησαν δίαιτα με αυξημένο επίπεδο φυτικών συστατικών.

Ο μυϊκός και ο λιπώδης ιστός είναι τα κύρια όργανα εναπόθεσης λίπους σε πολλά είδη ψαριών, συμπεριλαμβανομένης της τσιπούρας. Ο λευκός μυς αποτελεί έναν ιδανικό ιστό προς μελέτη καθώς αποτελείται από συνδετικό, μυϊκό και λιπώδη ιστό δίνοντας τη δυνατότητα της συνδυαστικής μελέτης των αποτελεσμάτων της σίτισης με φυτικά υποκατάστατα, στα διαφορετικά είδη ιστών. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η επίδραση του διατροφικού καθεστώτος στην έκφραση των γονιδίων του λευκού μυός στην τσιπούρα μετρήθηκαν στην παρούσα μελέτη τα επίπεδα έκφρασης των μυϊκών δομικών γονιδίων (MYLPF A και MYLPF B) του μυο-ρυθμιστικού παράγοντα μυστατίνη (MSTN) και των λειτουργικών γονιδίων, ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL) και λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL).

Η MYLPF A εκφράζεται αποκλειστικά στο λευκό μυ, κυριαρχεί στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και μετά τη μεταμόρφωση περιορίζεται στα δορυφορικά κύτταρα. Αντίθετα, η MYLPF B δεν περιορίζεται τόσο χρονικά, καθώς αυξάνεται μετά τη μεταμόρφωση και εμφανίζει ένα ευρύτερο ιστο-ειδικό πρότυπο (Moutou et al., 2005). Οι πρωτεΐνες των μυϊκών ινών, κυρίως η ακτίνη και η μυοσίνη που αποτελούν τα 2/3 των συνολικών πρωτεϊνών του λευκού μυ.

Η μυστατίνη είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της ανάπτυξης των μυών, μέλος της οικογένειας των σηματοδοτικών μορίων TGF-β. Εκκρίνεται από τα αναπτυσσόμενα μυϊκά κύτταρα και μειώνει τόσο το ρυθμό της κυτταρικής διαίρεσης των μυοβλαστών όσο και την αύξηση του μεγέθους των μυϊκών ινών (Du et al., 2004). Σε αντίθεση με τις επιδράσεις της στη μυϊκή μάζα, η μυστατίνη προάγει την λιπογένεση και τη

συσσώρευση λίπους (Gonzalez-Cadavid et al., 2004). Η μυσστατίνη και ο υποδοχέας της εκφράζονται σε χαμηλά επίπεδα στο λιπώδη ιστό, ωστόσο ο ρυθμιστικός της ρόλος δεν είναι πλήρως κατανοητός (Gonzalez-Cadavid et al., 2004). Πολλές μελέτες έδειξαν την αρνητική επίδραση της μυσστατίνης στη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό των πρόδρομων λιποκυττάρων. Η μυσστατίνη φαίνεται να έχει έναν μηχανισμό εξισορρόπησης μεταξύ του σκελετικού μύος και του λιπώδους ιστού (Argilés et al., 2012).

Η λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), η οποία υδρολύει τα τριγλυκερίδια της κυκλοφορίας μετατρέποντάς τα σε σωματίδια λιποπρωτεΐνης, είναι ο κύριος μεσολαβητής της πρόσληψης λιπιδίων από τους ιστούς. Ελάχιστες μελέτες έχουν εξετάσει πώς επιδρά η διατροφή των ψαριών με φυτικά υποκατάστατα στη δραστηριότητα ή στην έκφραση της LPL. Στην τσιπούρα, η αντικατάσταση των ζωικών ιχθυαλευρών από φυτικές πρωτεΐνες έχει προκαλέσει αλλαγές στην ιστοειδική έκφραση του ενζύμου (Saera-Vila et al., 2005). Στην ιριδίζουσα πέστροφα (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792), τα φυτικά υποκατάστατα των ζωικών ιχθυαλευρών δεν φάνηκε να επηρεάζουν την δραστηριότητα της LPL στον λιπώδη ιστό, στο συκώτι ή στους μύες (Richard et al., 2006).

