

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΥ ΤΩΝ ΤΡΟΧΟΖΩΩΝ (*Brachionus sp*)
ΜΕ ΣΕΛΗΝΙΟ ΚΑΙ ΙΩΔΙΟ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΤΕΛΩΝ ΙΧΘΥΔΙΩΝ
ΤΣΙΠΟΥΡΑΣ (*Sparus aurata*)**

ΠΑΠΑΔΑΚΗΣ ΙΩΑΝΝΗΣ – ΑΝΤΩΝΙΟΣ

Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας

Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, Αθήνα, 118 55.

Στοιχεία επικοινωνίας συγγραφέα Email: yanispapadakis84@gmail.com

Στοιχεία επικοινωνίας επιβλέποντα καθηγητή Παπουτσόγλου Ε.Σ., Λέκτορας: Email:
stratospap@aua.gr

Περίληψη

Κατά τη διάρκεια του πειράματος, που έλαβε χώρα σε εμπορικό ιχθυογεννητικό σταθμό (διάρκειας 16 ημερών), εξετάστηκαν δυο διαφορετικοί εμπλουτισμοί Τροχοζώων όσον αφορά στην επίδραση τους στην ανάπτυξη ατελών ιχθυδίων τσιπούρας (*Sparus aurata*) έως και 14 ημέρες μετά την εκκόλαψη (14 dph). Ο ένας περιελάμβανε την χρήση ενός κοινού εμπορικού εμπλουτιστικού μέσου και ο άλλος την χρήση του ίδιου εμπλουτιστικού μέσου με τη διαφορά της προσθήκης σε αυτό, μαγιάς εμπλουτισμένης με σεληνίο ως πηγή σεληνίου και ιωδιούχου νατρίου (NaI) ως πηγή ιωδίου. Οι συγκεντρώσεις σεληνίου και ιωδίου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εντός του εύρους που απαντάται στα Κωπήποδα, τη φυσική τροφή των θαλασσιών ιχθυδίων. Χρησιμοποιήθηκαν 5 ομοιογενείς, όσον αφορά στην προέλευση των αυγών, στην αρχική πυκνότητα και τα αρχικά βασικά βιομετρικά τους χαρακτηριστικά, πληθυσμοί ατελών ιχθυδίων τσιπούρας (*Sparus aurata*). Η επώαση των αυγών και η εκτροφή των ιχθυδίων έγινε σε 5 κυλινδρικών δεξαμενές (στις ίδιες έλαβαν χώρα τόσο η επώαση των αυγών όσο και η εκτροφή των ιχθυδίων) των 2.8m³ έκαστη.

Ως δείκτες ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν βιομετρικά χαρακτηριστικά (σταθερό μήκος (SL), ύψος κεφαλής (HD), ύψος σώματος (BD), διάμετρος σταγόνας

ελαίου) καθώς και ο λόγος RNA/DNA και η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (G_{pr}).

Παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά ($*P<0.05$), ως προς το σταθερό μήκος (SL), την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη, ανάμεσα στα ιχθύδια της επέμβασης και του μάρτυρα, με εκείνα της επέμβασης (ιχθύδια που κατανάλωσαν Τροχόζωα εμπλουτισμένα με σελήνιο και ιώδιο) να είναι μεγαλύτερα από εκείνα του μάρτυρα (ιχθύδια που δεν κατανάλωσαν Τροχόζωα εμπλουτισμένα με σελήνιο και ιώδιο). Συγκεκριμένα τα ιχθύδια της επέμβασης είχαν σταθερό μήκος ίσο με $(4.90 \pm 0.013 \text{ mm}$ Τυπικό σφάλμα M.O, n= 3) ενώ του μάρτυρα είχαν σταθερό μήκος ίσο με $(4.60 \pm 0.080 \text{ mm}$ Τυπικό σφάλμα M.O, n=2), την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη. Επίσης σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε στην % συχνότητα κλάσεων μηκών (mm) σταθερού μήκους (SL), την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη, ανάμεσα στην επέμβαση και το μάρτυρα (n= 3 σε κάθε ομάδα επέμβασης/αναπτυξιακού σταδίου, n=2 σε κάθε ομάδα μάρτυρα/αναπτυξιακού σταδίου).

α) στο ποσοστό των μικρότερου μήκους ιχθυδίων έως 4.33 mm την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη (αποτελούν το 25% των ιχθυδίων του μάρτυρα και περίπου το 5% των ιχθυδίων της επέμβασης).

β) στο ποσοστό των μεγάλου μήκους ιχθυδίων από 4.70-5.34 mm (24% ο μάρτυρας, 48% η επέμβαση),

γ) στο ποσοστό των πολύ μεγάλου μήκους ιχθυδίων > 5.34 mm (περίπου 2% ο μάρτυρας και 8% η επέμβαση).

Στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($**P<0.01$, n=3) παρατηρήθηκαν επίσης αναφορικά με το λόγο RNA/DNA και την ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (G_{pr}), ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια της επέμβασης: α) Την ένατη (9 dph) έως την ενδέκατη (11 dph) ημέρα και β) ανάμεσα στην ενδέκατη (11 dph) ημέρα και την δέκατη τέταρτη (14 dph).

Συμπερασματικά, στην παρούσα μελέτη, ο εμπλουτισμός με σελήνιο και ιώδιο φαίνεται να ενίσχυσε την ανάπτυξη των ιχθυδίων που τα κατανάλωσαν. Αυτό πράγματι, παρατηρείται και στα αποτελέσματα της ένατης ημέρας μετά την εκκόλαψη (9 dph) όπου και οι δυο προσδιοριζόμενες παράμετροι (RNA/DNA, G_{pr}, n=3 ανά ομάδα επέμβασης/ημέρες μετά την εκκόλαψη και n=2 ανά ομάδα μάρτυρα/ημέρες μετά την εκκόλαψη) ήταν στατιστικώς σημαντικά ($**P<0.01$) υψηλότερες στην επέμβαση σε σχέση με το μάρτυρα. Επίσης παρά το γεγονός ότι υπάρχει μια τάση μείωσης προς την ημέρα 11 μετά την εκκόλαψη, ωστόσο μη στατιστικώς

σημαντική ($P > 0.05$) (ανάμεσα στις επεμβάσεις), ο λόγος RNA/DNA και η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (Gpri) έδειξαν μεγαλύτερες τιμές και για τις δυο επεμβάσεις την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη (14 dph). Εκτιμάται ότι αυτή η αρνητική τάση ενδεχομένως να οφείλεται στην προετοιμασία των ιχθυδίων για την είσοδο τους σε ένα επόμενο αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο ένα μέρος της ενέργειας χρησιμοποιείται για μεταβολικές διεργασίες που ίσως συνδέονται με το επόμενο αναπτυξιακό στάδιο μετά την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη. Για να υπάρξει σαφής εικόνα των παραπάνω ισχυρισμών απαιτούνται περισσότερες πειραματικές ενδείξεις για τα επόμενα αναπτυξιακά στάδια. Αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο έρευνας στο μέλλον.

Από αυτή τη μελέτη προκύπτει ότι ο λόγος RNA/DNA αποτελεί έναν χρήσιμο δείκτη ανάπτυξης ακόμα και για βραχέα χρονικά διαστήματα ενώ απαιτείται περισσότερη έρευνα πάνω στους παράγοντες που τον επηρεάζουν. Επιπλέον, απ' όσο μπορούμε να αποφανθούμε και με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία είναι η πρώτη φορά όπου παρατηρείται θετική επίδραση, αν και χρονικά περιορισμένη στην έκταση της μελέτης μας, στην ανάπτυξη ιχθυδίων τσιπούρας (*Sparus aurata*) από την επέμβαση εμπλουτισμένου σιτηρεσίου με σελήνιο και ιώδιο,.

Λέξεις κλειδιά: ιχθύδιο, τσιπούρα, *Sparus aurata*, σελήνιο, ιώδιο, ιχγοστοιχεία, διατροφή, ανάπτυξη, RNA/DNA, βιομετρία, πρωτεΐνη

**EFFECT OF THE ENRICHMENT OF ROTIFERS (*Brachionus sp*) WITH
SELENIUM AND IODINE ON GROWTH OF GILTHEAD SEA BREAM
(*Sparus aurata*) LARVAE**

Papadakis Ioannis – Antonios

*Laboratory of Applied Hydrobiology, Department of Animal Science and
Aquaculture, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 11855 Athens,
Greece*

Author communication: Email: : yanispapadakis84@gmail.com

Coordinator Professor communication Papoutsoglou E.S, Lecturer: Email:
stratospap@aua.gr

Abstract

This research work was conducted in an industrial environment inside a commercial marine finfish hatchery and the whole procedure lasted 16 days from the start of the experiment. Under the conditions of the experiment, two different rotifer enrichment protocols and their influence on growth of gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) aged up to 14 days post hatching (14 dph), were examined. The first one included the use of a standard commercial enrichment product (“control”) and the second the use of the same commercial enrichment product with the addition of selenized yeast (as the selenium source) and sodium iodide (NaI) as the source of iodine (“enrichment”). The concentrations of selenium and iodine used, followed the range observed in copepods, the natural nutritional source of marine fish larvae. Five (5) homogeneous populations of gilthead sea bream larvae were established, taking into account the source of eggs (broodstock), fish larval density and initial biometric characteristics. The incubation of eggs and rearing of sea bream larvae took place, in 5 cylindro-conical tanks of 2.8m³ volume size each.

A further study with growth indices in gilthead sea bream larvae also included certain biometric characters, namely the following: standard length (SL), head height

(HD), body height (BD), eye length (EL), eye height (EH), oil droplet diameter, as well as the RNA/DNA ratio and the daily % protein growth (Gpi).

Briefly, the results indicated that:

S. aurata larvae in the enrichment treatment group had a statistically significant increase ($*P<0.05$) in standard length (SL) (4.90 ± 0.013 mm S.E. mean, $n=3$), at day 14 post hatching compared to *S. aurata* larvae in the control group (4.60 ± 0.080 mm S.E. mean, $n=2$). Significant difference was also observed regarding the frequency % of the standard lengths (SL), at day 14th post-hatching (dph), between the enrichment and the control groups ($n=3$ per enrichment group/Dph, $n=2$ per control group/Dph).

In detail:

- a) The proportion of the smallest larvae (<4.33 mm) at day 14 post-hatching was 25% of the population of the control group and about 5% in the enrichment group.
- b) The proportion of the median size fish larvae (4.70mm - 5.34mm) was 24% of the population of the control group and about 48% of the population in the enrichment group.
- c) The proportion of the larger larvae (>5.34 mm) was 2% of the population of the control group and about 8% of the population in the enrichment group.

Statistically significant differences ($**P<0.01$, $n=3$) were also observed regarding the RNA/DNA ratio and the daily % protein growth (Gpi), between the developmental stages of the enrichment groups: a) 9th to 11th day (dph) and b) between 11th to 14th day (dph) under study.

It can be argued that the enrichment of rotifers with selenium and iodine enhances growth of gilthead sea bream larvae. This is observed in our results during the 9th day (dph) where both the parameters RNA/DNA and Gpi were significantly higher ($**P<0.01$) than the control. Also despite the fact there was a negative trend towards the 11th day (dph), this was not significant ($P>0.05$). RNA/DNA ratio and Gpi ($n=3$ per enrichment group/Dph, $n=2$ per control group/Dph) showed higher means in both, especially during the 14th day (dph). We estimate that this negative trend is due to the larval preparation for the next development phase that activates metabolism to take later off and after the 14th day, as we judge by our measurements from the kinetics of growth parameters (length etc) RNA/DNA and Gpi. To have a clear picture of the

latter, more experimental evidence is required at the later developmental stages to support our findings. This could be investigated in a future study.

From the current study, it is indicated that the RNA/DNA ratio is a very useful index of growth, especially for short-term growth increments, while more research is required on the influencing factors.

To the best of our knowledge, this work in a commercial environment indicates for the first time in the literature, that rotifer enrichment with selenium and iodine fed to gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*), although in a short-term study, has positive effect on larval growth.

Key words: fish larvae, gilthead sea bream, *Sparus aurata*, rotifers, *Brachionus*, enrichment, selenium, iodine, micronutrients, nutrition, growth, RNA/DNA, protein, biometry

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Στοιχεία Διατροφής και ανάπτυξης ιχθυδίων με έμφαση στην τσιπούρα (*Sparus aurata*)

Το αναπτυξιακό στάδιο των ατελών ιχθυδίων οριοθετείται από το στάδιο της μεταμόρφωσης η οποία με τη σειρά της προσδιορίζεται από εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και χαρακτηριστικά της φυσιολογίας τους (NRC, 1993). Τα εξωτερικά μορφολογικά χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες των κύριων οργάνων θα πρέπει να είναι εκείνα των ενήλικων ιχθύων. Σύμφωνα με Dabrowski (1984) τα ατελή ιχθύδια μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες με βάση τη μορφολογία του γαστρεντερικού σωλήνα τους και τα ένζυμα που εκκρίνονται στον πεπτικό τους σωλήνα.

Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει ιχθύς όπως αυτούς της οικογένειας *Salmonidae* και το *Ictalurus punctatus* όπου εμφανίζουν να έχουν λειτουργικό στομάχι ήδη πριν τη μετάβαση από την ενδογενή τροφοληψία (λέκιθος) στην εξωγενή. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει ιχθύς, κυρίως θαλάσσιας προέλευσης, όπου στα πρώιμα στάδια διαθέτουν ένα υποτυπώδη πεπτικό σύστημα, χωρίς λειτουργικό στομάχι, με απουσία γαστρικών υγρών και για τα οποία ακολουθεί μια σύνθετη διαδικασία διαμόρφωσης του πεπτικού τους συστήματος κατά τη μεταμόρφωση. Η τρίτη κατηγορία ιχθυδίων περιλαμβάνει εκείνους τους οργανισμούς που αναπτύσσουν ένα λειτουργικό πεπτικό σύστημα αλλά παραμένουν δίχως στομάχι κατά τον κύκλο της ζωής τους, όπως αυτά της οικογένειας *Cyprinidae*. Τα είδη που από την πρώτη στιγμή της χορήγησης εξωγενούς τροφής διαθέτουν καλώς ιστολογικά διαφοροποιημένο πεπτικό σύστημα αντιμετωπίζουν μικρότερο πρόβλημα όσον αφορά στο είδος της χορηγούμενης τροφής. Εκείνα με όχι

ολοκληρωμένο πεπτικό σύστημα κατά την πρώτη χορήγηση εξωγενούς τροφής είναι δυσκολότερο να τραφούν και συνήθως απαιτούν πλαγκτονικούς οργανισμούς για να τραφούν.

Τα ιχθύδια τσιπούρας (*Sparus aurata*) ανήκουν στην δεύτερη ομάδα και απαιτούν στα πρώιμα στάδια ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς, στην αρχή Τροχόζωα (είδη του γένους *Brachionus*) και έπειτα είδη του γένους *Artemia* (Pavlidis & Mylonas, 2011; FAO, 1999).

Τα ατελή ιχθύδια περνάνε από διάφορες φάσεις μέχρι την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης τους, την τελειοποίηση τους σε όμοια των ενήλικων ατόμων τους είδους τους και την πλήρη προσαρμογή τους σε σιτηρέσιο αποκλειστικά βασισμένο σε ξηρά ειδικά επεξεργασμένη τροφή. Η εμφάνιση των γαστρικών υγρών σηματοδοτεί τη δημιουργία ενός λειτουργικού στομάχου (Zambonino- Infante et al., 2008) το οποίο αποτελεί και ιστολογικό κριτήριο διάκρισης της ατελούς από την τέλεια φάση των ιχθυδίων. Η δημιουργία των πυλωρικών τυφλών σηματοδοτεί την τελευταία κύρια μεταβολή του πεπτικού συστήματος των ιχθυδίων.

Για την τσιπούρα ο στόμαχος αρχίζει να αναπτύσσεται από την ημέρα 20 μετά την εκκόλαψη (FAO, 1999), η εμφάνιση των πρώτων γαστρικών υγρών συμβαίνει στις 45 ημέρες μετά την εκκόλαψη (Domeneghini et al., 1998) ενώ η ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης λαμβάνει χώρα στις 55 ημέρες μετά την εκκόλαψη (Domeneghini et al., 1998). Σύμφωνα με το FAO (1999) η χορήγηση ξηράς τροφής σε ιχθύδια τσιπούρας μπορεί να ξεκινήσει από την ημέρα 17 μετά την εκκόλαψη κυρίως για λόγους εξοικείωσης με το νέο είδος τροφής. Η χορήγηση ζωοπλαγκτού σταματά με τη λήξη της μεταμόρφωσης και πλέον τα ιχθύδια διατρέφονται αποκλειστικά με ξηρή τροφή (FAO, 1999).

Πίνακας 1.1: Σημαντικά ιχνοστοιχεία για θηλαστικά, πτηνά και ιχθύς (Watanabe et.al., 1997)

Κοβάλτιο	Αρσενικό ^a
Χαλκός	Μολυβδαίνιο ^a
Σίδηρος	Φθόριο ^a
Μαγνήσιο	Μόλυβδος ^a
Σελήνιο	Νικέλιο ^a
Ψευδάργυρος	Πυρίτιο ^a
Χρόμιο	Βανάδιο ^a
Ιώδιο	Λίθιο ^a

^a Περιορισμένη πληροφορία για ιχθύς

Πίνακας 1.2: Τα εύρη των απαιτήσεων σε μεταλλικά ιχνοστοιχεία για τους ιχθύς (Watanabe et.al., 1997).

Μέταλλο	Απαιτήση^a
Σίδηρος	30-170
Χαλκός	1-5
Μαγνήσιο	2-20
Ψευδάργυρος	15-40
Κοβάλτιο	0,05-1
Σελήνιο	0,15-0,5
Ιώδιο	1-4

^a Εκφρασμένα ως mg μετάλλου / Kg ξηρού βάρους σιτηρεσίου

1.1.1. Ανόργανα στοιχεία στη διατροφή των ιχθύων

Τα μέταλλα απαιτούνται για όλες τις φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες, και όλα τα ζώα, συμπεριλαμβανομένων και των ιχθύων χρειάζονται αυτά τα ανόργανα στοιχεία (Watanabe et al., 1997). Οι ιχθύες, σε αντίθεση με τα περισσότερα χερσαία ζώα, μπορούν να απορροφήσουν ορισμένα μέταλλα (ανόργανα στοιχεία) όχι μόνο από το

σιτηρέσιο τους αλλά επίσης από το εξωτερικό υδάτινο περιβάλλον τους (NRC, 1993). Το ασβέστιο (Ca), το μαγνήσιο (Mg), το νάτριο (Na), το κάλιο (K), ο σίδηρος (Fe), ο ψευδάργυρος (Zn), ο χαλκός (Cu), και το σελήνιο (Se) γενικά προέρχονται από το νερό για να ικανοποιήσουν μέρος των διατροφικών απαιτήσεων των ιχθύων. Τα φωσφορικά και τα θειϊκά ιόντα ανακτώνται περισσότερο αποτελεσματικά από διατροφικές πηγές.

Οι κυριότερες λειτουργίες των μεταλλικών ανόργανων στοιχείων (μακρομεταλλικά στοιχεία και μεταλλικά ιχνοστοιχεία) είναι ότι συμμετέχουν (NRC, 1993):

1. στη δημιουργία της δομής του σκελετού.
2. στη μεταφορά των ηλεκτρονίων.
3. στην ρύθμιση της οξεοβασικής ισορροπίας και στην οσμωρύθμιση και
4. Αποτελούν σημαντικά συστατικά ορμονών και ενζύμων ενώ ενεργοποιούν και ένζυμα.

Τα απαραίτητα μεταλλικά ιχνοστοιχεία για τους ιχθύς σύμφωνα με (Watanabe et al., 1997) παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1. Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται ορισμένα γενικά εύρη συγκεντρώσεων που καλύπτουν τις θρεπτικές απαιτήσεις των ιχθύων σε μεταλλικά ιχνοστοιχεία (Watanabe et al., 1997).

1.1.1.1. Βιολογική διαθεσιμότητα μεταλλικών ιχνοστοιχείων

Η βιολογική διαθεσιμότητα ενός μεταλλικού ιχνοστοιχείου προερχόμενου από την τροφή χαρακτηρίζεται από την αποτελεσματικότητα με την οποία το σώμα χρησιμοποιεί το συγκεκριμένο μεταλλικό ιχνοστοιχείο (Watanabe et al., 1997).

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν την βιολογική διαθεσιμότητα, όπως:

1. Το επίπεδο της συγκέντρωσης και η μορφή του μεταλλικού ιχνοστοιχείου.
2. Το μέγεθος και η πεπτικότητα της τροφής.
3. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των θρεπτικών στοιχείων που μπορεί να είναι συνεργιστικές ή ανταγωνιστικές.
4. Η κατάσταση της φυσιολογίας και της παθολογίας του ιχθύος.
5. Η υδατογενής συγκέντρωση του μεταλλικού ιχνοστοιχείου και οι μορφές με τις οποίες απαντάται στο νερό.

Από τους παραπάνω παράγοντες, εκείνοι που σχετίζονται με την χημική μορφή του μετάλλου είναι σημαντικές γιατί το στοιχείο μπορεί να λαμβάνει διαφορετικές μοριακές μορφές προερχόμενο από διαφορετικά σιτηρέσια. Τα μη διαλυτά και μη απορροφούμενα συστατικά τα οποία δημιουργούνται στον γαστρεντερικό σωλήνα του ζώου μπορούν είτε να εμποδίζουν είτε να ενισχύουν την ανάκτηση, τη μεταφορά και το μεταβολισμό του στοιχείου. Κατά τη διάρκεια αυτών των διεργασιών άλλα ανόργανα στοιχεία ανταγωνίζονται με το μεταλλικό ιχνοστοιχείο προς ανάκτηση ευνοϊκότερων θέσεων πρόσδεσης. Εκτός από τους προαναφερθέντες μηχανισμούς, που σχετίζονται με το σιτηρέσιο, υπάρχουν και άλλοι που σχετίζονται με περιβαλλοντικές παραμέτρους.

1.1.1.2. Σελήνιο

Το σελήνιο αποτελεί απαραίτητο θρεπτικό ιχνοστοιχείο για τα σπονδυλωτά (Watanabe et al., 1997) αλλά επίσης το όριο ανάμεσα στις θρεπτικές απαιτήσεις σε σελήνιο και την τοξικότητα του είναι το ελάχιστο από όλα τα στοιχεία (Chassaingne et al., 2002; Polatajko et al., 2006).

Οι απαιτήσεις σε σελήνιο προσδιοριζόμενες στη βάση της άριστης ανάπτυξης και της μέγιστης δραστηριότητας της υπεροξειδάσης της

γλουταθειόνης στο πλάσμα έχουν υπολογιστεί σε 0,15 – 0,38 mg/Kg τροφής για την ιριδίζουσα πέστροφα και 0,25 mg/Kg για το channel catfish (*Ictalurus punctatus*). Η τοξικότητα του σεληνίου είναι εμφανής όταν η συγκέντρωση του υπερβαίνει τα 13 mg/Kg τροφής για την ιριδίζουσα πέστροφα και τα 15 mg/Kg για το channel catfish (NRC, 1993).

Έλλειψη σεληνίου γενικά προκαλεί αναστολή της ανάπτυξης (Watanabe et al., 1997). Μπορεί να καταστήσει ευάλωτα σε οξειδωτικό stress τα ιχθύδια μπακαλιάρου του Ατλαντικού (*Gadus morhua* L.) (Kamisaka et al., 2010) και να προκαλέσει βλάβη στο νευρικό σύστημα και στο συκώτι ενήλικων ατόμων ιριδίζουσας πέστροφας (Bell et al., 1986), ή ληθαργικές τάσεις και μείωση της όρεξης σε ιχθύδια σολομού (Poston et al., 1979). Επιπλέον, μπορεί να προκαλέσει διάφορες παθολογικές καταστάσεις σε συνδυασμό με χαμηλά επίπεδα βιταμίνης E. Επίσης, σοβαρές διαταραχές ενζυμικών συστημάτων των ηπατοκυττάρων (Παπουτσόγλου, 2008) και ήπιας μορφής μυϊκή δυσμορφία (Παπουτσόγλου, 2008). Ακόμη αυξημένα επίπεδα θνησιμότητας, αιμορραγίες, αναιμία, μείωση τιμής αιματοκρίτη, συγκέντρωση νερού στην περιτοναϊκή κοιλότητα και περικάρδιο, εκφυλισμός μυοκαρδίου και δευτερογενής ευπάθεια σε μολυσματικές ασθένειες (Παπουτσόγλου, 2008)

Το σεληνίο αποτελεί αναπόσπαστο δομικό συστατικό του αντιοξειδωτικού ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) (NRC, 1993). Αυτό το ένζυμο αποτελεί μέρος του αντιοξειδωτικού συστήματος του οργανισμού, μειώνοντας το υπεροξειδίο του υδρογόνου ή οργανικά υπεροξειδία και ως εκ τούτου προστατεύει τα κύτταρα και τις μεμβράνες από την βλάβη εξαιτίας των υπεροξειδίων. Το σεληνίο αποτελεί δομικό συστατικό των σεληνοπρωτεϊνών αποϊωδινάση τύπου I, II, III (D1, D2, D3) (Kohrle et al., 2005). Οι αποϊωδινάσες είναι υπεύθυνες για τη

μετατροπή της θυροξίνης (T4) σε τριωδοθυρονίνη (T3) και κατά συνέπεια ελέγχουν τόσο τα επίπεδα τους όσο και τον λόγο T3/T4 για διάγνωση προβλημάτων που αφορούν το θυρεοειδή (Kohrle et al., 2005; Klaren et al., 2008). Η παραγωγή θυρεοειδικών ορμονών αποτελεί έντονα οξειδωτική διεργασία και η ομάδα ενζύμων της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) προστατεύει τα θυρεοειδή θυλάκια από βλάβες (Penglase et al., 2010). Επισημαίνεται ο αλληλεπιδραστικός ρόλος της βιταμίνης E με την ομάδα ενζύμων της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης στην αντιοξειδωτική άμυνα του οργανισμού (Penglase et al., 2010). Επίσης τονίζεται ο αντιτοξικός ρόλος σε βαρέα μέταλλα, ιδιαίτερα Cd και Hg (Παπουτσόγλου, 2008).

Το σημείο της μέγιστης δραστηριότητας της ομάδας των ενζύμων της υπεροξειδάσης της γλουταθειόνης (GPx) αποτελεί βιοδείκτη για την εκτίμηση των θρεπτικών απαιτήσεων των ιχθύων σε σελήνιο (Penglase et al., 2010). Οι θρεπτικές απαιτήσεις των ιχθύων σε σελήνιο ποικίλουν ανάλογα με τη μορφή του σεληνίου που προσλαμβάνουν, τα περιεχόμενα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, τη βιταμίνη E και την συγκέντρωση του σεληνίου στο νερό (NRC, 1993). Η βιολογική διαθεσιμότητα του σεληνίου είναι υψηλή όταν απαντάται στη μορφή της σεληνομεθειονίνης (Penglase et al., 2011). Η ανάκτηση του σεληνίου δια των βραγχιών αυξάνεται όταν η συγκέντρωσή του στο νερό είναι χαμηλή (Hodson et al., 1983).

Για τον εμπλουτισμό των Τροχοζών με σελήνιο χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι. Ως πηγή σεληνίου μπορεί να χρησιμοποιηθούν είτε σεληνικό νάτριο (Penglase, et al., 2011) είτε μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο (Ribeiro et al., 2011).

Λόγω του κατάλληλου μεγέθους και την υψηλή της σταθερότητα στην υδάτινη στήλη, η μαγιά μπορεί εύκολα να καταποθεί από διηθηματοφάγους οργανισμούς όπως τα Τροχόζωα. Επιπλέον μπορεί να

παραχθεί με σχετικά μικρό κόστος. Η χρήση της μαγιάς ως διατροφικό μέσο στην υδατοκαλλιέργεια έχει ευρεία εφαρμογή στην εκτροφή των Τροχοζώων και των γαρίδων της οικογένειας *Penaeidae*. Έχει καταγραφεί η χαμηλή διατροφική αξία της μαγιάς για διάφορους διηθηματοφάγους οργανισμούς, γεγονός που οφείλεται τόσο στην ελλιπή θρεπτική της σύνθεση όσο και στο μη πεπτόμενο κυτταρικό της τοίχωμα. Παρόλα αυτά η θρεπτική αξία και η πεπτικότητα των σιτηρεσίων βασισμένων στη μαγιά μπορούν να βελτιωθούν με την προσθήκη απαραίτητων θρεπτικών συστατικών και την χημική επεξεργασία του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης (FAO, 1996).

1.1.1.3. Μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο

Η μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο παράγεται από επιλεγμένα στελέχη του μύκητα *Saccharomyces cerevisiae* σε θρεπτικό μέσο πλούσιο σε σελήνιο (σεληνικό νάτριο), και αναγνωρίζεται ως πηγή σεληνίου σε οργανική μορφή (Schrauzer, 2006). Πάνω από το 90% του περιεχόμενου σεληνίου είναι στη μορφή της σεληνομεθειονίνης (Schrauzer, 2006). Το ποσοστό της σεληνομεθειονίνης μπορεί να είναι 60-85%, η σεληνοκυστεΐνη 2-4% και το ανόργανο σελήνιο σε μορφή ιόντων <1%. Η χρήση της μαγιάς εμπλουτισμένης με σελήνιο επιτρέπεται από τον αμερικανικό οργανισμό FDA και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Schrauzer, 2006).

Ο μύκητας *Saccharomyces cerevisiae* ανακτά ανόργανο σελήνιο από το θρεπτικό μέσο και το μετατρέπει σε σεληνομεθειονίνη (Schrauzer, 2006). Η βιοσύνθεση της σεληνομεθειονίνης είναι ανάλογη τόσο της περιεχόμενης μεθειονίνης όσο και των ενζύμων που συμμετέχουν στη μεταβολική διεργασία. Η μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο του εμπορίου έχει παρασκευαστεί να περιέχει 500 – 2000 ppm Se και είναι παρόμοια

με την κοινή μαγιά όσον αφορά στην εμφάνιση, την υφή, την οσμή, τη μικροβιολογική καθαρότητα και το περιεχόμενο σε βιταμίνες (Schrauzer, 2006).

1.1.1.4. Ιώδιο

Το ιώδιο αποτελεί απαραίτητο θρεπτικό ιχνοστοιχείο για τα σπονδυλωτά (Watanabe et al., 1997). Υπέρμετρη συγκέντρωση του στην τροφή των ιχθυδίων μπορεί να έχει και τοξικές επιπτώσεις (Penglase et al., 2013).

Στη μελέτη των Penglase et al., (2013) όπου μελετήθηκε η τοξικότητα του ιωδίου, εμπλουτισμένου σε Τροχόζωα, παρεχόμενα σε ιχθύδια μπακαλιάρου του Ατλαντικού (*Gadus morhua*), προέκυψε ότι συγκέντρωση ιωδίου στα Τροχόζωα του επιπέδου των 129 mg I kg^{-1} ξηρού βάρους μπορεί να προκαλέσει αλλαγές στην συγκέντρωση απαραίτητων μετάλλων διεγείροντας αλλαγές στη μορφολογία των θυρεοειδών θυλακίων των ιχθυδίων με τη μορφή κολλοειδούς βρογχοκήλης.

Η έλλειψη σε ιώδιο μπορεί να προκαλέσει βλάβες στο θυρεοειδή (υπερπλασία θυρεοειδούς) των νεαρών ιχθυδίων της γλώσσας της Σενεγάλης (*Solea senegalensis*) (Ribeiro et al., 2012).

Το ιώδιο είναι απαραίτητο συστατικό για τη βιοσύνθεση των θυρεοειδών ορμονών θυροξίνη και τριιωδοθυρονίνη (NRC, 1993). Τα ψάρια ανακτούν ιώδιο τόσο από το νερό μέσω των βραγχίων όσο και από την τροφή (NRC, 1993). Το θαλασσίνο νερό περιέχει περισσότερο ιώδιο από το γλυκό νερό και κατά συνέπεια η έλλειψη σε ιώδιο είναι πιο συνήθης σε ψάρια του γλυκού νερού (Watanabe et al., 1997). Η ανάκτηση υδατογενούς ιωδίου από ιχθύδια του είδους *Hippoglossus*

hippoglossus είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του ιωδίου στην υδάτινη στήλη (Moren et al., 2008).

Πίνακας 1.3: Βασικά επίπεδα βιταμινών και μεταλλικών ιχνοστοιχείων σε μη εμπλουτισμένα Τροχόζωα (Rotifers), ναύπλιους *Artemia* (τύπος EG, Great Salt Lake UT, USA, INVE Aquaculture), εμπλουτισμένων ατόμων *Artemia* επόμενων αναπτυξιακών σταδίων και Κωπήποδων που συλλέχθηκαν από μια θαλάσσια υδατοσυλλογή στη δυτική Νορβηγία (Svartatjonn). Τα εύρη των απαιτήσεων των νεαρών και ενήλικων ατόμων ιχθύων δίνονται από το NRC (National Research Council, 2011) και Παπουτσόγλου, (2008) για σύγκριση. Τα στοιχεία του Πίνακα 1.3 προέρχονται από Hamre et.al., (2013).

Βιταμίνες (mg Kg⁻¹ Ξ.Β)	Τροχόζωα ^a	Ναύπλιοι <i>Artemia</i> ^b	Εμπλουτισμένα άτομα <i>Artemia</i> ^c επόμενων αναπτυξιακών σταδίων	Κωπήποδα ^d	NRC (2011)**	Παπουτσόγλου 2008
Βιταμίνη C	117-190	798	400-1000	500	50	
Ριβοφλαβίνη	22-44	37	26-60	14-27	4-7	
Θειαμίνη (B1)	2.0-57	4.2	3-12	13-23	1	
Φολικό οξύ	4.0-57	14	6-11	3-5	1	
Πυριδοξίνη (B6)	20-25	28	2-33	2-6	3-6	
Βιοτίνη	1.6-1.8	4.5	2-5	0.6-0.9	0.15-1	
Κοβαλαμίνη (B12)	23-43	0.00	2-5	1-2	0.02	
Νιασίνη	191-249	159	160-250	100-150	10-28	
Βιταμίνη E	85-294	70	64-500	110	50	
Καροτινοειδή	24	630-750	650-750	630-750		
Βιταμίνη A	0.00	0.00	0.00	0	0.75	
Μεταλλικά ιχνοστοιχεία (mg Kg⁻¹ Ξ.Β)						
Ιώδιο	3.2-7.9	0.5-4.6	2.2 ± 0.4	50-350	0.6-1.1	2.0-3.0*
Μαγνήσιο	3.9-5.1	4-30	μ.π.	8-25	2-12	
Χαλκός	2.7-3.1	7-40	μ.π.	12-38	3-5	
Ψευδάργυρος	62-64	120-310	μ.π.	340-570	15-37	
Σελήνιο	0.08-0.09	2.2	μ.π.	3-5	0.15-0.25	0.20-0.30*
Σίδηρος	84-114	63-130	μ.π.	85-371	30-150	

μ.π.: μη προσδιορισμένο

* Είδη ιχθύων θαλασσινού νερού.

** Είδη ιχθύων κυρίως γλυκού νερού.

^a: Τα Τροχόζωα εκτράφηκαν τόσο με μαγιά και ιχθυέλαιο μπακαλιάρου του Ατλαντικού, όσο και με μαγιά και AlgamacTM (Aquafauna Bio-marine inc., CA, USA). Επίσης με μαγιά και Chlorella (Chlorella industry Co. Ltd, Tokyo, Japan). Η διάρκεια της εκτροφής ήταν 4 ημέρες. Τα δεδομένα προέρχονται από Srivastava et.,al (2006), Van der Meeren et.,al (2008) και Hamre et.,al (2008).

^b: Τα άτομα *Artemia* είναι νεοεκκολαπτόμενα και μη εμπλουτισμένα.

^c: Τα άτομα *Artemia* είναι εμπλουτισμένα σε ιχθυέλαιο για 4 ημέρες μετά την εκκόλαψη. Τα δεδομένα προέρχονται από Hamre et al (2002,2007), Van der Meeren et.,al (2008) και Hamre και Harboe, μη δημοσιευμένα δεδομένα.

^d: Τα δεδομένα για τα Κωπήποδα προέρχονται από Hamre et al (2005, 2008) και Ronnestad et.,al (1995).

1.1.1.5. Εμπλουτισμός Τροχοζώων

Τα Τροχοζώα μπορούν να εμπλουτιστούν με μικροφύκη, γαλακτώματα ελαίων, ειδικά επεξεργασμένη τροφή μικρών σωματιδίων και εμπορικά προϊόντα, με σκοπό να επιτευχθεί μια κατάλληλη σύσταση σε απαραίτητα λιπαρά οξέα (FAO, 1996). Στην Εικόνα 2.3.3.6 (σελίδα 46) φαίνεται ο εμπλουτισμός Τροχοζώων όπως πραγματοποιήθηκε στις δεξαμενές του πειράματός μας. Η διάρκεια του εμπλουτισμού μπορεί να είναι 8-24 ώρες (Dhert, 2001). Επιπλέον τα Τροχοζώα μπορούν να εμπλουτιστούν με βιταμίνες, ιώδιο ή σελήνιο.

Για τον εμπλουτισμό των Τροχοζώων με σελήνιο και ιώδιο χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι. Ως πηγή σεληνίου μπορεί να χρησιμοποιηθούν είτε σεληνικό νάτριο (Penglase, et al., 2011) είτε μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο (Ribeiro, et al., 2011). Το σελήνιο στην οργανική του μορφή ως σελήνιο – μαγιά είναι περισσότερο βιοδιαθέσιμο από ότι στην ανόργανη μορφή του ως σεληνικό νάτριο (Penglase et al., 2011 ; Enciner et al., 2003). Η ανάκτηση του σεληνίου από τα Τροχοζώα με την μορφή του συμπλέγματος μαγιά - σελήνιο είναι σαράντα φορές μεγαλύτερη από αυτήν του σεληνικού νατρίου (Penglase et al., 2011). Η κύρια μορφή στην οποία απαντάται το σελήνιο στην οργανική του μορφή είναι το αμινοξύ σεληνομεθειονίνη (80%) (Schrauzer, 2006). Τα ανώτερα σπονδυλωτά όπως και οι άνθρωποι δεν μπορούν να τη βιοσυνθέσουν αλλά αφού από αυτό το αμινοξύ γίνεται πρόσληψη του σεληνίου τότε πληροί τα κριτήρια που το κατατάσσουν ως ένα απαραίτητο αμινοξύ (Schrauzer, 2006).

Ως πηγή ιωδίου μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ιωδιούχο νάτριο (NaI) (Ribeiro et al., 2011) είτε ιωδιούχο κάλιο (KI) ή ιωδικό κάλιο (KIO₃) ή Lipiodol Ultra Fluid (Moren et al., 2006, Hawkyard et al., 2011). Όλες οι μορφές των παραπάνω ιχνοστοιχείων είναι υδατοδιαλυτές εκτός από το Lipiodol Ultra Fluid (Moren et al., 2006) που ως

τροποποιημένο λιπαρό οξύ αναμένεται να συμπεριφέρεται όπως τα υπόλοιπα λιπαρά οξέα .

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μαγιά εμπλουτισμένη με σεληνιο ως πηγή σεληνίου και ιωδιούχο νάτριο ως πηγή ιωδίου.

1.1.2. Θυρεοειδής «αδένας» και θυρεοειδικές ορμόνες στους ιχθύς

Ο θυρεοειδής ιστός στα ψάρια είναι οργανωμένος ως διάχυτα θυλάκια παρά ως αδένας όπως συμβαίνει στα περισσότερα σπονδυλωτά (Blanton et al., 2007). Τα θυρεοειδή θυλάκια βρίσκονται διασκορπισμένα σε συνδετικό ιστό στην περιοχή του φάρυγγα κοντά στη κοιλιακή αορτή ή μπορούν να μετακινηθούν από την υποφαρυγγική περιοχή και να αλληλεπιδράσουν με τους νεφρούς (Blanton et al., 2007). Η σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών λαμβάνει χώρα στα θυρεοειδή θυλάκια που συντίθενται από μια μονή στοιβάδα επιθηλιακών κυττάρων που περικλείουν έναν χώρο κολλοειδούς σύστασης και την θυροξίνη (L-T4) (Power et al., 2001). Η δημιουργία της θυροξίνης προκύπτει από την απορρόφηση ιωδίου από τα κύτταρα του θυλακίου μέσω του αίματος. Έπειτα εγκαθίσταται στην επιθηλιακή επιφάνεια όπου ενσωματώνεται στην ουσία θυρεογλοβουλίνη από την οποία προκύπτει η θυροξίνη (L – T4) (Carr et al., 2011). Η θυροξίνη έχει ελάχιστες άμεσες δράσεις και θεωρείται πρόδρομος ουσία της τριωδοθυρονίνης (T3), τη βιολογικά ενεργή μορφή της ορμόνης (Power et al., 2001).

Η μετατροπή της T4 σε T3 λαμβάνει χώρα σε περιφερειακούς ιστούς όπως στο συκώτι (Blanton et al., 2007). Οι αποϊδωνάσες τύπου I, II, III είναι σεληνοπρωτεΐνες και έχουν ενζυμική δράση για τη μετατροπή της θυροξίνης σε τριωδοθυρονίνη (Kohrle et al., 2005). Η παραγωγή T3 από T4 είναι περιορισμένη και δεν είναι ανάλογη της διαθεσιμότητας σε θυροξίνη (T4) (Blanton et al., 2007).

Οι θυρεοειδικές ορμόνες T3 και T4 συνδέονται με σημαντικές λειτουργίες των ιχθύων όπως ο μεταβολισμός, η ανάπτυξη, η οσμωρύθμιση και η αναπαραγωγή (Blanton et al., 2007). Είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη των ιχθυδίων και την ολοκλήρωση της μεταμόρφωσης τους (Power et al., 2001).

1.1.2.1. Θυρεοειδικές ορμόνες και ιχθύδια τσιπούρας (*Sparus aurata*)

Τα νεοεκκολαπτόμενα ιχθύδια τσιπούρας διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς TR α και TR β για τις θυρεοειδικές ορμόνες (THs). Διαθέτουν θυρεοειδικές ορμόνες μητρικής προέλευσης κατά την εκκόλαψη, μέσω των αυγών. Εξωγενής χορήγηση θυρεοειδικών ορμονών (με εμβάπτιση) έχει αποδείξει την αλληλεπίδρασή τους με τους προαναφερθέντες υποδοχείς. Λειτουργικά θυρεοειδή θυλάκια (στο επιθήλιο των οποίων γίνεται η σύνθεση της θυροξίνης (T4) η οποία μετέπειτα συμμετέχει στη σύνθεση της T3) σχηματίζονται από την τέταρτη ημέρα (πρώτη ημέρα χορήγησης εξωγενούς τροφής) μετά την εκκόλαψη και έπειτα (Power et al, 2001).