Η ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL) είναι ένα από τα κύρια λιπολυτικά ένζυμα. Η λιπόλυση, μια σημαντική διαδικασία στον καταβολισμό λίπους, ορίζεται ως η διαδοχική υδρόλυση των αποθηκευμένων TAG στα λιποκύτταρα (BolsoniLopes et al., 2015). Η ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL) εκφράζεται σε όλους τους ιστούς και κυρίως στο ήπαρ.

Τα αποτελέσματα της μέτρησης των επιπέδων έκφρασης των υπό μελέτη γονιδίων στο λευκό μυ της τσιπούρας έδειξαν ότι η επίδραση τόσο της τροφής όσο και του γενετικού υποβάθρου ήταν στατιστικώς σημαντική στη μεταγραφή του γονιδίου MYLPF B. Επίσης, υψηλότερες τιμές έκφρασης παρατηρήθηκαν για την ομάδα plant σε σύγκριση με την ομάδα control. Αυτό μας κατευθύνει στο ότι πιθανώς τα φυτικά υποκατάστατα των ιχθυοτροφών οδηγούν σε αύξηση της υπερτροφίας καθώς το γονίδιο MYLPF B, που αυξάνεται μετά τη μεταμόρφωση και εμφανίζει ένα ευρύτερο ιστο-ειδικό πρότυπο, (Moutou et al., 2005) επάγει την υπερτροφία δηλαδή την αύξηση της ολικής μάζας του μύος (αύξηση της μάζας του μυϊκού κυττάρου).

Αντιθέτως, τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου MYLPF A δεν επηρεάστηκαν από την τροφή αλλά από το γενετικό υπόβαθρο καθώς παρουσιάστηκαν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στις οικογένειες που εμφανίζουν μικρή παραλλακτικότητα και στις οικογένειες που εμφανίζουν μεγάλη παραλλακτικότητα μεταξύ των μελών της εκάστοτε οικογένειας ως προς το μέγεθος και την ανάπτυξη των ιχθύων. Το ίδιο παρατηρήθηκε και με την έκφραση του γονιδίου MYLPF B, πράγμα που υποδεικνύει ότι η έκφραση των δύο αυτών γονιδίων της μυσσίνης και ακολούθως η ρύθμιση της υπερτροφίας και της υπερπλασίας, διαδικασίες στις οποίες συμμετέχουν αυτά τα δύο γονίδια, επηρεάζονται κυρίως από το γονιδιακό υπόβαθρο του κάθε οργανισμού.

Στα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων μυσστατίνη (MSTN), λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL) και ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL) δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική επίδραση ούτε από την τροφή ούτε από το γενετικό υπόβαθρο. Αυτό υποδεικνύει ότι η μερικώς διαφορετικής σύστασης ιχθυοτροφή δεν επηρέασε σε σημαντικό βαθμό την έκφρασή τους και κατ' επέκταση τη λειτουργία τους. Επίσης, να σημειωθεί ότι και στα πέντε υπό μελέτη γονίδια δεν παρουσιάστηκε στατιστική σημαντική επίδραση της αλληλεπίδρασης της τροφής με το γενετικό υπόβαθρο. Έτσι, από τα παραπάνω προκύπτει ότι η μερική χρήση φυτικών υποκατάστατων στις ιχθυοτροφές δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά την έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων.

Παράλληλα, στην παρούσα πειραματική μελέτη, πραγματοποιήθηκε και έλεγχος συσχέτισης μεταξύ των υπό μελέτη γονιδίων. Η ανάλυση συσχέτισης μπορεί να αποκαλύψει πιθανούς κοινούς μηχανισμούς ρύθμισης

της έκφρασης γονιδίων και αν αυτή η κοινή ρύθμιση εξαρτάται από τις παραμέτρους του πειράματος, δηλαδή την οικογένεια και την τροφή.