1.2. Αίτια πραγματοποίησης της μελέτης

Σε αυτή τη μελέτη έγιναν εμπλουτισμοί ιωδίου και σεληνίου σε κοινό εμπλουτιστικό προϊόν (Origreen, Scretting) στα Τροχόζωα, προς χορήγηση σε ιχθύδια τσιπούρας (*Sparus aurata*), για να απαντήσουμε στα εξής:

1. Τα επίπεδα του ιωδίου και του σεληνίου των Κωπηπόδων είναι αρκετές φορές υψηλότερα από αυτά των Τροχοζώων (Πίνακας 1.3) (Hamre et al., 2008). Για τούτο θέλαμε να ερευνήσουμε με τον εμπλουτισμό μας στο

σιτηρέσιο τα επίπεδα Se/I των Κωπηπόδων και τα αποτελέσματα του στην ανάπτυξη των ιχθυδίων τσιπούρας.

2. Τα συγκεκριμένα θρεπτικά ιχνοστοιχεία είναι υδατοδιαλυτά.

3. Η έλλειψη σε ιώδιο μπορεί να προκαλέσει βλάβες στον θυρεοειδή (υπερπλασία θυρεοειδούς) των νεαρών ιχθυδίων της γλώσσας της Σενεγάλης (*Solea senegalensis*) (Ribeiro et al., 2012). Η έλλειψη σε σελήνιο μπορεί να προκαλέσει βλάβη στο νευρικό σύστημα και στο συκώτι ενήλικων ατόμων ιριδιζουσας πέστροφας (Bell et al., 1986). ή ληθαργικές τάσεις και μείωση της όρεξης σε ιχθύδια σολομού (Poston et al., 1979). Για τούτο ερευνήσαμε το αποτέλεσμα του εμπλουτισμού στο σιτηρέσιο των παραπάνω ιχνοστοιχείων.

4. Σύμφωνα με πρόσφατα δημοσιευμένες μελέτες (Kamisaka et al., 2010, Hamre et al., 2008, Penglase et al., 2010) και με σκοπό την επιτυχή εκτροφή των ιχθυδίων μπακαλιάρου του Ατλαντικού (*Gadus morhua* L.), εμπόδιο της οποίας αποτελεί η ασθένεια DGS (distended gut syndrome), η πρωτογενής αιτία του προβλήματος σχετίζεται με διατροφικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. Έπειτα και δευτερογενώς τα εξασθενημένα πλέον άτομα λόγω του stress γίνονται ευάλωτα σε βακτηριακές ή ιϊκές (δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί πλήρως) μολύνσεις. Στην εργασία των Kamisaka et al. (2010) αποκαλύφθηκε αυξημένη έκφραση ενός γονιδίου του οξειδωτικού stress την θυρεοδοξίνη (*txn*) στα άτομα με DGS καθώς επίσης και του ογκοκατασταλτικού γονιδίου (*p53*), αναστολέα της φλεγμονώδους απόκρισης. Το οξειδωτικό stress αποτελεί τον υποβόσκοντα μηχανισμό του DGS (Kamisaka et al., 2010). Το πρόβλημα λοιπόν αφορά στον μεταβολισμό των ιχθυδίων. Πιθανές αιτίες του οξειδωτικού stress μπορεί να είναι είτε η οξείδωση πολυακόρεστων

λιπαρών οξέων (PUFAs) είτε η έλλειψη του νερού εκτροφής ή της τροφής σε ιώδιο και σελήνιο, απαραίτητων ιχνοστοιχείων για τον σχηματισμό των θυρεοειδικών ορμονών T3 και T4 και επιπλέον για το σελήνιο, τον σχηματισμό του αντιοξειδωτικού ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) (Yen, 2001). Για τούτο με την αποφυγή του οξειδωτικού stress μέσω των ιχνοστοιχείων θέλαμε να ενισχύσουμε τον κύκλο των αντιοξειδωτικών του κυττάρου (π.χ. γλουταθειόνης κ.λ.π.)

5. Η ασθένεια DGS είναι συνήθης στα ιχθύδια τσιπούρας (*Sparus aurata*) (Colorni, 1989; Pavlidis & Mylonas, 2011).

6. Η αποτυχία της ολοκλήρωσης της μεταμόρφωσης σε διάφορους οστεϊχθύες σχετίζεται με τις θυρεοειδικές ορμόνες (Power et al, 2001). Ιδιαίτερως τονίζεται η μη ικανότητα για πλήρη μετάβαση από την ατελή στην τέλεια φάση, των πλατύψαρων (αποτυχία μετακίνησης του οφθαλμού, δυσμορφίες της γνάθου, και διάφορες χρωματικές παρεκκλίσεις) (Moren et al, 2006). Έτσι με την προσθήκη του συμπληρώματος ιωδίου υποβοηθούμε την σύνθεση της θυροξίνης, ως μια από τις απαραίτητες θυρεοειδικές ορμόνες για την ανάπτυξη, κάτι που αναμένουμε από τα ευρήματά μας με τον χειρισμό του εμπλουτισμού στο σιτηρέσιο.

7. Τα νεοεκκολαπτόμενα ιχθύδια τσιπούρας διαθέτουν τους κατάλληλους υποδοχείς TR α και TR β για τις θυρεοειδικές ορμόνες (THs). Διαθέτουν θυρεοειδικές ορμόνες μητρικής προέλευσης κατά την εκκόλαψη, μέσω των αυγών. Εξωγενής χορήγηση θυρεοειδικών ορμονών (με εμβάπτιση) έχει αποδείξει την αλληλεπίδραση τους με τους προαναφερθέντες υποδοχείς. Λειτουργικά θυρεοειδή θυλάκια (στο επιθήλιο των οποίων

γίνεται η σύνθεση της θυροξίνης (T4) η οποία μετέπειτα διεγείρει την σύνθεση της T3) σχηματίζονται από την τέταρτη ημέρα (πρώτη ημέρα χορήγησης εξωγενούς τροφής) μετά την εκκόλαψη και έπειτα (Power et al, 2001). Το ιώδιο (I) και το σελήνιο (Se) είναι απαραίτητα για την παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών (T3, T4) και συνεπώς θεμελιώδη για την κανονική ανάπτυξη των ιχθύων (Yen, 2001, NRC, 1993). Κατά συνέπεια αναμένουμε θετική επίδραση στην ανάπτυξη των ιχθυδίων τσιπούρας.

Στην παρούσα μελέτη έγιναν εμπλουτισμοί με σελήνιο και ιώδιο σε κοινό εμπλουτιστικό προϊόν (Origreen, Scretting). Ως πηγή σεληνίου χρησιμοποιήθηκε μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο (Sel-Plex 2000, Altech) σε συγκέντρωση εντός του εύρους που απαντάται στα Κωπήποδα (Ribeiro et al., 2011). Ως πηγή ιωδίου χρησιμοποιήθηκε ιωδιούχο νάτριο (NaI) σε συγκέντρωση εντός του εύρους που απαντάται στα Κωπήποδα (Ribeiro et al., 2011). Μελετήθηκε η σωματική ανάπτυξη των ιχθυδίων τσιπούρας έως και 14 ημέρες μετά την εκκόλαψη, διότι είναι η ημέρα μετάβασης από την αποκλειστική παροχή Τροχοζώων ως σιτηρέσιο στην παροχή και ναύπλιων *Artemia*. Επίσης σύμφωνα με FAO (1999), την ημέρα 15 μετά την εκκόλαψη και με ολικό μήκος περίπου στα 5mm τα τχθύδια τσιπούρας ολοκληρώνουν την διαδικασία πλήρωσης της νυκτικής κύστης με αέρα, το ουραίο πτερύγιο αρχίζει να αναπτύσσεται και το 100% του ελαιοσταγονιδίου απορροφάται. Ως δείκτες ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν διάφορα βιομετρικά χαρακτηριστικά (σταθερό μήκος, ύψος κεφαλής, ύψος σώματος κτλ). Επίσης χρησιμοποιήθηκε ο λόγος RNA/DNA και η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (G_{pr}).

1.3. Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τον εμπλουτισμό της τροφής με σελήνιο και ιώδιο.

Το ιώδιο (I) και το σελήνιο (Se) είναι απαραίτητα για την παραγωγή των θυρεοειδικών ορμονών (T3, T4) και συνεπώς θεμελιώδη για την κανονική ανάπτυξη των ιχθύων (Yen, 2001, NRC, 1993). Ειδικότερα για το σελήνιο πρέπει να επισημανθεί ότι είναι κύριο δομικό συστατικό του αντιοξειδωτικού ενζύμου υπεροξειδάση της γλουταθειόνης (GPx) (Yen, 2001, NRC, 1993). Το σελήνιο συμμετέχει στη μετατροπή της θυρεοειδικής ορμόνης T4 (θυροξίνη) σε T3 (τριωδοθυρονίνη) (Kohrle et al., 2005). Εάν ένα από αυτά τα στοιχεία λείπει από τα υδατικά συστήματα τότε θα πρέπει να προστεθεί στο σιτηρέσιο των ιχθύων (Ribeiro, et al., 2011). Τα περισσότερα είδη ατελών ιχθυδίων βασίζονται σε πλαγκτονικούς οργανισμούς ως πηγή ενέργειας κατά την πρώτη χορήγηση εξωγενούς τροφής μετά την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου. Τα Τροχόζωα είναι από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα είδη τέτοιων οργανισμών. Σύμφωνα με διάφορες πρόσφατες έρευνες (Meeren et al., 2008, Hamre et al., 2008) τα Τροχόζωα περιέχουν πολύ χαμηλότερα επίπεδα ιωδίου (I) και σεληνίου (Se) (Πίνακας 1.3) από τα Κωπήποδα, την φυσική τροφή των θαλασσιών ειδών.

Κάποιες πρόσφατες έρευνες (Moren et al., 2006, Ribeiro et al., 2011; Hamre et al., 2008; Penglase et al., 2011, Ribeiro et al., 2012; Hawkyard et al., 2011; Penglase et al., 2010; Nordgreen et al, 2013) έχουν επιχειρήσει να αυξήσουν το επίπεδο των προαναφερθέντων ιχνοστοιχείων στο επίπεδο των Κωπήπόδων, με σκοπό να μελετηθούν η ανάπτυξη και η επιβίωση των ιχθυδίων. Οι Moren et al. (2006) δοκίμασαν τρεις διαφορετικές πηγές ιωδίου {(KI, KIO₃, Lipiodol Ultra Fluid (έλαιο προερχόμενο από σπόρους παπαρούνας εμπλουτισμένο με ιώδιο (poppy seed oil))} το οποίο αναμείχθηκε με κοινό εμπλουτιστικό

προϊόν ώστε να εμπλουτιστούν τα άτομα του γένους *Artemia* και να δοθούν σε ιχθύδια του πλατύψαρου *Hippoglossus hippoglossus L* (αντιμετωπίζει το πρόβλημα της ολοκλήρωσης της μεταμόρφωσης). Οι συγκεντρώσεις του ιωδίου που επιτεύχθηκαν ήταν εντός του εύρους που απαντάται στα Κωπήποδα (Moren et al., 2006; Hamre et al., 2008) . Σκοπός του εμπλουτισμού με ιώδιο ήταν η σύγκριση των τριών διαφορετικών πηγών ιωδίου ως προς την δυνατότητα τους να εμπλουτίζουν τα άτομα της *Artemia* και να κατακρατούνται από τα ιχθύδια που θα καταναλώσουν τα άτομα *Artemia*. Οι Ribeiro et al. (2012) έκαναν δοκιμές εμπλουτισμού κοινού εμπλουτιστικό προϊόντος με σελήνιο και ιώδιο σε μεταναύπλιους *Artemia* οι οποίοι χορηγήθηκαν σε ιχθύδια του είδους *Solea senegalensis*. Ως πηγή ιωδίου χρησιμοποιήθηκε το ιωδιούχο νάτριο (NaI) ενώ ως πηγή σεληνίου μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο (Encinar et al., 2003). Σκοπός ήταν η ενίσχυση της παραγωγής των θυρεοειδικών ορμονών και η αντιμετώπιση της θυρεοειδικής υπερπλασίας που αντιμετωπίζουν τα ιχθύδια κατά το στάδιο της μεταμόρφωσης (Ribeiro et al., 2012). Οι Hawkyard et al. (2011) δοκιμάζοντας την τεχνολογία ψεκάσμου (wax spray beads WSB) και χρησιμοποιώντας ιωδιούχο κάλιο ως πηγή ιωδίου θέλησαν να αυξήσουν τη συγκέντρωση του ιωδίου σε άτομα *Artemia* προς χορήγηση σε ιχθύδια του είδους *Danio rerio*. Οι Ribeiro et al. (2011) ανέπτυξαν ένα πρωτόκολλο εμπλουτισμού των Τροχοζώων με ιώδιο και σελήνιο. Χρησιμοποίησαν ιωδιούχο νάτριο ως πηγή ιωδίου και μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο (Sel-Plex 2000, περιέχει 2000mg Se/Kg προϊόντος) ως πηγή σεληνίου. Οι εμπλουτισμοί έγιναν σε κοινό εμπλουτιστικό προϊόν (Origreen, Scretting) και κατάφεραν να ανεβάσουν τα επίπεδα και των δυο ιχνοστοιχείων εντός του εύρους των Κωπηπόδων (Moren et al., 2006; Hamre et al., 2008). Η παρούσα μελέτη χρησιμοποίησε ένα παρόμοιο πρωτόκολλο. Οι Nordgreen et al. (2013)

εμπλούτισαν το σιτηρέσιο των Τροχοζών με διάφορα μεταλλικά ιχνοστοιχεία όπως Se, Zn, Cu, Mn για να ανεβάσουν τις συγκεντρώσεις στα επίπεδα των Κωπηπόδων. Ο εμπλουτισμός με σελήνιο έγινε στο ίδιο εμπλουτιστικό προϊόν (Origreen, Scretting) που χρησιμοποιήθηκε σε αυτήν τη μελέτη κάτω από τις ίδιες συνθήκες εμπλουτισμού (25 βαθμούς κελσίου για 3 ώρες). Επίσης ως πηγή σεληνίου χρησιμοποίησαν μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο όπως και στην παρούσα μελέτη. Οι Penglase et al. (2010) αυξάνοντας την συγκέντρωση του σεληνίου στον εμπλουτισμό των Τροχοζών πέτυχαν να αυξήσουν τη δραστηριότητα του αντιοξειδωτικού ενζύμου, υπεροξειδάση της γλουταθειόνης, σε ιχθύδια μπακαλιάρου του Ατλαντικού (*Gadus morhua L.*). Οι Hamre et al. (2008) αύξησαν την επιβίωση σε ιχθύδια μπακαλιάρου του Ατλαντικού τα οποία κατανάλωσαν Τροχοζωα εμπλουτισμένα με σελήνιο και ιώδιο.

1.4. Στόχος μελέτης

Στόχος της μελέτης μας ήταν, η διερεύνηση της σωματικής ανάπτυξης και της διατροφικής κατάστασης ιχθυδίων τσιπούρας που διατράφηκαν με Τροχοζωα εμπλουτισμένα, έως και 14 ημέρες μετά την εκκόλαψη (14 dph). Ο εμπλουτισμός του σιτηρεσίου έγινε, σε κοινό εμπλουτιστικό προϊόν (Origreen, Scretting) με σελήνιο {Sel – Plex 2000 , Altech (μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο)} και ιώδιο (ιωδιούχο νάτριο) στο ίδιο κοινό εμπλουτιστικό προϊόν (Origreen, Scretting). Για να παρακολουθήσουμε επίσης την διατροφική κατάσταση των ιχθυδίων ακολουθήσαμε το διεθνώς χρησιμοποιούμενο δείκτη νουκλεϊκών οξέων, RNA:DNA, με δικό μας τροποποιημένο πρωτόκολλο βασιζόμενο στην απορρόφηση και όχι φθορισμομετρικά.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικός σχεδιασμός

Το πείραμα έλαβε χώρα από τις 23/3 έως τις 10/4 του έτους 2013 σε εμπορικό ιχθυογεννητικό σταθμό. Το πείραμα διεξήχθη σε ανοιχτό σύστημα υφάλμυρου νερού ($S= 27$ ppt). Για τον σκοπό του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 6 δεξαμενές των 2.8 m^3 . Σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό δημιουργήθηκαν 2 διαφορετικές επεμβάσεις (με 3 επαναλήψεις), α) για τα ιχθύδια τσιπούρας που διατρέφθηκαν με Τροχόζωα εμπλουτισμένα με κοινό εμπλουτιστικό προϊόν (Origreen, Scretting) στο οποίο προστέθηκαν μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο (Sel-Plex 2000, Altech, οργανικό συμπλήρωμα σεληνίου 2000mg/Kg Ξ.Β) ως πηγή σεληνίου και ιωδιούχο νάτριο ως πηγή ιωδίου, και β) για την επέμβαση του μάρτυρα (περιελάμβανε ιχθύδια τσιπούρας που διατρέφθηκαν μόνο με Τροχόζωα εμπλουτισμένα με κοινό εμπλουτιστικό προϊόν (Origreen, Scretting)).

2.2 Προπειραματική περίοδος

Κατά την προπειραματική περίοδο, διάρκειας μιας εβδομάδας (3 ημέρες η επώαση των αυγών, 4 ημέρες μέχρι τη παροχή εξωγενούς τροφής σύμφωνα με τον πειραματικό σχεδιασμό) ελήφθησαν τα αυγά και τοποθετήθηκαν σε 6 δεξαμενές {με την κωδικοποιημένη ονομασία K1, K2, K3 (οι δεξαμενές της επέμβασης) και K4, K5, K6 (οι δεξαμενές του μάρτυρα)}.

Ο τρόπος λήψης των αυγών και της τοποθέτησης τους στις πειραματικές δεξαμενές ήταν ο εξής: Τα αυγά συλλέχτηκαν από μία δεξαμενή

γεννητόρων (με την κωδικοποιημένη ονομασία P14) μέσα από τον ειδικό συλλεκτήρα αυγών (πρόκειται για μια κυλινδρική κατασκευή από πλαστικό διαμέτρου 40 cm και ενισχυμένου περί αυτού με ένα πλαγκτονικό δίχτυ διαμέτρου οπών 300 μm). Για τη συλλογή τους χρησιμοποιήθηκαν απόχες συλλογής αυγών, μια ζυγαριά ακριβείας 10 g, 6 κουβάδες των 10 λίτρων, 1 κουβάς των 20 λίτρων και μαγειρικό αλάτι για την αύξηση της αλατότητας στο επίπεδο των 37 ppt και τη λήψη μόνο των γονιμοποιημένων αυγών (με δυνατότητα επίπλευσης) και όχι των αγονιμοποίητων ή νεκρών αυγών.

Όλα τα αυγά συλλέχθηκαν σε ένα κουβά των 20 λίτρων αφού πρώτα είχε αυξηθεί η αλατότητα του νερού του σε 37 ppt. Τα αυγά αφήθηκαν σε ηρεμία για περίπου ένα λεπτό και έπειτα, αφού πια τα νεκρά και τα μη γονιμοποιημένα αυγά είχαν καθιζάνει, με 5 επαναλαμβανόμενες κλίσεις του κουβά, τα επιπλέοντα γονιμοποιημένα αυγά συλλέγονταν με την απόχη και ζυγίζονταν (Πίνακας 2.2.1). Τέλος τοποθετούνταν στις 6 πειραματικές δεξαμενές επώασης αλλά και εκτροφής στη συνέχεια.

Πίνακας 2.2.1. Σύνολο γονιμοποιημένων αυγών που τοποθετήθηκαν, σύνολο αυγών που δεν εκκολάφθηκαν (μετά τον χειρισμό του σιφωνιού την ημέρα 1 μετά την εκκόλαψη) και σύνολο εναπομεινάντων αυγών.

Δεξαμενές	Σύνολο γονιμοποιημένων αυγών (g)	Σύνολο αυγών που δεν εκκολάφθηκαν (g)	Σύνολο εναπομεινάντων αυγών (g)
K1	550	50	500
K2	560	45	515
K3	540	40	500
K4	550	45	505
K5	560		
K6	560	40	520

Κατά την προπειραματική περίοδο τα αυγά τοποθετήθηκαν σε 6 κυλινδροκωνικές δεξαμενές των 2.8 m³ διαστάσεων έκαστη (διάμετρος

1.87m, ύψος κυλίνδρου ίσο με 1.07m, ύψος κώνου ίσο με 0.38m). Σύμφωνα με FAO (1999) για την εντατική εκτροφή ιχθυδίων, η μέγιστη πυκνότητα αυγών σε μια δεξαμενή, τόσο επώασης όσο και εκτροφής μετέπειτα, είναι 200 αυγά/λίτρο. Σύμφωνα με FAO (1999) 1 gr αυγών τσιπούρας περιέχει περίπου 1000 αυγά. Στο κέντρο των δεξαμενών υπήρχε τοποθετημένη μια πηγή αερισμού περίπου 10 cm πάνω από το κέντρο του πυθμένα του κώνου για την ανάδευση των αυγών. Όλες οι παράμετροι που μετρούνταν κατά την προπαραστατική περίοδο παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.2.2 και Πίνακα 2.2.3. Το δεσμευμένο οξυγόνο μετρούνταν με οξυγονόμετρο τύπου Oxyguard (Handy Gamma) και η τιμή του pH με όργανο του ίδιου τύπου. Η ένταση της φωτεινότητας με σχετικό όργανο τύπου Milwaukee Rocky Mount-NC USA.

Την επόμενη ημέρα τοποθέτησης των αυγών διαπιστώθηκε βλάβη στη δεξαμενή K5 και επακόλουθη απόρριψη της. Την ημέρα 1 μετά την εκκόλαση πραγματοποιήθηκε σιφόνισμα των 5 πειραματικών δεξαμενών για τη συλλογή από τον πυθμένα των νεκρών και αγωνιμοποίητων αυγών. Την ημέρα 1 μετά την εκκόλαση πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε όλη την στήλη του νερού από 3 διαφορετικά σημεία για κάθε μια από τις 5 δεξαμενές με έναν αυτοσχέδιο κυλινδρικό δειγματολήπτη μήκους 1.5 m και διαμέτρου εισόδου νερού 3.2 cm, έτσι ώστε να υπολογιστεί η αρχική ιχθυοπυκνότητα (Πίνακας 2.2.4). Τα ιχθύδια μετρήθηκαν σε στερεοσκόπιο τύπου Zeiss, Stemi DV4. Την ημέρα 3 μετά την εκκόλαση πραγματοποιήθηκε δειγματοληψία σε όλη την υδάτινη στήλη από 3 διαφορετικά σημεία για κάθε μια από τις 5 δεξαμενές με έναν αυτοσχέδιο κυλινδρικό δειγματολήπτη μήκους 1.5 m και διαμέτρου εισόδου νερού 3.2 cm (Εικόνα 2.3.3.5), έτσι ώστε να μετρηθούν τα ακόλουθα βιομετρικά χαρακτηριστικά πριν την έναρξη της πειραματικής περιόδου (Εικόνα 2.3.3.1):

- Σταθερό μήκος (SL ή NL για το συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο)
- Ύψος σώματος (H ή BD)
- Ύψος κεφαλής (Hhead ή HD)
- Μήκος οφθαλμού (L-Ey)
- Ύψος οφθαλμού (H-Ey)
- Διάμετρος ελαιοσταγονιδίου (LD)

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ειδικά φιαλίδια και συντηρήθηκαν σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 5% (6,8 pH, 0.013 M) (Κλημογιάννη, 2004).

Πίνακας 2.2.2. Μετρούμενες παράμετροι προπειραματικής περιόδου κατά τη διάρκεια της επώασης.

Δεξαμενές	DPH	Φωτεινότητα (LUX)	Φωτοπερίοδος	% ανανέωση/h	Οξυγόνο (ppm)	pH	T (° C)
K1	-2-0	0	24ώρες σκότος	10	7.8-8±0.01	7.7±0.01	18.5
K2	-2-0	0	24ώρες σκότος	10	7.8-8±0.01	7.7±0.01	18.5
K3	-2-0	0	24ώρες σκότος	10	7.8-8±0.01	7.7±0.01	18.5
K4	-2-0	0	24ώρες σκότος	10	7.8-8±0.01	7.7±0.01	18.5
K6	-2-0	0	24ώρες σκότος	10	7.8-8±0.01	7.7±0.01	18.5

DPH : Ημέρες μετά την εκκόλαψη

Πίνακας 2.2.3. Μετρούμενες παράμετροι προπειραματικής περιόδου από την ημέρα 1 μετά την εκκόλαψη έως και την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη

Δεξαμενές	DPH	Φωτεινότητα (LUX)	Φωτοπερίοδος	% ανανέωση/h	Οξυγόνο (ppm)	pH	T (° C)
K1	1-3	0	24ώρες σκότος	10	7.2-7.8±0.01	7.7±0.01	18.5
K2	1-3	0	24ώρες σκότος	10	7.2-7.8±0.01	7.7±0.01	18.5
K3	1-3	0	24ώρες σκότος	10	7.2-7.8±0.01	7.7±0.01	18.5
K4	1-3	0	24ώρες σκότος	10	7.2-7.8±0.01	7.7±0.01	18.5
K6	1-3	0	24ώρες σκότος	10	7.2-7.8±0.01	7.7±0.01	18.5

DPH : Ημέρες μετά την εκκόλαψη

Πίνακας 2.2.4: Αρχική ιχθυοπυκνότητα (ιχθύδια / λίτρο) (**Μ.Ο. επεμβάσεων**) (Μέσος όρος \pm Τυπικό σφάλμα του Μ.Ο.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα (* $P < 0.05$)
1	164 \pm 3	172 \pm 2	*

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό (* $P < 0.05$)

2.3 Πειραματική περίοδος

Η πειραματική περίοδος διήρκησε 10 ημέρες και περιελάμβανε την ημέρα 4 μετά την εκκόλαψη (πρώτη ημέρα παροχής εξωγενούς τροφής) έως και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη (τελευταία ημέρα παροχής μόνο Τροχοζώων ως σιτηρέσιο).

2.3.1 Διατροφή των ιχθυδίων/χορήγηση τροφής

Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής εφαρμόστηκε το πρόγραμμα διατροφής όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.3.1.1 και βάση του πειραματικού σχεδιασμού.

Πίνακας 2.3.1.1: Είδος σιτηρεσίου και αριθμός γευμάτων κατά την πειραματική περίοδο.

Δεξαμενές	DPH	Είδος σιτηρεσίου	Αριθμός γευμάτων
K1	4-14	Τροχοζώα εμπλουτισμένα με (Origreen, Scretting) + Se + I	3*
K2	4-14	Τροχοζώα εμπλουτισμένα με (Origreen, Scretting) + Se + I	3*
K3	4-14	Τροχοζώα εμπλουτισμένα με (Origreen, Scretting) + Se + I	3*
K4	4-14	Τροχοζώα εμπλουτισμένα με (Origreen, Scretting)	3*
K6	4-14	Τροχοζώα εμπλουτισμένα με (Origreen, Scretting)	3*

DPH : Ημέρες μετά την εκκόλαψη *(2 γεύματα μόνο στην ημέρα 4 μετά την εκκόλαψη)

Τα ιχθύδια της επέμβασης διατρέφονταν με Τροχοζώα εμπλουτισμένα με ένα εμπορικό εμπλουτιστικό προϊόν (Origreen, Scretting) και με μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο (Sel-Plex 2000, Altech) (ως πηγή σεληνίου) καθώς και με ιωδιούχο νάτριο (ως πηγή ιωδίου). Το εμπορικό εμπλουτιστικό προϊόν αναδευόταν με αναδευτήρα σε 10 λίτρα νερό. Το Sel-Plex και το NaI αναδεύονταν με οικιακό αναδευτήρα σε 500 ml περίπου και έπειτα αναδεύονταν μαζί με το εμπλουτιστικό προϊόν για να σχηματίσουν ένα ομοιογενές ενιαίο σύνολο. Τα ιχθύδια διατρέφονταν 3 φορές την ημέρα (11:30, 17:30, 23:30) για όλη την πειραματική περίοδο εκτός από την ημέρα 4 μετά την εκκόλαψη όπου και διατράφηκαν 2 φορές (17:30, 23:30), διότι η φωτοπερίοδος (για πρώτη φορά ημέρα) δεν εφαρμόστηκε πριν τις 11:30 αλλά αργότερα. Ο εμπλουτισμός των Τροχοζώων διεξαγόταν 3 φορές την ημέρα, για 3 ώρες έκαστος στους 25 βαθμούς κελσίου. Η πυκνότητα των Τροχοζώων κατά τον εμπλουτισμό ήταν είτε 500 είτε 1000 τροχοζώα/ml. Καθ' όλη τη διάρκεια του εμπλουτισμού το οξυγόνο παρέμενε στα επίπεδα του κορεσμού. Η ποσότητα που χρησιμοποιούνταν για το Origreen (Scretting) ήταν εκείνη που προβλέπεται από τον παρασκευαστή (0.25g/εκατομμύριο Τροχοζώων) ενώ η ποσότητα του ιωδιούχου νατρίου (NaI) ήταν 260mg/εκατομμύριο Τροχοζώων και της μαγιάς εμπλουτισμένης με σελήνιο (Sel-Plex 2000, Altech) 3mg/εκατομμύριο Τροχοζώων (Ribeiro, et al., 2011). Με την επιλογή των παραπάνω συγκεντρώσεων μαγιάς εμπλουτισμένης με σελήνιο και ιωδιούχου νατρίου αναμένεται συγκέντρωση περίπου 75 mg ιωδίου/Kg ξηρού βάρους Τροχοζώων και 3-5 mg σεληνίου/Kg ξηρού βάρους Τροχοζώων (Ribeiro et al., 2011). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε ακριβώς το ίδιο πρωτόκολλο εμπλουτισμού Τροχοζώων με σελήνιο και ιώδιο με εκείνο των Ribeiro et al. (2011). Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι εντός του εύρους που απαντάται στα Κωπήποδα (Πίνακας 1.3, Κεφάλαιο 1).

Τα ιχθύδια του μάρτυρα διατρέφονταν με Τροχοζώα εμπλουτισμένα με ένα εμπορικό εμπλουτιστικό προϊόν (Origreen, Scretting). Το εμπορικό εμπλουτιστικό προϊόν αναδευόταν με αναδευτήρα σε 10 λίτρα νερό, πριν τη χορήγηση τους στα Τροχοζώα. Τα ιχθύδια διατρέφονταν 3 φορές την ημέρα (11:30, 17:30, 23:30) για όλη την πειραματική περίοδο εκτός από την ημέρα 4 μετά την εκκόλαψη όπου και διατράφηκαν 2 φορές (17:30, 23:30), διότι η φωτοπερίοδος (για πρώτη φορά ημέρα) δεν εφαρμόστηκε πριν τις 11:30 αλλά αργότερα. Ο εμπλουτισμός των Τροχοζώων διεξάγονταν 3 φορές την ημέρα, για 3 ώρες έκαστος στους 25 βαθμούς κελσίου. Η ποσότητα που χρησιμοποιούνταν για το Origreen (Πίνακας 2.3.1.3) (Scretting) ήταν εκείνη που προβλέπεται από τον παρασκευαστή (0.25g/εκατομμύριο Τροχοζώων). Η περιεκτικότητα του Origreen σε σελήνιο καθώς και η περιεκτικότητα των Τροχοζώων σε σελήνιο έπειτα από 3 ώρες εμπλουτισμό στους 25 βαθμούς κελσίου φαίνεται στον Πίνακα 2.3.1.2. Σύμφωνα με δεδομένα των Penglase et.al (2012) το Origreen περιέχει < 0.04mg ιωδίου/Kg ξηρού βάρους. Η πυκνότητα των Τροχοζώων κατά τον εμπλουτισμό ήταν 500-1000/ml. Καθ' όλη τη διάρκεια του εμπλουτισμού η συγκέντρωση του οξυγόνου παρέμενε στα επίπεδα του κορεσμού.

Πίνακας 2.3.1.2: Συγκέντρωση σεληνίου (mg/Kg ξηρού βάρους) στις 2 τροφές (Origreen, Oriculture) και στα Τροχοζώα που κατανάλωσαν αυτά τα σιτηρέσια . Το Origreen (Scretting) είναι εμπλουτιστικό μέσο των Τροχοζώων αμέσως πριν τη χορήγηση τους σε ιχθύδια ενώ το Oriculture (Scretting) είναι τροφή εκτροφής Τροχοζώων. Τα στοιχεία του Πίνακα προέρχονται από Nordgreen et al. (2013).

	Se
Origreen	0.50±0.01
Oriculture	0.44±0.09
Εμπλουτισμένα Τροχοζώα ^a	0.54±0.05
Εκτρεφόμενα Τροχοζώα ^b	0.49±0.01

^a: Κατανάλωσαν Origreen για 3 ώρες στους 25 βαθμούς κελσίου

^b: Κατανάλωσαν Oriculture για > 10 ημέρες

Πίνακας 2.3.1.3: Σύσταση Origreen και Oriculture.

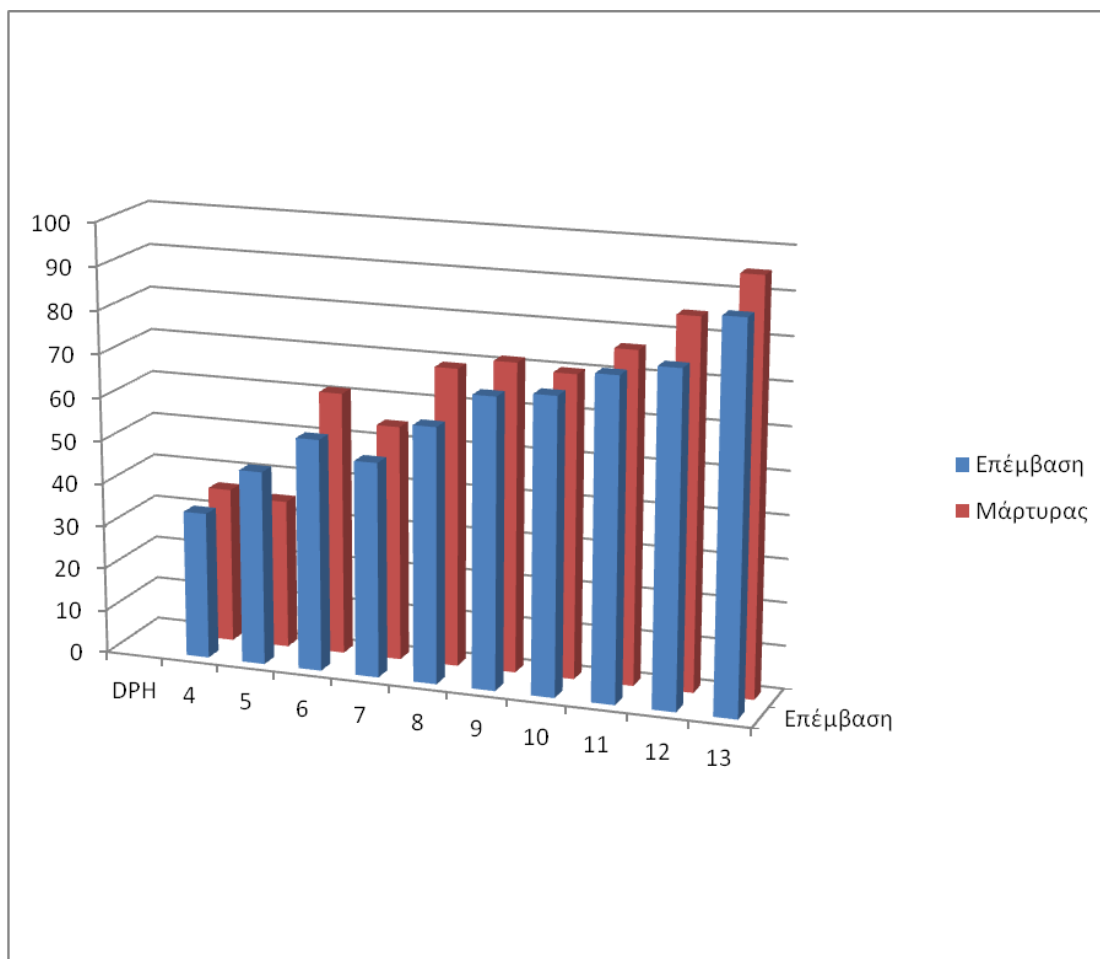
	Υγρασία %	Πρωτεΐνες %	Λίπη %	Ινώδεις ουσίες %	Υδατάν θρακες %	Ολικ ή τέφρ α%	Φώσφορος %	Βιταμίνη A	Βιταμίνη D3	Βιταμίνη E
Origreen	7	43	30	1.5	4	12	2.5	350*	50*	4000**
Oriculture	7	54	15	2.5	11	9	1.5	350*	50*	2750**

*: Οι μονάδες εκφράζονται σε IU/g

** : Οι μονάδες εκφράζονται σε mg/Kg

Η ημερήσια κατανάλωση των Τροχοζώων φαίνεται στην Εικόνα 2.3.1.1. Επισημαίνεται ότι πριν την έναρξη κάθε γεύματος γινόταν δειγματοληψία από όλη την στήλη του νερού από 3 διαφορετικά σημεία για κάθε μια από τις 5 δεξαμενές με έναν αυτοσχέδιο κυλινδρικό δειγματολήπτη μήκους 1.5 m και διαμέτρου εισόδου νερού 3.2 cm, έτσι ώστε να υπολογιστεί η υπολειπόμενη ποσότητα Τροχοζώων που δεν είχε καταναλωθεί και να προστεθεί η νέα, βάση του όγκου της δεξαμενής.

Έπειτα ο όγκος του νερού διηθούνταν σε φίλτρο των 50 μm και γινόταν η καταμέτρηση των Τροχοζώων σε στερεοσκόπιο τύπου Zeiss, Stemi DV4. Η νέα ποσότητα που εισαγόταν στις δεξαμενές, εξαρτιόταν από την υπολειπόμενη ποσότητα Τροχοζώων μέσα στις δεξαμενές που μπορεί είτε να διέφερε είτε όχι και από τον ίδιο, για όλες τις δεξαμενές, αριθμό Τροχοζώων που έπρεπε να υπάρχουν κατά την έναρξη κάθε γεύματος. **Νέα εισαγόμενη ποσότητα ανά γεύμα = X (επιθυμητή ποσότητα Τροχοζώων, ίδια για όλες τις δεξαμενές, αναγόμενη στο όγκο της δεξαμενής (ίδιος για όλες) και αυξανόμενη με την πάροδο των ημερών) – Ψ (υπολειπόμενη, αναγόμενη στο όγκο της δεξαμενής (ίδια για όλες) μη καταναλισκόμενη ποσότητα Τροχοζώων μόλις πριν την έναρξη κάθε γεύματος).**



Εικόνα 2.3.1.1: Μέση ημερήσια κατανάλωση Τροχοζώων σε εκατομμύρια κατά το πείραμα. DPH: Ημέρες μετά την εκκόλαψη

2.3.2 Περιγραφή του συστήματος εκτροφής και των εγκαταστάσεων του ιχθυογεννητικού σταθμού.

Το πείραμα έλαβε χώρα σε εμπορικό ιχθυογεννητικό σταθμό σε ανοιχτό σύστημα κυκλοφορίας νερού. Το νερό είχε αλατότητα 27 ppt και θερμοκρασία 18.5 βαθμούς κελσίου (αυτές οι παράμετροι παρέμεναν σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος). Το νερό προερχόταν από γεώτρηση, στη συνέχεια περνούσε από σύστημα απαερωτών για την απομάκρυνση του CO₂ και N₂, έπειτα εισαγόταν σε αυτό οξυγόνο και τέλος περνούσε από σύστημα UV. Στην τελική φάση, πριν τη διάθεση του για τις πειραματικές ανάγκες περνούσε για τελευταία φορά από σύστημα απαερωτών. Για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν 6 πολυεστερικές κυλινδροκωνικές δεξαμενές των 2.8 m³ (Εικόνα 2.3.3.7)

για την εκτροφή των ιχθυδίων και 3 πολυεστερικές δεξαμενές των 100 λίτρων διαστάσεων έκαστη: διάμετρος ίση με 40cm, ύψος κυλίνδρου ίσο με 80cm και ύψος κώνου ίσο με 25cm, για τον εμπλουτισμό των Τροχοζώων (Εικόνα 2.3.3.6). Τα Τροχοζώα παρέχονταν από μέρος της συνήθους παραγωγής του ιχθυογεννητικού σταθμού. Ακολουθούσαν έναν κύκλο εκτροφής 4 ημερών τύπου batch (κατά παρτίδες) και διατρέφονταν με ένα εμπορικό μέσο εκτροφής (Oriculture Scretting (Πίνακας 2.3.1.3),) βασισμένο σε μικροφύκη. Η περιεκτικότητα του Oriculture σε σελήνιο καθώς και η περιεκτικότητα των Τροχοζώων σε σελήνιο έπειτα από >10 ημέρες εκτροφή φαίνεται στον Πίνακα 2.3.1.2. Καθ' όλη την πειραματική περίοδο οι δεξαμενές εκτροφής (βλέπε Εικόνα 2.3.3.7, σελίδα 47) περιελάμβαναν 2 παγίδες ελαίων (για την απομάκρυνση των ελαίων από την επιφάνεια του νερού, για τη διευκόλυνση της πλήρωσης της νηκτικής κύστης με ατμοσφαιρικό αέρα), μια παροχή αέρα στο κέντρο των δεξαμενών μικρής εντάσεως για τη διευκόλυνση της ανανέωσης του νερού από τα κατώτερα στρώματα προς την επιφάνεια, την ανάδευση των Τροχοζώων και τη διευκόλυνση της κίνησης των ιχθυδίων κατά τα πρώτα στάδια που μελετήθηκαν, φίλτρα των 300 μm στην απορροή και μια παροχή νερού. Πάνω από τις δεξαμενές και στο κέντρο τους είχε τοποθετηθεί φωτιστικό με 2 κυλινδρικές λάμπες, των 36 W έκαστη, ψυχρού φθορισμού.

2.3.2.1 Χειρισμοί

Οι βασικοί χειρισμοί αυτού του πειράματος ήταν η διατροφή των ιχθυδίων που γινόταν 3 φορές την ημέρα (11:30, 17:30, 23:30), με εξαίρεση την ημέρα 4 μετά την εκκόλαψη όπου διατράφηκαν 2 φορές, και η συνεχής παρακολούθηση βασικών αβιοτικών παραμέτρων (Πίνακας 2.3.2.1.1) για την εξασφάλιση σταθερών συνθηκών. Επισημαίνεται η καθημερινή προσθήκη (1 ώρα πριν από κάθε γεύμα)

επεξεργασμένου πηλού σύστασης κυρίως 55,2 % SiO₂ και 27.9% Al₂O₃, για τη δημιουργία ευνοϊκότερου οπτικού περιβάλλοντος για τα ιχθύδια. Η επιλογή του πηλού έγινε διότι πρόκειται για ανόργανο υλικό, μηδενικής θρεπτικής αξίας για τα ιχθύδια και έτσι μειωνόταν η δυνατότητα επανεμπλουτισμού των Τροχοζώων μέσα στις δεξαμενές (Attramadal et al., 2012; Bristow, 1994). Επίσης καθημερινά καθαρίζονταν τα φίλτρα των απορροών αλλά δεν γινόταν σιφόνισμα του πυθμένα των δεξαμενών για αποφυγή καταστάσεων stress.