Συγκεκριμένα, στην ανάλυση συσχέτισης συμπεριλαμβανομένων όλων των οικογενειών και των τροφών παρατηρήθηκε μια θετική συσχέτιση της έκφρασης της μυοστατίνης (MSTN) με την ορμονοευαίσθητη λιπάση (HSL) και την λιποπρωτεϊνική λιπάση (LPL), ενώ μια μικρή αρνητική συσχέτιση μεταξύ της μυοστατίνης και της MYLPF B (Πίνακας 5).

**Πίνακας 5.** Ανάλυση συσχέτισης σε όλα τα δείγματα

| ALL             | MYLPF B_300nM) | HSL_250nM    | MYLPF A (100nM) | MSTN1 (150nM) | LPL (150nM) |
|-----------------|----------------|--------------|-----------------|---------------|-------------|
| MYLPF B_300nM)  | 1,000          |              |                 |               |             |
| HSL_250nM       | 0,223          | 1,000        |                 |               |             |
| MYLPF A (100nM) | 0,081          | 0,273        | 1,000           |               |             |
| MSTN1 (150nM)   | <b>-0,044</b>  | <b>0,757</b> | <b>0,223</b>    | 1,000         |             |
| LPL (150nM)     | 0,215          | <b>0,833</b> | <b>0,154</b>    | <b>0,609</b>  | 1,000       |

Όταν η ανάλυση συσχέτισης περιορίστηκε στην ομάδα control παρατηρήθηκε πάλι θετική συσχέτιση της MSTN με την HSL και την LPL (Πίνακας 6) σε αντίθεση με στην ομάδα plant που παρατηρήθηκε αρνητική συσχέτιση της MSTN τόσο με την MYLPF B όσο και με την HSL (Πίνακας 7). Τα ίδια επίπεδα αρνητικής συσχέτισης εμφανίζονται και στην ομάδα control των οικογενειών με μικρή παραλλακτικότητα (Πίνακας 8), ενώ η αρνητική συσχέτιση είναι ακόμα μεγαλύτερη στην ομάδα plant των ίδιων οικογενειών (Πίνακας 9). Στην ομάδα control των οικογενειών με μεγάλη παραλλακτικότητα εμφανίζεται ισχυρή θετική συσχέτιση της MSTN με την HSL και την LPL και μικρότερη με την MYLPF B και μια θετική συσχέτιση της LPL με την MYLPF A (Πίνακας 10). Αντίθετα, στην ομάδα plant των οικογενειών με μεγάλη παραλλακτικότητα παρουσιάζεται αρνητική συσχέτιση της MSTN με την MYLPF B και καμία σημαντική συσχέτιση με τις HSL και LPL (Πίνακας 11).

**Πίνακας 6.** Ανάλυση συσχέτισης γονιδίων στην ομάδα που έλαβε την τροφή control

| Control         | MYLPF B_300nM) | HSL_250nM    | MYLPF A (100nM) | MSTN1 (150nM) | LPL (150nM) |
|-----------------|----------------|--------------|-----------------|---------------|-------------|
| MYLPF B_300nM)  | 1,000          |              |                 |               |             |
| HSL_250nM       | 0,289          | 1,000        |                 |               |             |
| MYLPF A (100nM) | 0,029          | 0,381        | 1,000           |               |             |
| MSTN1 (150nM)   | <b>0,118</b>   | <b>0,848</b> | <b>0,287</b>    | 1,000         |             |
| LPL (150nM)     | 0,327          | <b>0,889</b> | <b>0,189</b>    | <b>0,741</b>  | 1,000       |

**Πίνακας 7.** Ανάλυση συσχέτισης γονιδίων στην ομάδα που έλαβε την τροφή plant

| Plant           | MYLPF B_300nM) | HSL_250nM     | MYLPF A (100nM) | MSTN1 (150nM) | LPL (150nM) |
|-----------------|----------------|---------------|-----------------|---------------|-------------|
| MYLPF B_300nM)  | 1,000          |               |                 |               |             |
| HSL_250nM       | 0,313          | 1,000         |                 |               |             |
| MYLPF A (100nM) | 0,108          | 0,065         | 1,000           |               |             |
| MSTN1 (150nM)   | <b>-0,335</b>  | <b>-0,115</b> | <b>0,171</b>    | 1,000         |             |
| LPL (150nM)     | 0,140          | <b>0,708</b>  | <b>0,120</b>    | 0,040         | 1,000       |