Πίνακας 2.3.2.1.1: Μετρούμενες παράμετροι πειραματικής περιόδου από την ημέρα 4 μετά την εκκόλαση έως και την ημέρα 13 μετά την εκκόλαση

Δεξαμενές	DPH	Φωτει νότητα (LUX)	Φωτοπερίοδος	% Ροή/ώρα	Οξυγόνο (ppm)	pH	Θερμοκρασ ία (βαθμοί κελσίου)	Πηλός (gr/l)
K1	4-14	1000	24 ώρες ημέρα	5%(6% από dph 10-14)	7.5- 8.5±0.01	7.6± 0.01	18.5	0,014
K2	4-14	1000	24 ώρες ημέρα	5%(6% από dph 10-14)	7.5- 8.5±0.01	7.6± 0.01	18.5	0,014
K3	4-14	1000	24 ώρες ημέρα	5%(6% από dph 10-14)	7.5- 8.5±0.01	7.6± 0.01	18.5	0,014
K4	4-14	1000	24 ώρες ημέρα	5%(6% από dph 10-14)	7.5- 8.5±0.01	7.6± 0.01	18.5	0,014
K6	4-14	1000	24 ώρες ημέρα	5%(6% από dph 10-14)	7.5- 8.5±0.01	7.6± 0.01	18.5	0,014

2.3.3 Τρόπος δειγματοληψίας και μέτρησης βιομετρικών χαρακτηριστικών.

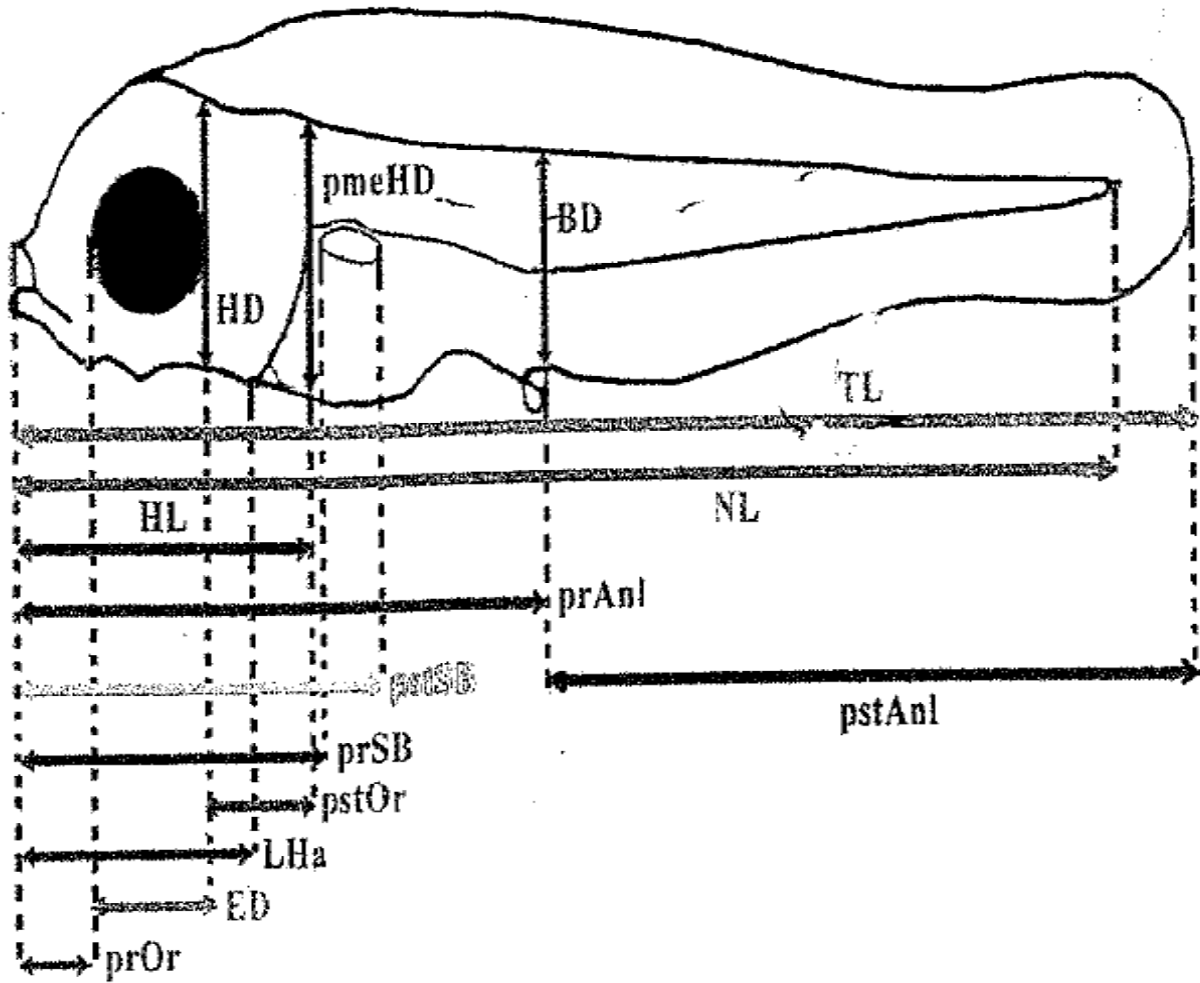
Έγιναν 2 δειγματοληψίες για τη μέτρηση βασικών βιομετρικών χαρακτηριστικών (Εικόνες 2.3.3.1, 2.3.3.2) (Σταθερό μήκος (SL ή NL για το αναπτυξιακό στάδιο της ημέρας 3 μετά την εκκόλαση), ύψος σώματος (H ή BD), ύψος κεφαλής (Hhead ή HD), μήκος οφθαλμού (L-Ey), ύψος οφθαλμού (H-Ey), διάμετρος ελαιοσταγονιδίου (LD))

την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη (το πρωί πριν τη χορήγηση τροφής και στη λήξη του πειράματος). Οι δειγματοληψίες γίνονταν με έναν αυτοσχέδιο κυλινδρικό δειγματολήπτη μήκους 1.5 m (βλέπε Εικόνα 2.3.3.5) και διαμέτρου εισόδου νερού 3.2 cm σε όλη την στήλη του νερού από 3 διαφορετικά σημεία για κάθε μια από τις 5 δεξαμενές. Έπειτα τα ιχθύδια φυλάσσονταν σε ειδικά φιαλίδια πληρωμένα με φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης 5% (6,8 pH, 0.013 M) (Κλημογιάννη, 2004). Τα δείγματα λαμβάνονταν το πρωί πριν τη χορήγηση του πρώτου γεύματος (**αφορά μόνο στη δειγματοληψία της ημέρας 14 μετά την εκκόλαψη αφού την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη τα ιχθύδια δεν διατρέφονταν**).

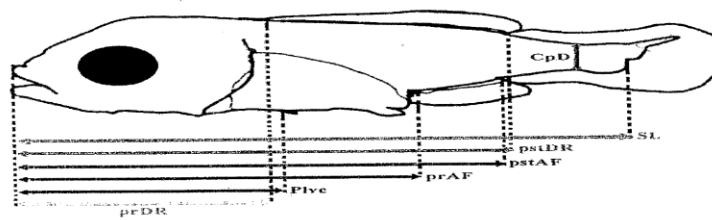
Τα συντηρημένα δείγματα φωτογραφήθηκαν και μετρήθηκαν με χρήση κάμερας τύπου digital color video camera Exwavehad, στερεοσκοπίου τύπου Zeiss, Stemi DV4 και του λογισμικού Image Pro Analysis στο Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας του Τμήματος Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη φωτογραφήθηκαν (Εικόνα 2.3.3.3) και μετρήθηκαν 91 ιχθύδια του μάρτυρα και 132 ιχθύδια της επέμβασης. Την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη φωτογραφήθηκαν (2.3.3.4) και μετρήθηκαν 140 ιχθύδια του μάρτυρα και 190 ιχθύδια της επέμβασης. Όλα τα μήκη μετρήθηκαν παράλληλα με το νοητό επιμήκη άξονα του σώματος, ενώ όλα τα ύψη μετρήθηκαν κάθετα στον ίδιο άξονα. Η ακρίβεια με την οποία πραγματοποιήθηκε η μέτρηση των βιομετρικών χαρακτηριστικών είναι της τάξης των 30 μ m για τα δείγματα 14 dph (10X) και 18 μ m για τα δείγματα 3 dph (16X). Η ακρίβεια της μέτρησης εκφράζει την ελάχιστη απόσταση διάκρισης δυο διαφορετικών σημείων από το πρόγραμμα. Η ακρίβεια του

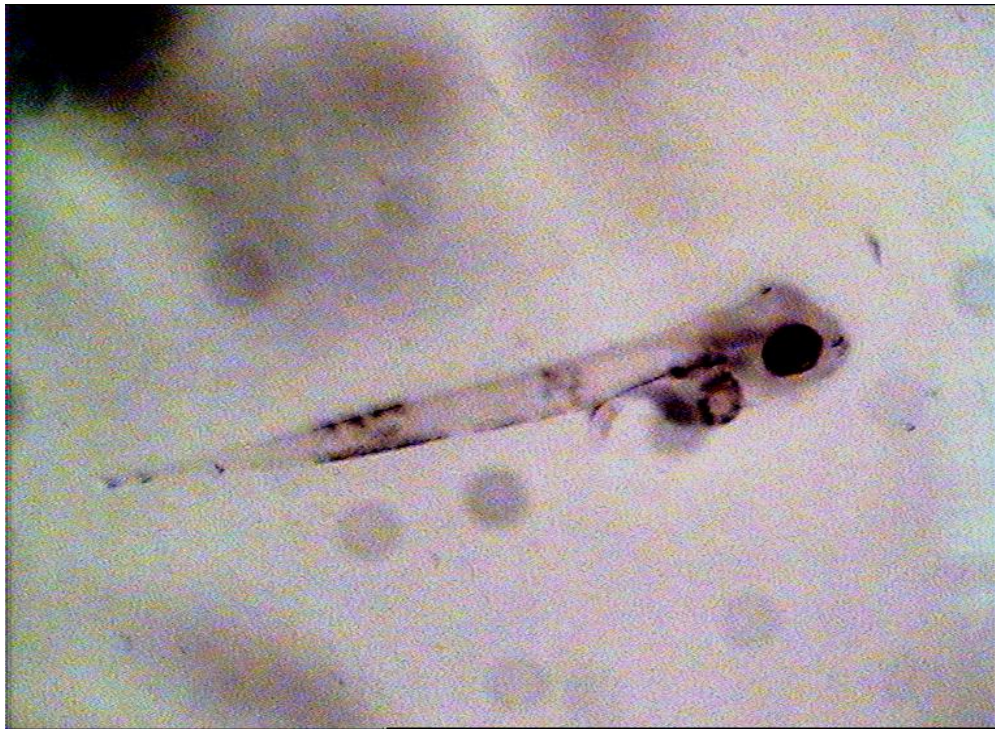
συστήματος ήταν 10 μm για τη μεγέθυνση 10X και 6 μm για τη μεγέθυνση 16X.



Εικόνα 2.3.3.1: Μορφομετρικοί χαρακτήρες που εξετάστηκαν κατά το στάδιο των ατελών ιχθυοειδών (ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη) **NL:** Μήκος νωτοχορδής (από το ρύγχος έως το τέλος της νωτοχορδής), **HD:** Ύψος κεφαλής (στο οπίσθιο όριο του οφθαλμού), **BD:** Ύψος σώματος (από το κατώτερο άκρο του εντέρου ως το ανώτερο σημείο του κορμού του σώματος). (σχέδιο από Κλημογιάννη, 2004).



Εικόνα 2.3.3.2: Μορφομετρικοί χαρακτήρες που εξετάστηκαν κατά το στάδιο των ατελών ιχθυδίων (ημέρα 14 μετά την εκκόλαση). **SL:** από το ρύγχος έως το οπίσθιο όριο των υποουραίων οστών. Οι υπόλοιποι μορφομετρικοί χαρακτήρες είναι οι ίδιοι όπως διατυπώνονται στην Εικόνα 2.3.3.1, εκτός του **NL** που στην ημέρα 14 μετά την εκκόλαση αντικαθίσταται από το **SL**. (σχέδιο από Κλημογιάννη, 2004).



16X

Εικόνα 2.3.3.3: Ιχθύδιο τσιπούρας 3 ημερών μετά την εκκόλαψη (Φωτογραφία συγγραφέα).



10X

Εικόνα 2.3.3.4: Ιχθύδιο τσιπούρας 14 ημερών μετά την εκκόλαψη (Φωτογραφία συγγραφέα).



Εικόνα 2.3.3.5: Δειγματολήπτης νερού (Φωτογραφία συγγραφέα)



Εικόνα 2.3.3.6: Εμπλουτισμός Τροχοζών (Φωτογραφία συγγραφέα)



Εικόνα 2.3.3.7: Πειραματικές δεξαμενές εκτροφής (Φωτογραφία συγγραφέα)

2.3.4 Τρόπος δειγματοληψίας και μέτρησης RNA, DNA. Υπολογισμός του ποσοστού (%) της ημερήσιας αύξησης της πρωτεΐνης (G_{pr}).

Έλαβαν χώρα 3 δειγματοληψίες για τον υπολογισμό του λόγου RNA/DNA, την ημέρα 9 μετά την εκκόλαψη, την ημέρα 11 μετά την εκκόλαψη και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη. Οι δειγματοληψίες γίνονταν με έναν αυτοσχέδιο κυλινδρικό δειγματολήπτη μήκους 1.5 m και διαμέτρου εισόδου νερού 3.2 cm σε όλη την στήλη του νερού από 3 διαφορετικά σημεία για κάθε μια από τις 5 δεξαμενές. Έπειτα τα δείγματα τοποθετούνταν σε ειδικά φιαλίδια και φυλάσσονταν στην κατάψυξη (-20 βαθμούς κελσίου).

2.3.4.1 Αρχές δείκτη RNA/DNA.

Η ποσότητα του DNA, φορέα της γενετικής πληροφορίας, παραμένει σχεδόν σταθερή στους σωματικούς ιστούς σε συνθήκες περιβαλλοντικών αλλαγών. Η ποσότητα του RNA μέσα στο κύτταρο είναι ευθέως ανάλογη του μέτρου της πρωτεϊνοσύνθεσης που συμβαίνει (Clemmensen, 1993). Στην συγκεκριμένη περίπτωση ο δείκτης **RNA/DNA** αποτελεί ένα μέτρο της πρωτεϊνοσυνθετικής ικανότητας του κυττάρου και σχετίζεται με την διατροφική κατάσταση του οργανισμού (Buckley et al. 1999). Η χρήση του δείκτη βασίζεται στην υπόθεση ότι το DNA, μεταφορέας της γενετικής πληροφορίας παραμένει αμετάβλητος, υπό σταθερές συνθήκες στα σωματικά κύτταρα των ειδών (Holm-Hansen, et al., 1968), ενώ το RNA που εμπλέκεται στην πρωτεϊνοσύνθεση μεταβάλλεται με την ηλικία, το μέγεθος του οργανισμού, την φυσιολογική κατάσταση και το περιβάλλον (Bulow, 1970). Συνεπώς υπάρχει άμεση (ευθεία) συσχέτιση του διατροφικού δείκτη RNA:DNA και του ρυθμού ανάπτυξης (Bulow, 1970, Buckley et al. 1999).

2.3.4.1.1 Απομόνωση ολικών νουκλεϊκών οξέων, προσδιορισμός του δείκτη RNA/DNA και της ημερήσιας % αύξησης της πρωτεΐνης (Gpi).

Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα:

α) Πρωτεϊνάση K, για να καταστρέψουμε όλες τις πρωτεΐνες του κυττάρου και

β) RNase A για να διασπάσουμε τα μονόκλινα νουκλεϊκά μόρια και το RNA.

Τα ένζυμα αυτά διατηρήθηκαν καθ όλη την διάρκεια του πειράματος στον πάγο και αποθηκεύτηκαν στους -20°C. Το πρωτόκολλο απομόνωσης φαίνεται παρακάτω:

1. Απομόνωση ολικών νουκλεϊκών οξέων (απαλλαγμένων από πρωτεΐνες)

- 1) Ζύγιση περίπου 50 mg ιχθυδίων σε eppendorf (1.5 ml).
- 2) Προσθήκη 400 μ l ρυθμιστικού διαλύματος (0.05 M Tris, 0.1 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0, 2% SDS).
- 3) Ανάδευση – Vortex - για 1.5 min περίπου.
- 4) Προσθήκη Πρωτεϊνάσης K (20 μ l), ανάδευση για 30 sec και επώαση σε θερμαινόμενη βάση eppendorf στους 55°C για 10-13 min. (Η επώαση μπορεί να εκτελεστεί και όλο το βράδυ για καλύτερη δράση του ενζύμου και διαλυτοποίηση των ιστών)
- 5) Ανακίνηση ενδιάμεσα κατά την παραπάνω επώαση ανά 2 περίπου min.
- 6) Προσθήκη 400 μ l εξισορροπημένης φαινόλης και ανάδευση.
- 7) Προσθήκη 400 μ l εξισορροπημένης φαινόλης/χλωροφορμίου/ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και ανάδευση – Vortex- για 1 min.
- 8) Φυγοκέντρωση σε φυγόκεντρο για μικροσωληνάριο eppendorf σε υψηλή ταχύτητα 13-14000 rpm για 18-20 min.
- 9) Συλλογή της υδάτινης φάσης (υπερκείμενο) σε νέο μικροσωληνάριο eppendorf.
- 10) Προσθήκη 1:10 μ l διαλύματος 3M οξικού νατρίου, pH=4,5 και 2.5 όγκους αιθανόλης ή αντίστοιχο όγκο ισο-προπανόλης.
- 11) Ανάδευση με αναστροφές 9-10 φορές.
- 12) Διατήρηση στους -80 °C για 12 ώρες τουλάχιστον ή -20 °C για 1+1/2 ημέρα.
- 13) Φυγοκέντρωση σε φυγόκεντρο για μικροσωληνάρια eppendorf σε υψηλή ταχύτητα 13-14000 rpm για περίπου 30 min

- 14) Απόρριψη του υπερκειμένου
- 15) Αερισμός για στέγνωμα του ιζήματος στον πυθμένα του σωληναρίου με τα νουκλεϊκά οξέα για 15-20 min
- 16) Διαλυτοποίηση του ιζήματος με 200 μl νερό ή TE buffer (10 mM Tris.HCl, 1mM EDTA (TE buffer), pH=8.0)
- 17) Κατάλληλη αραιώση για μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των νουκλεϊκών OD₂₆₀, OD₂₈₀, OD₂₃₀ και των λόγων OD₂₆₀ / OD₂₈₀ και OD₂₆₀ / OD₂₃₀, σε φωτόμετρο UV/ορατού (GeneQuant)
- 18) Ποσοτικοποίηση των ολικών νουκλεϊκών οξέων ανά δείγμα, από την παραπάνω φωτομέτρηση.

Τα στάδια 6-9 μπορούν να επαναληφθούν άλλη μια φορά για μεγαλύτερη καθαρότητα της υδάτινης φάσης και περιεκτικότητας σε νουκλεϊκά οξέα.

Στην συνέχεια ακολουθεί ο καθαρισμός των νουκλεϊκών οξέων από το RNA, και το υπόλοιπο (DNA) μετρήθηκε στο φασματοφωτόμετρο.

2. Απομόνωση DNA (απαλλαγμένου από RNA)

- 1) 100 μl διαλύματος νουκλεϊκών οξέων της κατάλληλης αραιώσης (συνήθως 1:10-1:50) μετρήθηκαν για κάθε δείγμα
- 2) Έγινε προσθήκη 10 μl RNase A σε νερό (400μg/ml) και τα δείγματα επώασθηκαν στους 37 °C για 30 min.
- 3) Διακοπή της επώασης, τοποθέτηση σε πάγο και τα δείγματα επανήλθαν στην θερμοκρασία δωματίου
- 4) Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των νουκλεϊκών OD₂₆₀, OD₂₈₀, OD₂₃₀ και των λόγων OD₂₆₀ / OD₂₈₀ και OD₂₆₀ / OD₂₃₀, σε φωτόμετρο UV/ορατού (GeneQuant)

5) Ποσοτικοποίηση του DNA ανά δείγμα, από την παραπάνω φωτομέτρηση

Για κάθε δείγμα από την παραπάνω απομόνωση (2) και από τον τύπο (Clemmensen, 1993) ισχύει:

Ολικά νουκλεϊκά οξέα – RNA = εναπομένων DNA =>

Ολικά νουκλεϊκά οξέα - εναπομένων DNA = RNA ,

Έτσι υπολογίσαμε την ποσότητα του RNA και από αυτήν, το λόγο **RNA/DNA**.

Επίσης, η προβλεπόμενη πρωτεΐνη κατά Buckley (1984), εκφράστηκε από τον τύπο, **$G_{pi} = 0.93 * T + 4.75 * RNA/DNA - 18.18$**

Όπου G_{pi} είναι η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης και T είναι η θερμοκρασία του νερού (σε βαθμούς κελσίου).

Στην συνέχεια ακολούθησε ηλεκτροφορητική ανάλυση των απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων, όπως περιγράφεται παρακάτω.

2.3.4.1.2. Ηλεκτροφορητική ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Εν συντομία παρασκευάζεται η πηκτή αγαρόζης η οποία τοποθετείται στο δοχείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής και στην συνέχεια τίθεται η ηλεκτροφορητική συσκευή σε λειτουργία (είτε είναι συσκευή του εμπορίου ή κατασκευασμένη από το εργαστήριο κατά περίπτωση). Ακολουθεί η προετοιμασία των δειγμάτων στα σωληνάκια erpendorf του 1.5 ml και οι αναμίξεις με νερό, η χρωστική (loading dye) στην κατάλληλη αραιώση, και τα δείγματα φορτώνονται στην πηκτή αγαρόζης με πιπέττα ακριβείας στα αυλάκια (slots) της πηκτής που έχει προηγουμένως παρασκευασθεί σε ειδική μήτρα (πηκτή) στην

συγκεκριμένη συγκέντρωση (1,5% αγαρόζη). Μαζί με τα δείγματα φορτώνεται δίπλα και δείκτης μοριακών βαρών (π.χ. Lambda DNA-HindIII digested DNA (NEB)) και η συσκευή τροφοδοτείται με τάση σταθερή ~100 Volts για 30 – 45 λεπτά της ώρας.

Στην συνέχεια φωτογραφίζονται οι ζώνες του DNA πάνω στη πηκτή με κάμερα Polaroid, από τον φθορισμό που δημιουργείται στο δίκλωνο μόριο του DNA με την παρεμβολή του βρωμιούχου αιθιδίου, με την βοήθεια UV ακτινοβολίας που προσπίπτει στην πηκτή αγαρόζης. Τέλος η εικόνα ψηφιοποιείται και αποθηκεύεται σε αποθηκευτικό μέσο στην μνήμη του υπολογιστή (Εικόνες 3.3.4, 3.3.5).

2.3.5 Στατιστική επεξεργασία αποτελεσμάτων.

Η στατιστική επεξεργασία έγινε με χρήση του λογισμικού Statgraphics Centurion, εφαρμόζοντας One Way Anova analysis, (εκτός από τις περιπτώσεις που αναφέρεται άλλη ανάλυση, (όπως το τεστ t-student, συγκρίσεων ζευγών των M.O.), χρησιμοποιώντας τη δεξαμενή ως πειραματική μονάδα. Όλες οι παράμετροι ελέγχθηκαν για την ισχύ της κανονικότητας και της ομοιογένειας της διασποράς, ενώ έγιναν οι απαραίτητες μετατροπές (πχ λογάριθμος, συνημίτονο, κτλ) οποτεδήποτε αυτές δεν ίσχυαν. Σε περιπτώσεις που δεν καλύπτονταν οι ανωτέρω προϋποθέσεις χρησιμοποιήθηκε η μη παραμετρική μέθοδος (Kruskal-Wallis).

Στους Πίνακες και στις Εικόνες παρουσιάζονται οι μέσοι όροι \pm τυπικό σφάλμα του M.O., χωρίς μετασχηματισμό, ενώ στις περιπτώσεις που εμφανίζεται στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($*P < 0.05$) μεταξύ τους, η διαφοροποίηση εμφανίζεται με αστερίσκο (*), ενώ με ποιά αυστηρό κριτήριο όπως σε επίπεδο σημαντικότητας 1% ($**P < 0.01$) με δύο αστερίσκους (**).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΒΙΟΜΕΤΡΙΑ

Στον Πίνακα 3.1.1 που αφορά στις μετρήσεις του σταθερού μήκους, ο μάρτυρας δεν διαφέρει από την επέμβαση στατιστικώς σημαντικά ($P>0.05$) την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη. Η διαφορά ανάμεσα στο μάρτυρα και την επέμβαση είναι στατιστικώς σημαντική ($*P<0.05$) την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

Πίνακας 3.1.1: Σταθερό μήκος (SL, mm) (Μ.Ο. επεμβάσεων) (Μέσος όρος \pm Τυπικό σφάλμα του Μ.Ο.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα ($*P<0.05$)
3	3.63 \pm 0.050	3.53 \pm 0.044	ΜΣ
14	4.60 \pm 0.080	4.90 \pm 0.013	*

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$)

Στον Πίνακα 3.1.2 φαίνεται ότι η διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης, ως προς το ύψος του σώματος, δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($P>0.05$) τόσο την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

Πίνακας 3.1.2: Ύψος σώματος (H, mm) (Μ.Ο. επεμβάσεων) (Μέσος όρος \pm Τυπικό σφάλμα του Μ.Ο.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα ($P>0.05$)
3	0.39 \pm 0.006	0.36 \pm 0.023	ΜΣ
14	0.84 \pm 0.008	0.86 \pm 0.006	ΜΣ

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$)

Στον Πίνακα 3.1.3 φαίνεται ότι η διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης, ως προς το ύψος της κεφαλής, δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($P>0.05$) τόσο την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

Πίνακας 3.1.3: Ύψος κεφαλής (**Hhead, mm**) (**M.O. επεμβάσεων**) (Μέσος όρος \pm Τυπικό σφάλμα του M.O.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα ($P>0.05$)
3	0.51 \pm 0.019	0.47 \pm 0.022	ΜΣ
14	0.90 \pm 0.031	0.96 \pm 0.008	ΜΣ

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, * : στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$)

Στον Πίνακα 3.1.4 φαίνεται ότι η διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης, ως προς το μήκος του οφθαλμού, δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($P>0.05$) τόσο την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

Πίνακας 3.1.4: Μήκος οφθαλμού (**L-Ey, mm**) (**M.O. επεμβάσεων**) (Μέσος όρος \pm Τυπικό σφάλμα του M.O.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα ($P>0.05$)
3	0.27 \pm 0.015	0.26 \pm 0.006	ΜΣ
14	0.44 \pm 0.009	0.46 \pm 0.007	ΜΣ

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, * : στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$)

Στον Πίνακα 3.1.5 φαίνεται ότι η διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης, ως προς το ύψος του οφθαλμού, δεν είναι στατιστικώς

σημαντική ($P>0.05$) τόσο την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

Πίνακας 3.1.5: Ύψος οφθαλμού (**H-Ey, mm**) (**M.O. επεμβάσεων**) (Μέσος όρος \pm Τυπικό σφάλμα του M.O.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα ($P>0.05$)
3	0.25 \pm 0.014	0.25 \pm 0.008	ΜΣ
14	0.41 \pm 0.010	0.43 \pm 0.007	ΜΣ

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$)

Στον Πίνακα 3.1.6 φαίνεται ότι η διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης, ως προς τον λόγο ύψους σώματος προς το σταθερό μήκος, δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($P>0.05$) τόσο την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

Πίνακας 3.1.6: Ύψος σώματος / Σταθερό μήκος (**H / SL, mm**) (**M.O. επεμβάσεων**) (Μέσος όρος \pm Τυπικό σφάλμα του M.O.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα ($P>0.05$)
3	0.108 \pm 0.0001	0.103 \pm 0.0053	ΜΣ
14	0.183 \pm 0.0020	0.176 \pm 0.0015	ΜΣ

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$)

Στον Πίνακα 3.1.7 φαίνεται ότι η διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης, ως προς τον λόγο ύψους κεφαλής προς το σταθερό μήκος, δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($P>0.05$) τόσο την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

Πίνακας 3.1.7: Ύψος κεφαλής / Σταθερό μήκος (**Hhead / SL, mm**) (**M.O. επεμβάσεων**) (Μέσος όρος ± Τυπικό σφάλμα του M.O.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα ($P>0.05$)
3	0.141± 0.0034	0.134± 0.0049	ΜΣ
14	0.197± 0.0014	0.197± 0.0020	ΜΣ

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$)

Στον Πίνακα 3.1.8 φαίνεται ότι η διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης, ως προς τον λόγο μήκους οφθαλμού προς το σταθερό μήκος, δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($P>0.05$) τόσο την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

Πίνακας 3.1.8: Μήκος οφθαλμού / Σταθερό μήκος (**L-Ey / SL, mm**) (**M.O. επεμβάσεων**) (Μέσος όρος ± Τυπικό σφάλμα του M.O.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα ($P>0.05$)
3	0.073± 0.0030	0.073± 0.0010	ΜΣ
14	0.096± 0.0004	0.094± 0.0016	ΜΣ

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$)

Στον Πίνακα 3.1.9 φαίνεται ότι η διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης, ως προς τον λόγο ύψους οφθαλμού προς το σταθερό μήκος, δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($P>0.05$) τόσο την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

Πίνακας 3.1.9: Ύψος οφθαλμού / Σταθερό μήκος (**H-Ey / SL, mm**) (**M.O. επεμβάσεων**) (Μέσος όρος ± Τυπικό σφάλμα του M.O.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα ($P>0.05$)
3	0.070± 0.0030	0.068± 0.0020	ΜΣ
14	0.090± 0.0010	0.087± 0.0016	ΜΣ

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$)

Στον Πίνακα 3.1.10 φαίνεται ότι η διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης, ως προς το ποσοστό (%) των ιχθυδίων με ελαιοσταγονίδιο, δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($P>0.05$) τόσο την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

Πίνακας 3.1.10: Ποσοστό (%) ιχθυδίων με ελαιοσταγονίδιο (**επεμβάσεις**) (Μέσος όρος ± Τυπικό σφάλμα του M.O.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα ($P>0.05$)
3	100	100	ΜΣ
14	31±7	27 ± 5	ΜΣ

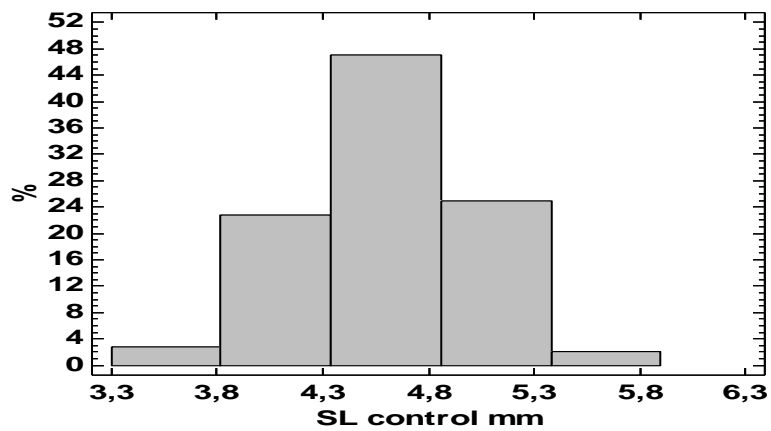
DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$)

Στον Πίνακα 3.1.11 φαίνεται ότι η διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της επέμβασης, ως προς τη διάμετρο του ελαιοσταγονιδίου, δεν είναι στατιστικώς σημαντική ($P>0.05$) τόσο την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

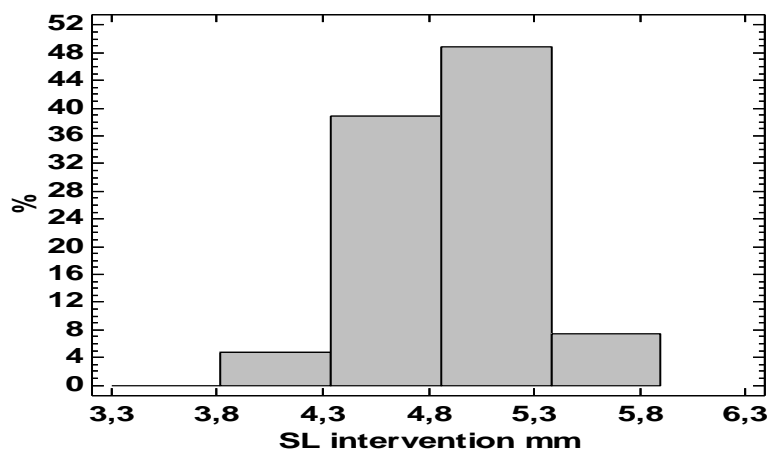
Πίνακας 3.1.11: Διάμετρος ελαιοσταγονιδίου (**LD, mm**) (**Μ.Ο. επεμβάσεων**) (Μέσος όρος \pm Τυπικό σφάλμα του Μ.Ο.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα ($P>0.05$)
3	0.21 \pm 0.004	0.22 \pm 0.001	ΜΣ
14	0.21 \pm 0.008	0.20 \pm 0.011	ΜΣ

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$)



Εικόνα 3.1. 1. Ιστόγραμμα % συχνότητας κλάσεων μηκών (mm) σταθερού μήκους (SL) την ημέρα 14 μετά την εκκόλαση για το μάρτυρα (control).



Εικόνα 3.1. 2. Ιστόγραμμα % συχνότητας κλάσεων μηκών (mm) σταθερού μήκους (SL) την ημέρα 14 μετά την εκκόλαση για την επέμβαση (intervention).

Πίνακας 3.1.12: Ποσοστιαία % κατανομή σταθερών μηκών για το μάρτυρα και την επέμβαση την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη.

Ποσοστό % του πληθυσμού	Σταθερό μήκος (mm) μάρτυρα	Σταθερό μήκος (mm) επέμβασης
1,0%	3,56	4,19
5,0%	3,90	4,36
10,0%	4,05	4,50
25,0%	4,33	4,70
50,0%	4,64	4,90
75,0%	4,87	5,16
90,0%	5,06	5,34
95,0%	5,14	5,42
99,0%	5,44	5,58

Από τις Εικόνες 3.1.1 και 3.1.2 διαφαίνεται ότι υπάρχει διαφορά

α) στο ποσοστό των μικρότερου μήκους ιχθυδίων έως 4.33 mm την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη (αποτελούν το 25% των ιχθυδίων του μάρτυρα και περίπου το 5% των ιχθυδίων της επέμβασης), (επισημαίνεται η παντελής απουσία ιχθυδίων της επέμβασης με σταθερό μήκος < 3.9 mm σε αντίθεση με το μάρτυρα όπου το 5% των ιχθυδίων είναι < 3.9 mm),

β) στο ποσοστό των μεγάλου μήκους ιχθυδίων από 4.70-5.34 mm (περίπου 24% ο μάρτυρας και 48% η επέμβαση),

γ) στο ποσοστό των πολύ μεγάλου μήκους ιχθυδίων >5.3mm (περίπου 2% για το μάρτυρα και 8 % για την επέμβαση).

Από τον Πίνακα 3.1.12 φαίνεται ότι το 75% των ιχθυδίων του μάρτυρα έχει σταθερό μήκος μέχρι 4.87mm ενώ στην επέμβαση φαίνεται ότι το 50% των ιχθυδίων έχουν σταθερό μήκος >4.90mm.

3.2 Ο ΛΟΓΟΣ RNA/DNA ΚΑΙ ΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ (%) ΗΜΕΡΗΣΙΑΣ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ (Gpi)

Στον Πίνακα 3.2.1 φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P>0.05$), ως προς το λόγο RNA/DNA την ημέρα 11 και 14 μετά την εκκόλαψη ανάμεσα στο μάρτυρα και την επέμβαση. Υπάρχει όμως την ημέρα 9 μετά την εκκόλαψη ($**P<0.01$).

Πίνακας 3.2.1: RNA/DNA (Μ.Ο. επεμβάσεων) (Μέσος όρος ± Τυπικό σφάλμα του Μ.Ο.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα (** $P<0.01$)
9	10.77	19.29±6.632	**
11	7.09±3.301	7.07±2.165	ΜΣ
14	10.24±5.917	14.65±3.705	ΜΣ

DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$), ($**P<0.01$)

Στον Πίνακα 3.2.2 φαίνεται ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά ($P>0.05$), ως προς το ποσοστό (%) της ημερήσιας αύξησης της πρωτεΐνης (Gri) την ημέρα 11 και 14 μετά την εκκόλαψη ανάμεσα στο μάρτυρα και την επέμβαση. Υπάρχει όμως την ημέρα 9 μετά την εκκόλαψη (** $P<0.01$).

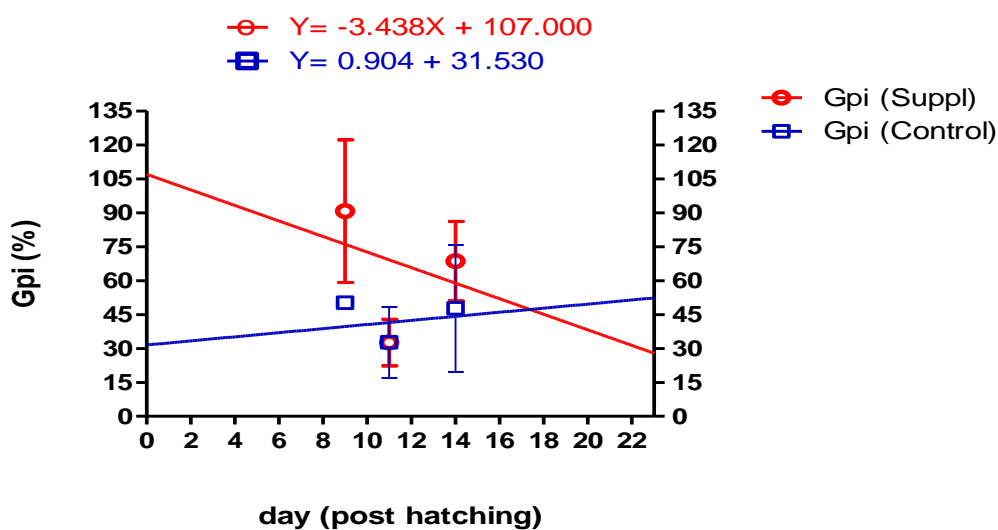
Πίνακας 3.2.2: Ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (Gri) (Μ.Ο. επεμβάσεων)
(Μέσος όρος ± Τυπικό σφάλμα του Μ.Ο.)

Ημέρα (DPH)	Μάρτυρας	Επέμβαση	Σημαντικότητα (** $P<0.01$)
9	50.20	90.70±31.503	**
11	32.70±15.700	32.60±10.300	ΜΣ
14	47.70±28.100	68.60±17.616	ΜΣ

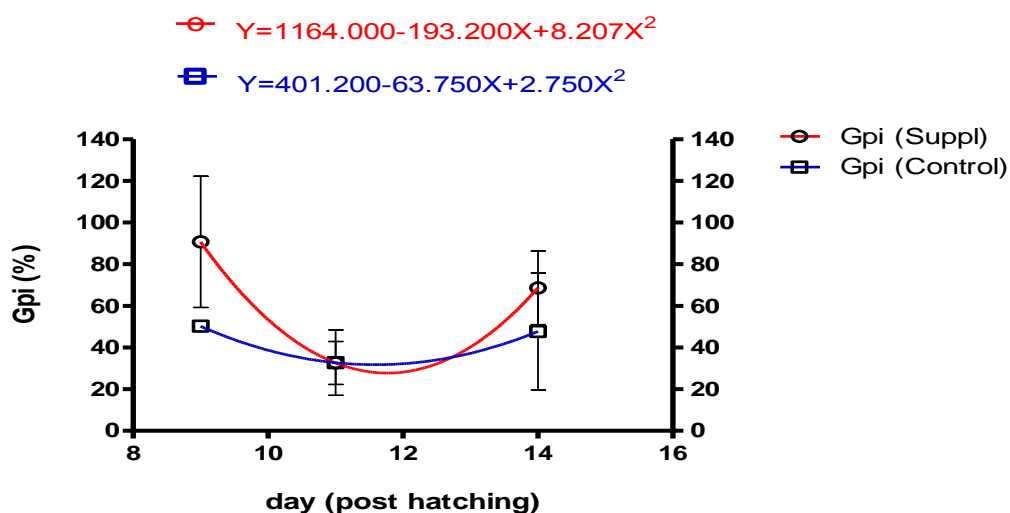
DPH: ημέρες μετά την εκκόλαψη, ΜΣ: μη σημαντικό, *: στατιστικά σημαντικό ($*P<0.05$),: (** $P<0.01$)

Gri= 0.93*T + 4.75 RNA/DNA -18.18, όπου Gri η % ημερήσια αύξηση της πρωτεΐνης και T η θερμοκρασία (Buckley, 1984).

A.



B.