**Πίνακας 8.** Ανάλυση συσχέτισης γονιδίων στις οικογένειες που εμφανίζουν μικρή παραλλακτικότητα στην ομάδα control

| Good            | MYLPF B_300nM) | HSL_250nM     | MYLPF A (100nM) | MSTN1 (150nM) | LPL (150nM) |
|-----------------|----------------|---------------|-----------------|---------------|-------------|
| MYLPF B_300nM)  | 1,000          |               |                 |               |             |
| HSL_250nM       | <b>0,445</b>   | 1,000         |                 |               |             |
| MYLPF A (100nM) | 0,145          | 0,295         | 1,000           |               |             |
| MSTN1 (150nM)   | <b>-0,292</b>  | <b>-0,186</b> | <b>0,354</b>    | 1,000         |             |
| LPL (150nM)     | 0,124          | <b>0,746</b>  | -0,034          | -0,220        | 1,000       |

**Πίνακας 9.** Ανάλυση συσχέτισης γονιδίων στις οικογένειες που εμφανίζουν μικρή παραλλακτικότητα στην ομάδα plant

| Good            | MYLPF B_300nM) | HSL_250nM     | MYLPF A (100nM) | MSTN1 (150nM) | LPL (150nM) |
|-----------------|----------------|---------------|-----------------|---------------|-------------|
| MYLPF B_300nM)  | 1,000          |               |                 |               |             |
| HSL_250nM       | -0,014         | 1,000         |                 |               |             |
| MYLPF A (100nM) | 0,103          | -0,045        | 1,000           |               |             |
| MSTN1 (150nM)   | <b>-0,515</b>  | <b>-0,344</b> | <b>0,150</b>    | 1,000         |             |
| LPL (150nM)     | -0,074         | <b>0,615</b>  | 0,013           | -0,095        | 1,000       |

**Πίνακας 10.** Ανάλυση συσχέτισης γονιδίων στις οικογένειες που εμφανίζουν μεγάλη παραλλακτικότητα στην ομάδα control

| <b>BAD</b>      | MYLPF B_300nM) | HSL_250nM    | MYLPF A (100nM) | MSTN1 (150nM) | LPL (150nM) first primers |
|-----------------|----------------|--------------|-----------------|---------------|---------------------------|
| MYLPF B_300nM)  | 1,000          |              |                 |               |                           |
| HSL_250nM       | <b>0,359</b>   | 1,000        |                 |               |                           |
| MYLPF A (100nM) | -0,035         | 0,434        | 1,000           |               |                           |
| MSTN1 (150nM)   | <b>0,255</b>   | <b>0,901</b> | <b>0,276</b>    | 1,000         |                           |
| LPL (150nM)     | 0,431          | <b>0,934</b> | 0,248           | <b>0,868</b>  | 1,000                     |

**Πίνακας 11.** Ανάλυση συσχέτισης γονιδίων στις οικογένειες που εμφανίζουν μεγάλη παραλλακτικότητα στην ομάδα plant

| <b>BAD</b>      | <i>MYLPF B_300nM</i> | <i>HSL_250nM</i> | <i>MYLPF A (100nM)</i> | <i>MSTN1 (150nM)</i> | <i>LPL (150nM)</i> |       |
|-----------------|----------------------|------------------|------------------------|----------------------|--------------------|-------|
| MYLPF B_300nM)  | 1,000                |                  |                        |                      |                    |       |
| HSL_250nM       | <b>0,487</b>         | 1,000            |                        |                      |                    |       |
| MYLPF A (100nM) | 0,263                | 0,178            | 1,000                  |                      |                    |       |
| MSTN1 (150nM)   | <b>-0,229</b>        | 0,132            | <b>0,123</b>           | 1,000                |                    |       |
| LPL (150nM)     | 0.390                | <b>0.840</b>     | 0.146                  | 0.161                |                    | 1.000 |