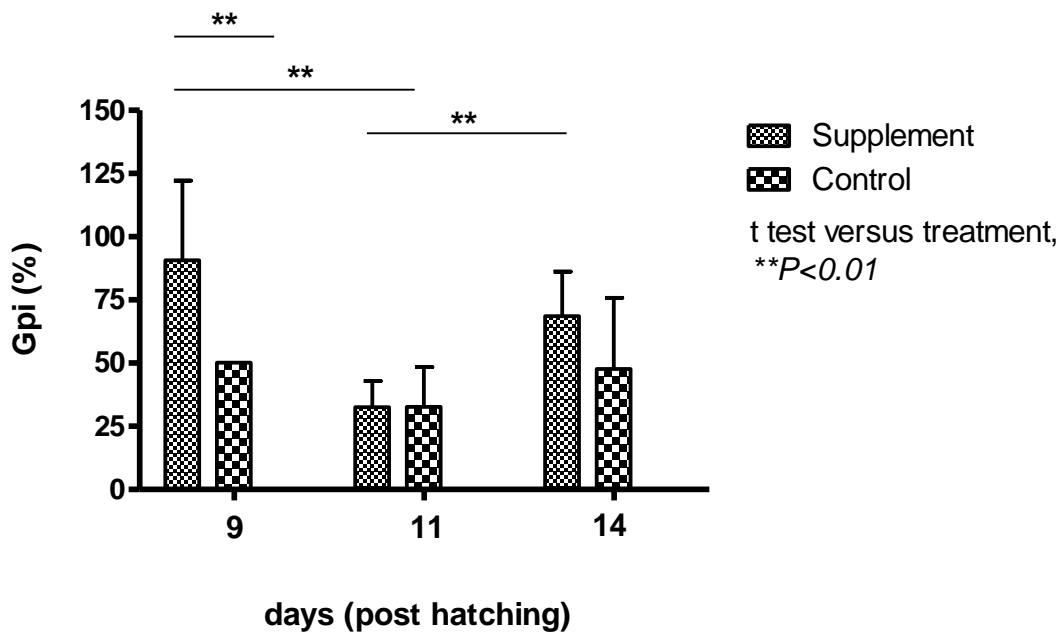


Εικόνα 3.2.1. Δείκτης αύξησης πρωτεΐνης (Gpi) ως συνάρτηση του σταδίου ανάπτυξης – μέρες μετά την εκκόλαψη- (days p.h.). **(A).** Ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης που εξετάζει την γραμμικότητα της σχέσης μεταξύ των μεγεθών του δείκτη αύξησης της ημερήσιας % αύξησης της πρωτεΐνης (Gpi) και του σταδίου ανάπτυξης. Η θετική σχέση του μάρτυρα και η αρνητική σχέση της επέμβασης που βρέθηκε σε σχέση με τον δείκτη αύξησης της ημερήσιας % αύξησης της πρωτεΐνης (Gpi), δεν είναι στατιστικά σημαντικές, όπως φαίνεται και από τις διαφορετικές κλίσεις των καλύτερων ευθειών (best-fit curves) που δεν είναι στατιστικά σημαντικές ($P > 0.05$). **(B).** Τα παραπάνω δεδομένα μπορούν με καλύτερη ακρίβεια να απεικονισθούν με μια συνάρτηση 2^{ου} βαθμού και με ένα καλύτερο συντελεστή συσχέτισης (βλέπε λεπτομέρειες στον Πίνακα 3.2.3 παρακάτω). Υπόμνημα: Suppl. = επέμβαση με συμπληρώματα (Se/I). Control= μάρτυρας. Y_t , Y_c = οι ευθείες γραμμικής παλινδρόμησης επέμβασης και μάρτυρα.

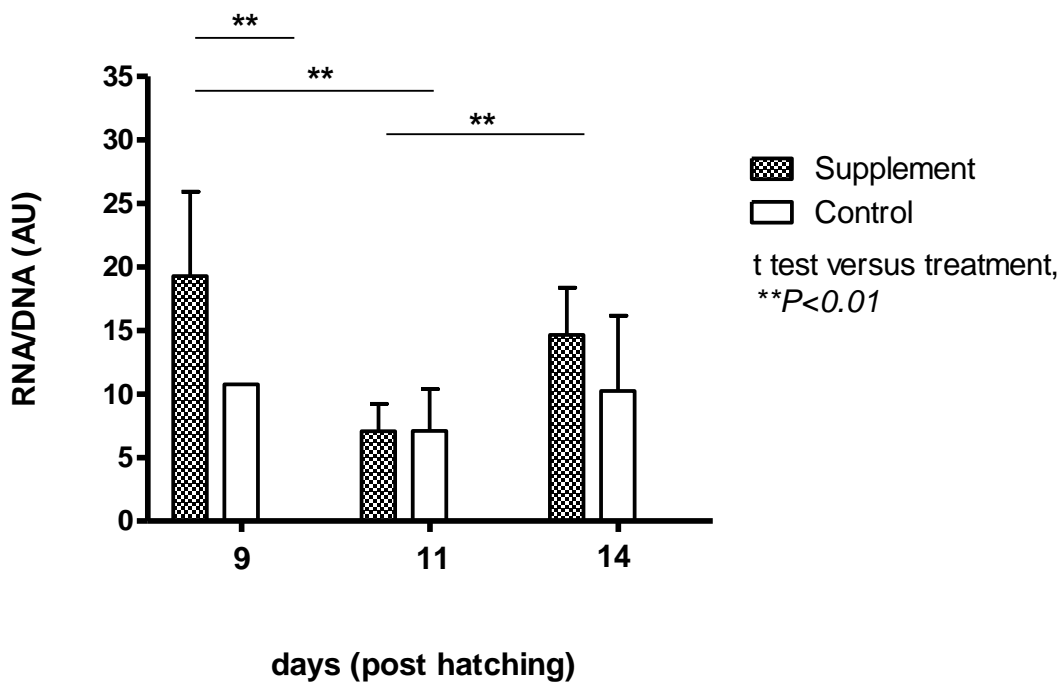
Στον Πίνακα 3.2.3 εμφανίζεται φθίνουσα τάση στον δείκτη αύξησης της πρωτεΐνης (Gri) και μέχρι το τέλος του πειράματος (14^η ημέρα) η οποία δεν είναι στατιστικά σημαντική (βλ. παραπάνω Εικόνα). Από την παραπάνω Εικόνα 3.2.1 και τον Πινάκα 3.2.3 φαίνεται η καλύτερη συσχέτιση των σημείων (βλέπε R^2 και p) του πειράματος με την παλινδρόμηση 2^{ου} βαθμού, για τους ίδιους βαθμούς ελευθερίας.

Πίνακας 3.2.3. Εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης ιχθυδίων τσιπούρας για την επέμβαση του συμπληρώματος (Se/I) και του μάρτυρα, από την 9^η μέχρι την 14^η μέρα μετά την εκκόλαση (dph). Το p δείχνει την πιθανότητα να είναι οι κλίσεις των ευθειών = 0.

Χειρισμός	Βαθμός σχέσης	Εξισώσεις παλινδρόμησης	R^2	n	p
Συμπλήρωμα (Se/I)	1 ^{ου} βαθμού	$Y=-3.438X+107.000$	0.037	3	0.647
Μάρτυρας		$Y=0.904X+31.530$	0.006	3	0.847
Συμπλήρωμα (Se/I)	2 ^{ου} βαθμού	$Y=1164.000-193.200X+8.207X^2$	0.337	3	0.647
Μάρτυρας		$Y=401.200-63.75X+2.750X^2$	0.128	3	0.847



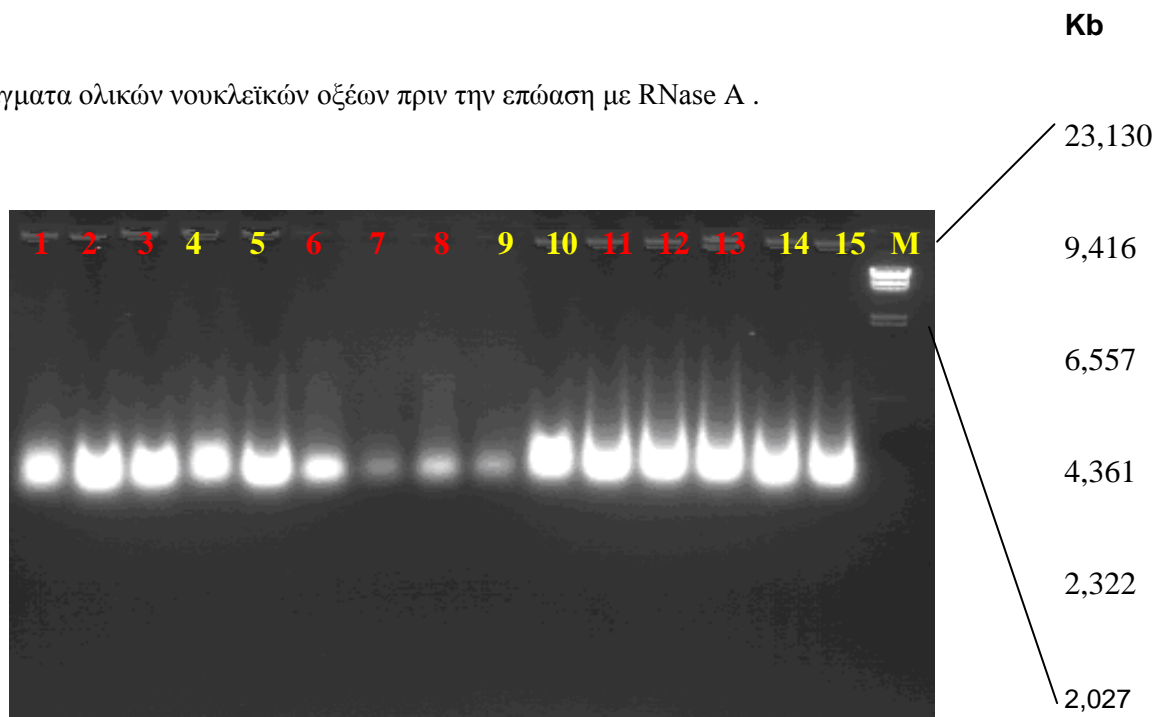
Εικόνα 3.2.2. Επίπεδα δείκτη ημερήσιας % αύξησης πρωτεΐνης (Gpi) ως συνάρτηση του σταδίου ανάπτυξης – ημέρες μετά την εκκόλαψη- (dph) για την επέμβαση (Se/I) και το μάρτυρα. Ο έλεγχος με το t-test που έγινε ως προς το στάδιο (dph) μετά την εκκόλαψη των αυγών έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές (Unpaired two-tailed t-test, $n=3$, $**P < 0.01$) στην ημερήσια % αύξησης της πρωτεΐνης (Gpi) μεταξύ 9^{ης} και 11^{ης} όπως και 11^{ης} και 14^{ης} ημέρας (για την επέμβαση), αλλά και στην ημερήσια % αύξησης της πρωτεΐνης (Gpi) της 9^{ης} ημέρας μετά την εκκόλαψη (dph) ανάμεσα στην επέμβαση και το μάρτυρα. (Unpaired two-tailed t-test, $n=3$ (επέμβαση), $n=2$ (μάρτυρας), $**P < 0.01$). Υπόμνημα: Suppl. = επέμβαση με συμπληρώματα (Se/I). Control= μάρτυρας



Εικόνα 3.2.3. Επίπεδα δείκτη RNA/DNA (Αυθαίρετες μονάδες) ως συνάρτηση του σταδίου ανάπτυξης –ημέρες μετά την εκκόλαψη– (dph) για την επέμβαση (Se/I) και το μάρτυρα. Ο έλεγχος με το t-test που έγινε ως προς το στάδιο (dph) μετά την εκκόλαψη των αυγών έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές (Unpaired two-tailed t-test, $n=3$, $**P<0.01$) στην ημερήσια % αύξησης της πρωτεΐνης (Gpi) μεταξύ 9^{ης} και 11^{ης} όπως και 11^{ης} και 14^{ης} ημέρας (για την επέμβαση), αλλά και στο λόγο RNA/DNA της 9^{ης} ημέρας μετά την εκκόλαψη (dph) ανάμεσα στην επέμβαση και το μάρτυρα. (Unpaired two-tailed t-test, $n=3$ (επέμβαση), $n=2$ (μάρτυρας), $**P<0.01$). Υπόμνημα: Suppl. = επέμβαση με συμπληρώματα (Se/I). Control= μάρτυρας.

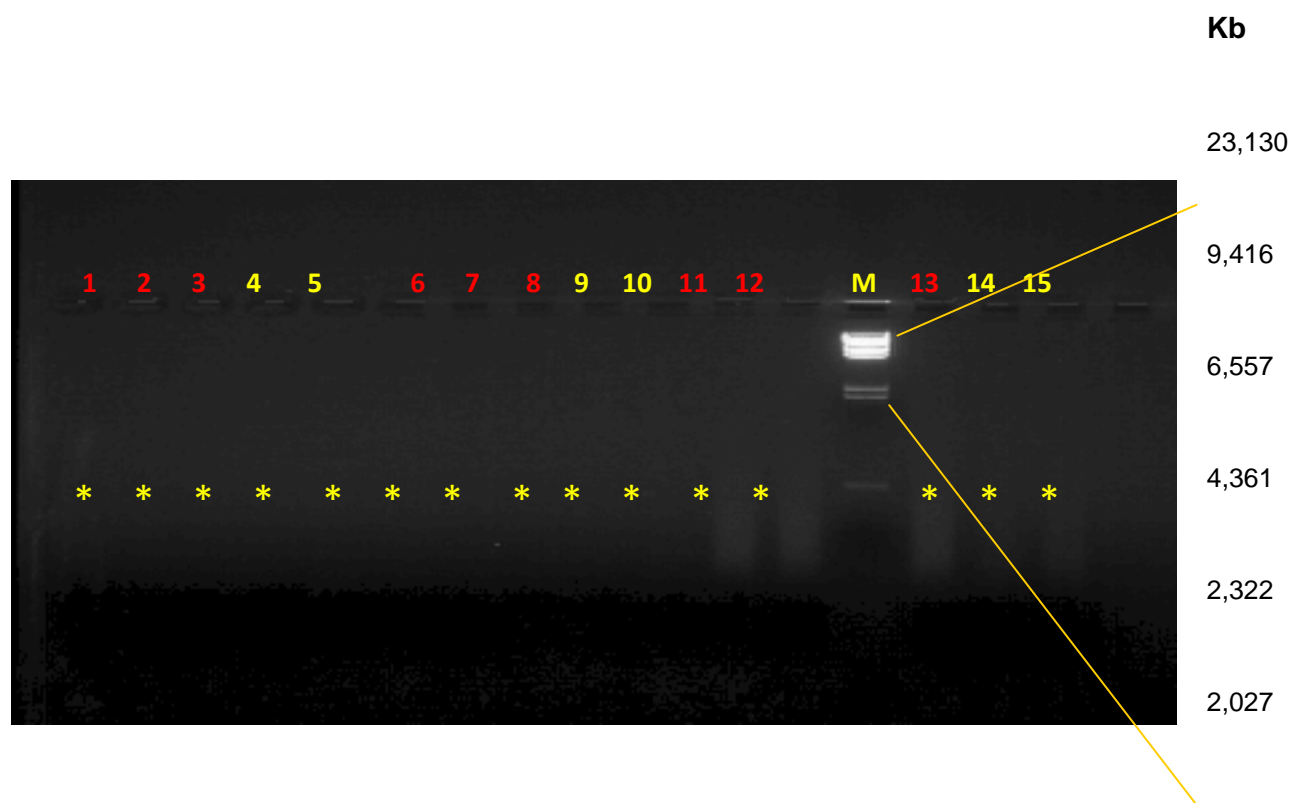
Στις Εικόνες 3.2.2 και 3.2.3 φαίνονται οι διαφορές ανάμεσα στο μάρτυρα και την επέμβαση, ως προς το λόγο RNA/DNA και ημερήσιας % αύξησης της πρωτεΐνης (Gpi) σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν (9, 11, 14 dph). Η διαφορά ανάμεσα στο μάρτυρα και την επέμβαση την ημέρα 9 μετά την εκκόλαψη είναι στατιστικά σημαντική (Unpaired two-tailed t-test, $n=3$ (επέμβαση), $n=2$ (μάρτυρας), $**P<0.01$). Στατιστικά σημαντικές (Unpaired two-tailed t-test, $n=3$, $**P<0.01$) διαφορές εντοπίστηκαν ως προς τα αναπτυξιακά στάδια 9 έως 11 ημερών μετά την εκκόλαψη και 11 έως 14 ημερών για την επέμβαση.

Α. Δείγματα ολικών νουκλεϊκών οξέων πριν την επώαση με RNase A .



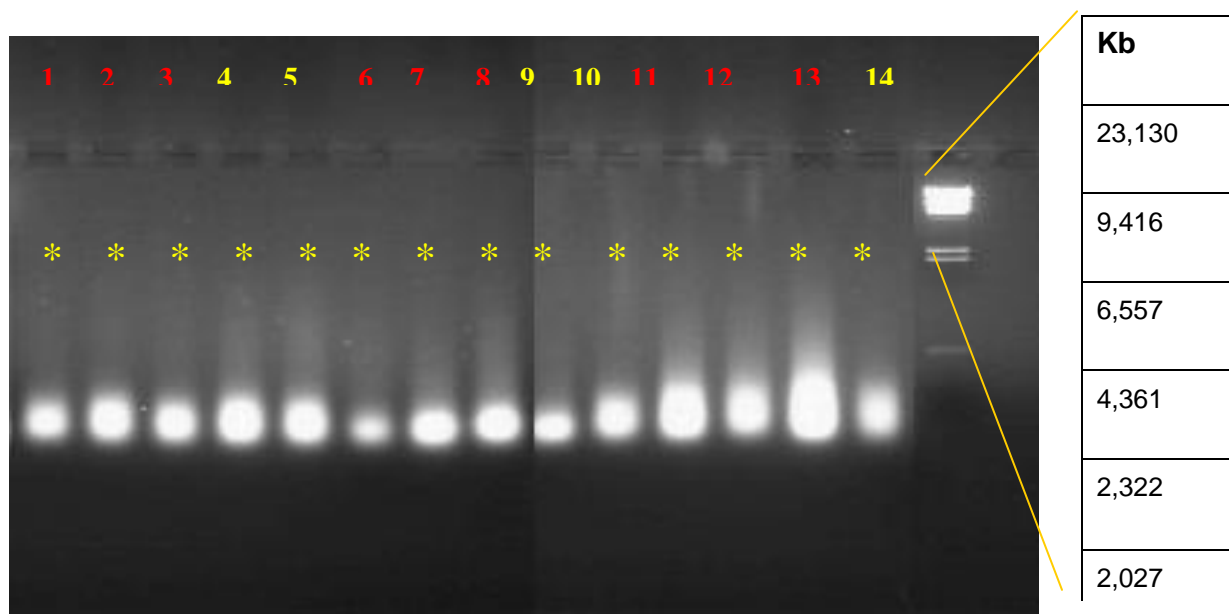
Εικόνα 3.2.4. Ηλεκτροφορητική ανάλυση απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) σε πήκτωμα αγαρόζης (1.5 %) δειγμάτων ιχθυδίων τσιπούρας (1-15), πριν την επώαση με RNase A. 25 μl “φορτώθηκαν” σε κάθε θέση στο πήκτωμα αγαρόζης από απομονωμένα νουκλεϊκά οξέα. Υπόμνημα: Τα δείγματα 1-5 αφορούν στην 9^η ημέρα, τα δείγματα 6-10, αφορούν την 11^η ημέρα και δείγματα 11-15, αφορούν στην 14^η ημέρα. M= δείκτης μοριακών βαρών λHindIII, εύρους 22.1 Kb-100bp. Με κόκκινη γραμματοσειρά είναι τα δείγματα της επέμβασης και με κίτρινη τα δείγματα του μάρτυρα.

B. Δείγματα μετά την επώαση με RNase A.

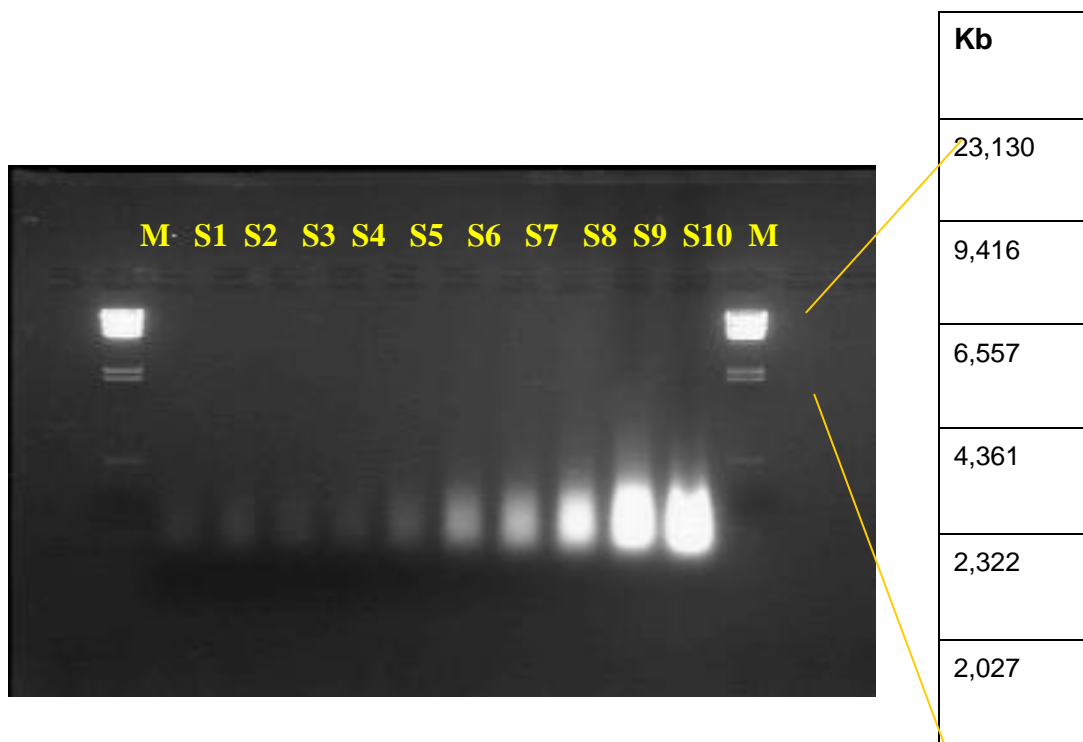


Εικόνα 3.2.5. Ηλεκτροφορητική ανάλυση απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) σε πήκτωμα αγαρόζης (1.5 %) δειγμάτων ιχθυδίων τσιπούρας (1-15), μετά την επώαση με RNase A. Υπόμνημα: (*) = παρουσία γενωμ. DNA, M= δείκτης μοριακών βαρών λHindIII, εύρους 22.1 Kb-100bp (New England Biolabs). Με κόκκινη γραμματοσειρά είναι τα δείγματα της επέμβασης και με κίτρινη τα δείγματα του μάρτυρα. Τα δείγματα 1-5 αφορούν στην 9^η ημέρα, τα δείγματα 6-10, αφορούν στην 11^η ημέρα και δείγματα 11-15, αφορούν στην 14^η ημέρα. **B.** Δείγματα μετά την επώαση με RNase A. Με κόκκινη γραμματοσειρά είναι τα δείγματα της επέμβασης και με κίτρινη τα δείγματα του μάρτυρα.