Ο σκελετικός μυς των ψαριών είναι μια σημαντική θέση για τη λιπόλυση, τη γλυκονεογένεση και μπορεί να συμβάλει και στη θερμογένεση. Αποτελεί δηλαδή βασικό ιστό για τον ενεργειακό μεταβολισμό (Gao et al. 2016). Το MSTN έχει αποδειχθεί ότι είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής της ανάπτυξης των δορυφορικών κυττάρων και της μεταεμβρυονικής μυογένεσης μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού Pax7. Μελέτες που έχουν διεξαχθεί στο zebrafish με έλλειψη του γονιδίου της MSTN έδειξαν αύξηση της μυϊκής ανάπτυξης μέσω της υπερπλασίας των μυϊκών ινών και παρόλη την αύξηση του σωματικού βάρους, ο συνολικός λόγος λιπιδίων/σωματικού βάρους παρέμεινε ίδιος αλλά η κατανομή των λιπιδίων ήταν διαφορετική. Το μέγεθος του σπλαχνικού λιπώδους ιστού μειώθηκε, ενώ περισσότερα λιπίδια συσσωρεύτηκαν στον σκελετικό μυ. Από τη μέτρηση των επιπέδων έκφρασης των εμπλεκόμενων γονιδίων LPL και HSL στην λιπογένεση, τη λιπόλυση και τη γλυκονεογένεση προέκυψε ότι ο μεταβολισμός των λιπιδίων, συμπεριλαμβανομένων των διαδικασιών της λιπόλυσης και της λιπογένεσης, ενεργοποιήθηκε ιδιαίτερα στα zebrafish που δεν είχαν το γονίδιο της MSTN, πράγμα που απέδειξε ότι για την παραγωγή ενέργειας στον σκελετικό μυ υπήρξε μετάβαση από των πρωτεϊνικό μεταβολισμό στον μεταβολισμό των λιπιδίων (Gao et al., 2016).

Έτσι, από τα παραπάνω προκύπτει ότι τα υπό μελέτη γονίδια που εκφράζονται στο λευκό μυ παρουσιάζουν κάποια κοινά πρότυπα έκφρασης για την εναρμονισμένη δράση τους και την εύρυθμη λειτουργία του ιστού. Με αυτό τον τρόπο, προσαρμόζουν την ενεργειακή λειτουργία του λευκού μυός ανάλογα με την κατάσταση στην οποία βρίσκεται λόγω περιβαλλοντικών ή γονιδιακών συνθηκών.

Συμπερασματικά, από την παρούσα ανάλυση συσχέτισης των υπό μελέτη γονιδίων στο λευκό μυ παρουσιάζεται μια αλλαγή στα πρότυπα έκφρασης μεταξύ των ομάδων control και plant, ειδικά σε σχέση με τα γονίδια της MSTN και της HSL, τα οποία στην control εμφανίζουν θετική συσχέτιση ενώ στην plant αρνητική. Ωστόσο, μεγαλύτερη αλλαγή στα πρότυπα έκφρασης παρουσιάζεται μεταξύ των οικογενειών με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά/μικρή παραλλακτικότητα και των οικογενειών με τα ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά/μεγάλη παραλλακτικότητα καθώς ενώ στις οικογένειες με μικρή παραλλακτικότητα εμφανίζεται αρνητική συσχέτιση μεταξύ αυτών των γονιδίων, στις οικογένειες με μεγάλη παραλλακτικότητα παρουσιάζεται μια αρκετά ισχυρά θετική συσχέτιση. Αυτό αποκαλύπτει ότι στα πρότυπα έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων στο λευκό μυ το γενετικό υπόβαθρο επιδρά πολύ περισσότερο σε σύγκριση με το διατροφικό καθεστώς.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albalat A., Saera-Vila A., Capilla E., Gutiérrez J., Pérez-Sánchez J., Navarro I.** (2007) Insulin regulation of lipoprotein lipase (LPL) activity and expression in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 148, 151–159
- Babin J., Vernier J. M.** (1989) REVIEW: Plasma lipoproteins in fish. *Journal of Lipid Research* 30, 467-89
- Bouraoui L., Sánchez-Gurmaches J., Cruz-García L., Gutiérrez J., Benedito-Palos L., Pérez-Sánchez J., Navarro I.** (2011) Effect of dietary fish meal and fish oil replacement on lipogenic and lipoprotein lipase activities and plasma insulin in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture Nutrition* 17, 54–63
- Colloca F., Cerasi S.** (2005) Cultured Aquatic Species Information Programme. *Sparus aurata*. *FAO Fisheries and Aquaculture Department*
- Čikoš Š., Bukovská A. & Koppel J.** (2007) Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology* 8, 113
- De Francesco M., Parisi G., Pérez-Sánchez J., Gómez-Requeni P., Médale F., Kaushik S. J., Mecatti M., Poli B. M.** (2007) Effect of high level fish meal replacement by plant proteins in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) on growth and body/fillets quality traits. *Aquacult. Nutr.* 13, 361–372
- Du T.Y., Standen E. M.** (2017) Phenotypic plasticity of muscle fiber type in the pectoral fins of *Polypterus senegalus* reared in a terrestrial environment. *Journal of Experimental Biology* 220, 3406-3410
- FAO** (2004) Cultured Aquatic Species Information Programme. *Anguilla*
- FAO** (2015) Fisheries and aquaculture software. FishStatJ - software for fishery statistical time series
- Funkenstein B., Balas V., Rebhan Y., Pliatner A.** (2009) Characterization and functional analysis of the 5' flanking region of *Sparus aurata* myostatin-1 gene. *Comparative Biochemistry and Physiology* 153, 55–62
- Gao Y., Dai Z., Shi C., Zhai G., Jin X., He J., Lou Q., Yin Z.** (2016) Depletion of Myostatin b Promotes Somatic Growth and Lipid Metabolism in Zebrafish. *Frontiers in endocrinology* 7, 88
- Gonzalez-Cadavid N. F., Bhasin S.** (2004) Role of myostatin in metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7(4), 451-7
- Hagström-Toft E., Thörne A., Reynisdóttir S., Moberg E., Rössner S., Bolinder J.** (2001) Evidence for a major role of skeletal muscle lipolysis in the regulation of lipid oxidation during caloric restriction in vivo. *Diabetes* 50(7), 1604-11
- Jian S., Zhou Y., PeiZhen X., Yong L., Hong J., ZhenYu D., LiQiao C.** (2016) Two isoforms of hormone-sensitive lipase b are generated by alternative exons usage and transcriptional regulation by insulin in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Physiology and Biochemistry* 43, 539–547
- Johnston I. A.** (2006) Review: Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology* 209, 2249-2264
- Johnston I. A., Bower Neil I. and Macqueen Daniel J.** (2011) REVIEW: Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *The Journal of Experimental Biology* 214, 1617-1628
- Johnson J. L., Bagby G. J.** (1985), (1988) Gluconeogenic pathway in liver and muscle glycogen synthesis after exercise. *J Appl Physiol* 64(4), 1591–9



- Khieokhajonkhet A., Kaneko G., Ohara K., Shirakami H., Ushio H.** (2014) Hormone-sensitive lipase in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*: the potential function of the inclinator muscle of fin as a lipid storage site. *The Japanese Society of Fisheries Science* 80, 341–351
- Klaoudatos, S., Klaoudatos D.** (2004) Brood stock formation of the hermaphrodite finfish species *Pagellus erythrinus* (common Pandora) from fish reared in captivity. *Mediterranean Marine Science* 5(1), 187-198
- Koumans J. T. M., Akster H. A.** (1995) Myogenic cells in development and growth of fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 110, 3–20
- Kraemer F. B., Shen W. J.** (2002) Thematic Review Hormone-sensitive lipase. *Journal of lipid research* 43, 10
- Lehner R., Quiroga A. D.** (2016) Fatty Acid Handling in Mammalian Cells, Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes (Sixth Edition)
- Lowey S., Trybus K. M.** (1995) Role of skeletal and smooth muscle myosin light chains. *Biophys. J.* 68, 120-127
- Maccatrozsoa L., Bargellonia L., Cardazzoa B., Rizzoa G., Patarnello T.** (2001) A novel second myostatin gene is present in teleost fish. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 509, 36-40
- Mascarello F, Rowlerson A, Radaelli G, Scapolo PA and Veggetti A.** (1995) Differentiation and growth of muscle in the fish *Sparus aurata* (L): I. Myosin expression and organization of fiber type in lateral muscle from hatching to adult. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 16, 213-222
- Mead J. R., Irvine S. A., Ramji D. P.** (2002) Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *Journal of Molecular Medicine* 80, 753–769
- 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. *Journal of Experimental Biology* 204, 3009-3018
- Moutou K. A., Silva N., Mamuris Z. and Power D. M.** (2005) Expression of the myosin light chains 1 and 2 in the developing fast muscle of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Arch Tierz., Dummerstorf* 48, 75
- Nadjar-Boger E., Hinits Y., Funkenstein B.** (2012) Structural and functional analysis of myostatin-2 promoter alleles from the marine fish *Sparus aurata*: Evidence for strong muscle-specific promoter activity and post-transcriptional regulation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 361, 51-68
- Nadjar-Boger E., Funkenstein B.** (2011) Myostatin-2 gene structure and polymorphism of the promoter and first intron in the marine fish *Sparus aurata*: evidence for DNA duplications and/or translocations. *BMC Genetics* 12, 22
- Papoutsoglou S. E.** (2000) Monitoring and regulation of marine aquaculture in Greece: licensing, regulatory control and monitoring guidelines and procedures. *Journal of Applied Ichthyology* 16, 167–171
- Pfaffl Michael W.** (2004) Quantification strategies in real-time PCR. *International University Line*, p 63-82
- Richard N., Mourente G., Kaushik S., Corraze G.** (2006) Replacement of a large portion of fish oil by vegetable oils does not affect lipogenesis, lipid transport and tissue lipid uptake in European seabass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Aquaculture* 261, 1077–1087
- Rowlerson A. M., Scapolo P. A., Mascarello F., Carpené E., Veggetti A.** (1985) Comparative study of myosins present in the lateral muscle of some fish: species variations in myosin isoforms and their distribution in red, pink and white muscle. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 6, 601-40

- 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 & Cell Motility* 16, 223–236
- Rowlerson A., Veggetti A.** (2001) Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. *Fish Physiol.* 18, 103–140
- Rowlerson A., Veggetti A.** (2001) Cellular mechanisms of post-embryonic muscle growth in aquaculture species. In: Muscle Development and Growth. *Fish Physiology Series* 18
- Ruderman N. B.** (1975) Muscle amino-acid metabolism and gluconeogenesis. *Annu Rev Med* 26, 245–58
- Salmerón C.** (2018) Review Adipogenesis in fish. *Journal of Experimental Biology* 221
- Slack,** (2007): Κεφ.15 Ανάπτυξη των οργάνων μεσοδερμικής προέλευσης, Σελ.307 Μυογένεση
- Stipa P., Angelini M.** (2005) Cultured Aquatic Species Information Programme. *Argyrosomus regius*. *FAO Fisheries and Aquaculture Department*
- Tian J., Wu F., Yang C. G., Jiang M., Liu W., Wen H.** (2015) Dietary lipid levels impact lipoprotein lipase, hormone-sensitive lipase, and fatty acid synthetase gene expression in three tissues of adult GIFT strain of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem* 41, 1–18
- Vandesompele J., Preter K. D., Pattyn F., Poppe B., Roy N. V., Paepe A. D., Speleman F.** (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3
- Wang H., Eckel R. H.** (2013) Lipoprotein lipase: from gene to obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297, E271-88
- Welle S., Cardillo A., Zanche M., Tawil R.** (2009) Skeletal muscle gene expression after myostatin knockout in mature mice. *Physiol Genomics* 38, 342–350
- Life Technologies Corporation** (2012) Real-time PCR handbook. [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)
- [www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)