Γ. Ηλεκτροφορητική ανάλυση ολικών νουκλεϊκών οξέων ίσης ποσότητας ιχθυδίων *Sparus aurata*



Εικόνα 3.2.6. Ηλεκτροφορητική ανάλυση απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων (DNA και RNA) σε πήκτωμα αγαρόζης (1.5 %) δειγμάτων ιχθυδίων τσιπούρας (1-14). Ίση περίπου ποσότητα (~5 µg) “φορτώθηκε” στο πήκτωμα της αγαρόζης από κάθε δείγμα και από τα 3 αναπτυξιακά στάδια. Υπόμνημα: (*) = παρουσία γενωμ. DNA, M= δείκτης μοριακών βαρών λHindIII, εύρους 22.1 Kb-100bp (New England Biolabs). Με κόκκινη γραμματοσειρά είναι τα δείγματα της επέμβασης και με κίτρινη τα δείγματα του μάρτυρα. Τα δείγματα 1-5 αφορούν στην 9^η ημέρα, τα δείγματα 6-10, αφορούν στην 11^η ημέρα και τα δείγματα 11-14, αφορούν στην 14^η ημέρα.. Με κόκκινη γραμματοσειρά είναι τα δείγματα της επέμβασης και με κίτρινη τα δείγματα του μάρτυρα.



Εικόνα 3.2.7. Εικόνα για την καμπύλη αναφοράς με την βοήθεια δείκτη νουκλεϊκών οξέων διαφόρων ζωνών και ορισμένων ποσοτήτων (HindIII digest, εύρους 22.1 Kb-100bp (New England Biolabs)) για την επαλήθευση της μεθοδολογίας μέτρησης των διαφόρων ποσοτήτων RNA και DNA στο κάθε δείγμα μας.

Πίνακας 3.2.4. Στοιχεία για τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς με την βοήθεια δείκτη νουκλεϊκών οξέων διαφόρων ζωνών και ορισμένων ποσοτήτων (HindIII digest, εύρους 22.1 Kb-100bp (New England Biolabs) για την επαλήθευση της μεθοδολογίας μέτρησης των διαφόρων ποσοτήτων RNA και DNA στο κάθε δείγμα μας.

Σημείο καμπύλης	Ποσότητα δείγματος (μl)	H₂O
S1	0.04	34.96
S2	0.09	34.91
S3	0.17	34.83
S4	0.35	34.65
S5	0.69	34.31
S6	1.39	33.61
S7	2.78	32.22
S8	5.56	29.44
S9	11.11	23.89
S10	22.22	12.78

Από τις Εικόνες 3.2.4, 3.2.5 και 3.2.6 φαίνεται μια ποσοτική απεικόνιση της ύπαρξης RNA στα δείγματα της επέμβασης και του μάρτυρα.

Για την περαιτέρω ποσοτική εκτίμηση με αυξημένη ευαισθησία και ακρίβεια, δημιουργήθηκε μία καμπύλη αναφοράς με την βοήθεια δείκτη νουκλεϊκών οξέων διαφόρων ζωνών και ορισμένων ποσοτήτων (HindIII digest, εύρους 22.1 Kb-100bp (New England Biolabs) για την επαλήθευση της μεθοδολογίας μέτρησης των διαφόρων ποσοτήτων RNA και DNA στο κάθε δείγμα μας. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάστηκαν,

διαλυτοποιήθηκαν και «φορτώθηκαν» σε πήκτωμα αγαρόζης 1.5%, σταδιακά αυξανόμενες ποσότητες του υλικού των απομονώσεων μας από το κάθε δείγμα όπως φαίνεται στον Πίνακα 3.2.4. (Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκε ένα συγκεκριμένο δείγμα για την παρασκευή της καμπύλης αναφοράς με παράγοντα αραιώσης 1:4).

Από την Εικόνα 3.2.7, φαίνεται ότι οι αντιστοιχούσες ποσότητες των απομονώσεων, σύμφωνα με τις αραιώσεις του Πίνακα 3.2.4., δημιουργούν μια κλίμακα (ladder) διαβαθμίσεων της ποσότητας που με την βοήθεια των δεικτών σταθερών ποσοτήτων DNA (λHINDIII-DNA standard/ Markers), καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων κάθε ζώνης. Επιπλέον, μπορεί να ποσοτικοποιηθεί το κάθε δείγμα στο πήκτωμα της αγαρόζης, όχι μόνο με ορατή επισκόπηση αλλά και με την βοήθεια προγράμματος επεξεργασίας εικόνας για ποσοτικοποίηση ζωνών. Τα αποτελέσματά μας συμπίπτουν μετά την επεξεργασία με την βοήθεια του προγράμματος (Image J)* και επαληθεύουν τα ευρήματα.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Επίδραση της προσθήκης σεληνίου και ιωδίου στο σιτηρέσιο ιχθυδίων τσιπούρας αναφορικά με τη σωματική τους ανάπτυξη μέσω της χρήσης βιομετρικών δεικτών (Σύνοψη).

Η παρούσα μελέτη έδειξε μεγαλύτερη αύξηση (στατιστικώς σημαντική, * $P < 0.05$) του σταθερού μήκους (SL) των ιχθυδίων τσιπούρας έως 14 ημέρες (14 dph) μετά την εκκόλαψη, που κατανάλωσαν Τροχόζωα εμπλουτισμένα με σελήνιο και ιώδιο (4.90 ± 0.013 Τυπικό σφάλμα M.O, $n = 3$ ανά δεξαμενή επέμβασης/ ημέρες μετά την εκκόλαψη) έναντι του μάρτυρα (4.60 ± 0.080 Τυπικό σφάλμα M.O, $n = 2$ ανά δεξαμενή μάρτυρα/ ημέρες μετά την εκκόλαψη). Τα ιχθύδια της επέμβασης υπερτερούσαν σημαντικά στο ποσοστό ατόμων μεγάλου (από 4.70-5.34 mm) (48% η επέμβαση και 24% ο μάρτυρας) και πολύ μεγάλου μεγέθους (> 5.34 mm) (περίπου 8% η επέμβαση και 2% ο μάρτυρας) σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ τονίζεται η απουσία πολύ μικρών ιχθυδίων (< 3.9 mm) στην επέμβαση. Υπήρξε τάση ($P = 0.076$), την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη, όσον αφορά στο ύψος της κεφαλής με τα ιχθύδια της επέμβασης να υπερτερούν έναντι του μάρτυρα. Τάση ($P = 0.074$) υπήρξε και στο λόγο ύψους σώματος προς σταθερό μήκος όπου για την επέμβαση ήταν μικρότερος σε σχέση με το μάρτυρα. Επισημαίνεται το μεγάλο ποσοστό ιχθυδίων με ελαιοσταγονίδιο τόσο για το μάρτυρα (31%) όσο και για την επέμβαση (27%) την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη. Η διαφορά δεν είναι στατιστικώς σημαντική. Επιπλέον είναι αξιοσημείωτο το γεγονός τα ιχθύδια του μάρτυρα αλλά και της επέμβασης, τόσο την ημέρα 3 όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη, διέθεταν ελαιοσταγονίδιο με περίπου την ίδια μέση διάμετρο παρά την πάροδο 11 ημερών. Σε όλες τις παραμέτρους μεταξύ αυτών και εκείνων όπου υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά (* $P < 0.05$), την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη, τα

ιχθύδια της επέμβασης είχαν τάση (βασίζόμενοι στους μέσους όρους) να είναι μεγαλύτερα από εκείνα του μάρτυρα.

4.1.1 Σταθερό μήκος

Η μορφομετρία αποτελεί σημαντικό δείκτη σωματικής ανάπτυξης και ελέγχου δυσμορφιών και συνεπώς ποιοτικής αξιολόγησης των ιχθυδίων (FAO,1999, Koumoundouros et al., 1995). Από όλα τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, το σταθερό μήκος είναι ίσως το σημαντικότερο επειδή είναι λιγότερο ανεπτυγμένο κατά την εκκόλαψη σε σχέση με άλλα μορφολογικά χαρακτηριστικά, όπως το ύψος της κεφαλής και τη διάμετρο των οφθαλμών. Η ικανότητα θήρευσης εξαρτάται τόσο από τη δυνατότητα εντοπισμού του θηράματος στο οποίο πρωτεύοντα ρόλο παίζει η όραση (τα ατελή ιχθύδια βασίζονται κυρίως στην όραση), όσο και από τη δυνατότητα σύλληψης του θηράματος στο οποίο καθοριστικό ρόλο παίζει η κολυμβητική ικανότητα των ιχθυδίων που με τη σειρά της εξαρτάται από το ολικό τους μήκος (αυξάνει η κολυμβητική ικανότητα με την αύξηση του ολικού μήκους) (Mauguit et al., 2010). Η ικανότητα θήρευσης είναι αυτή που καθορίζει σε μεγάλο βαθμό την επιβίωση και στη συνέχεια την ανάπτυξη των ιχθυδίων. Για την κατανόηση της σημασίας της θηρευτικής ικανότητας πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι τα αποθέματα της λεκίθου (κυρίως πρωτεϊνικής σύστασης - ελεύθερα αμινοξέα-, ακολουθούν τα ουδέτερα λίπη και τα φωσφολιπίδια) (Ronnestad et al., 1994) εξαντλούνται για τα ιχθύδια τσιπούρας την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη (στους 18 βαθμούς κελσίου) και πλέον στηρίζονται πρωτίστως στην ικανότητα θήρευσης τους και δευτερευόντως στην σταγόνα ελαίου για την θρέψη τους (FAO, 1999). Επίσης τονίζεται ότι για τα ιχθύδια τσιπούρας το «point of no return» δηλαδή το χρονικό σημείο εκείνο, μετά το οποίο, τα ιχθύδια οδηγούνται σε προδιαγεγραμμένο θάνατο (εξαιτίας αλλοιώσεων εσωτερικών

οργάνων), λόγω μη ικανοποιητικής διατροφής, στους 19 βαθμούς κελσίου είναι 8 ημέρες μετά την εκκόλαψη (Yufera et al., 1993).

Στην παρούσα μελέτη όπως διατυπώθηκε και παραπάνω διαφάνηκε μεγαλύτερη αύξηση (στατιστικώς σημαντική, $*P<0.05$) του σταθερού μήκους (SL) των ιχθυδίων τσιπούρας έως 14 ημέρες (14 dph) μετά την εκκόλαψη, που κατανάλωσαν Τροχόζωα εμπλουτισμένα με σελήνιο και ιώδιο. Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ως προς τις κλάσεις των σταθερών μηκών ως προς το ποσοστό των μικρών (< 3.9 mm), των μεγάλων (4.70-5.34 mm) και των πολύ μεγάλων (>5.34 mm) ιχθυδίων ανάμεσα στο μάρτυρα και την επέμβαση.

Στην έως σήμερα βιβλιογραφία που αφορά σε πειράματα εμπλουτισμού της τροφής με σελήνιο και ιώδιο ή ενός από αυτά, παρεχόμενα σε άλλα είδη ιχθυδίων και όχι τσιπούρας (τονίζεται η μη ύπαρξη μελέτης πάνω σε ιχθύδια τσιπούρας), τα αποτελέσματα που αφορούν στις μετρήσεις του σταθερού ή του ολικού μήκους είναι διαφορούμενα. Στη μελέτη των Hamre et al. (2008) όπου εμπλούτισαν Τροχόζωα με σελήνιο (4.8 ± 0.5 mg Se/ Kg Ξ.Β, n= 4) ως πηγή σεληνίου χρησιμοποιήθηκε σεληνικό νάτριο) και ιώδιο (112 ± 25 mg I / Kg Ξ.Β, n=4) ως πηγή ιωδίου χρησιμοποιήθηκε ιωδιούχο νάτριο) στο επίπεδο των Κωπηπόδων (Πίνακας 1.3), τα ιχθύδια μπακαλιάρου του Ατλαντικού που κατανάλωσαν Τροχόζωα με σελήνιο και ιώδιο είχαν στατιστικώς σημαντικά ($*P<0.05$) μικρότερο σταθερό μήκος σε σχέση με εκείνα του μάρτυρα, την ημέρα 26 μετά την εκκόλαψη. Στη μελέτη των Penglase et al. (2010) όπου ο μάρτυρας διαφοροποιούνταν από την επέμβαση μόνο ως προς την προσθήκη του σεληνίου (στο επίπεδο των Κωπηπόδων, 3 mg Se/ Kg Ξ.Β, n=4), ως πηγή σεληνίου χρησιμοποιήθηκε μαγιά εμπλουτισμένη με σελήνιο) στον εμπλουτισμό των Τροχοζώνων, παρεχόμενα σε ιχθύδια μπακαλιάρου του Ατλαντικού, την ημέρα 7 μετά την εκκόλαψη και την ημέρα 17 μετά την εκκόλαψη ο μάρτυρας (ιχθύδια

που είχαν καταναλώσει Τροχόζωα χωρίς σελήνιο) είχε στατιστικώς σημαντικό ($*P<0.05$) μεγαλύτερο μήκος σώματος από την επέμβαση. Στη μελέτη των Ribeiro et al. (2012) όπου άτομα *Artemia* εμπλουτίστηκαν με ιώδιο και σελήνιο στο επίπεδο των Κωπηπόδων (χρησιμοποίησαν το πρωτόκολλο των Ribeiro et al., 2011), ως προς τις συγκεντρώσεις του ιωδίου και του σεληνίου, το ίδιο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μελέτη), προς χορήγηση σε ιχθύδια του είδους *Solea selegalensis* και ως δείκτης ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε το ξηρό βάρος, τα ιχθύδια που κατανάλωσαν τα εμπλουτισμένα με σελήνιο και ιώδιο άτομα *Artemia* είχαν στατιστικώς σημαντικό ($*P<0.05$, $n=3$) μεγαλύτερο ξηρό βάρος σε σχέση με το μάρτυρα την ημέρα 27 μετά την εκκόλαψη. Στη μελέτη των Hawkyard et al. (2011) όπου εμπλούτισαν άτομα *Artemia* με ιώδιο προς χορήγηση σε ιχθύδια του είδους *Danio rerio*, τα ιχθύδια που κατανάλωσαν τα άτομα *Artemia* εμπλουτισμένα με ιώδιο (50 mg I / Kg Ξ.Β, ως πηγή ιωδίου χρησιμοποιήθηκε ιωδιούχο κάλιο) εντός του εύρους των Κωπηπόδων, είχαν τάση ($P=0.053$, $n=12$) για μεγαλύτερο ολικό μήκος από το μάρτυρα σε όλες τις ηλικίες που μελετήθηκαν (14, 21, 28, 38 ημέρες μετά τη γονιμοποίηση των αυγών) και στατιστικά σημαντικό μεγαλύτερο υγρό βάρος ($*P<0.05$, $n=12$). Τέλος στη μελέτη των Moren et al. (2006) όπου εμπλούτισαν άτομα *Artemia* με ιώδιο (318 mg I / Kg Ξ.Β, ως πηγή ιωδίου χρησιμοποιήθηκε το σκεύασμα Lipiodol) εντός του εύρους των Κωπηπόδων προς χορήγηση σε ιχθύδια του είδους *Hippoglossus hippoglossus* L. τα ιχθύδια που κατανάλωσαν τα άτομα *Artemia* εμπλουτισμένα με ιώδιο δεν είχαν στατιστικώς σημαντικό ($P>0.05$, $n=6$) ούτε μεγαλύτερο μήκος σώματος από το μάρτυρα αλλά ούτε και βάρος έως και 60 dpff (dpff: ημέρες μετά την πρώτη παροχή σιτηρεσίου).

4.1.2 Ύψος κεφαλής και λόγος ύψους σώματος προς σταθερό μήκος

Η σωματική ανάπτυξη των ιχθυδίων επηρεάζεται έντονα κατά τα πρώτα στάδια της εξωγενούς διατροφής όταν και λαμβάνουν χώρα έντονες τάσεις αλλομετρίας βασικών χαρακτηριστικών σε σχέση με το ολικό μήκος. Η τάση είναι από έναν επιμηκυμένο, ως προς τον οριζόντιο άξονα, οργανισμό σε έναν λιγότερο επιμηκυμένο, ως προς τον οριζόντιο άξονα, και σε έναν πιο επιμηκυμένο ως προς τον κατακόρυφο άξονα, συχνά με μεγάλη κεφαλή και γνάθους. Τα ιχθύδια της οικογένειας *Sparidae* που ανήκει και η τσιπούρα έχουν την τάση να μεγαλώνουν ταχέως, με επιλεκτική ανάπτυξη του μήκους τους προς αποφυγή θηρευτών και αύξησης της θηρευτικής τους ικανότητας όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω (Pavlidis & Mylonas., 2011).

Στην παρούσα μελέτη υπήρξε τάση ($P=0.076$), την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη, στο ύψος της κεφαλής, με τα ιχθύδια της επέμβασης να υπερτερούν έναντι του μάρτυρα. Τάση ($P=0.074$) υπήρξε και στο λόγο ύψους σώματος προς σταθερό μήκος όπου για την επέμβαση ήταν μικρότερος σε σχέση με το μάρτυρα. Το γεγονός ότι ο λόγος ύψους σώματος προς σταθερό μήκος παρουσίασε τάση για μικρότερη τιμή ($P=0.074$) την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη για την επέμβαση, πιθανώς να δείχνει το μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης για τα ιχθύδια που κατανάλωσαν ιώδιο και σελήνιο σε σχέση με το μάρτυρα, εφόσον μικρότερος λόγος σημαίνει ότι το σταθερό μήκος μεταβάλλεται περισσότερο σε σχέση με το ύψος του σώματος για τα ιχθύδια της επέμβασης και σε συνδυασμό με την διατυπωμένη πιο πάνω επιλεκτικότητα των ιχθυδίων να αναπτυχθούν κατά μήκος περισσότερο από ότι κατά ύψος κατά τα πρώτα στάδια, φαίνεται ότι υπήρξε τόσο μεγάλη δυναμική στη διαφορά σταθερού μήκους μεταξύ μάρτυρα και επέμβασης που ενδεχόμενες διαφορές στο ύψος του σώματος τις κατέστησαν αμελητέες (Pavlidis & Mylonas, 2011).

4.1.3 Αριθμός ατόμων με ελαιοσταγονίδιο και διάμετρος ελαιοσταγονιδίου

Μετά την απορρόφηση του λεκιθικού σάκου και την έναρξη παροχής εξωγενούς τροφής, η σταγόνα ελαίου, λιπιδικής σύστασης (ουδέτερα λίπη) (Ronnestad et al., 1994), είναι η μοναδική πηγή ενδογενούς θρέψης. Η σταγόνα ελαίου χρησιμοποιείται από τα ιχθύδια ως εναλλακτική πηγή ενέργειας σε περιπτώσεις που η εξωγενής διατροφή δεν είναι επαρκής (Pavlidis & Mylonas, 2011). Υπάρχει συσχέτιση μεταξύ του καταβολισμού των λιπαρών οξέων των ουδέτερων λιπών της σταγόνας ελαίου και της απορρόφησης της (Ronnestad et al., 1994). Σύμφωνα με FAO (1999) την ημέρα 15 μετά την εκκόλαψη τα ιχθύδια τσιπούρας έχουν απορροφήσει το 100% του ελαιοσταγονιδίου. Στην παρούσα μελέτη υπήρξε μεγάλο ποσοστό ιχθυδίων με ελαιοσταγονίδιο τόσο για το μάρτυρα (31%) όσο και για την επέμβαση (27%) την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη. Επίσης τα ιχθύδια του μάρτυρα αλλά και της επέμβασης, τόσο την ημέρα 3 όσο και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη, διέθεταν ελαιοσταγονίδιο με περίπου την ίδια μέση διάμετρο παρά την πάροδο 11 ημερών.

Στη μελέτη των Divanach et al. (1983) σε ιχθύδια τσιπούρας, η μεγαλύτερη ανάπτυξη συνδυαζόταν με πιο αργούς ρυθμούς κατανάλωσης της σταγόνας ελαίου. Στη μελέτη των Avila et al. (1987) πάνω σε ιχθύδια του είδους *Siganus guttatus* (Bloch) η ταχύτερη κατανάλωση του ελαιοσταγονιδίου συνδυαζόταν με μικρότερου μεγέθους ιχθύδια.

Στην παρούσα μελέτη το γεγονός ότι ένα μεγάλο ποσοστό (περίπου το 1/3) των ιχθυδίων τόσο του μάρτυρα όσο και της επέμβασης είχαν ελαιοσταγονίδιο την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη, παρόλο που σύμφωνα με FAO (1999) την ημέρα 15 μετά την εκκόλαψη απορροφάται το 100%, καταδεικνύει ότι τόσο τα ιχθύδια του μάρτυρα όσο και τα

ιχθύδια της επέμβασης διατρέφονταν ικανοποιητικά. Η μέση διάμετρος του ελαιοσταγονιδίου παρέμεινε περίπου η ίδια (0.21mm για το μάρτυρα και 0.22mm για την επέμβαση) την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη (την ημέρα απορρόφησης του λεκιθικού σάκου και πριν τη χορήγηση Τροχοζώων) και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη (0.21mm για το μάρτυρα και 0.22mm για την επέμβαση). Αν και μειώθηκαν (όπως αναμενόταν) τα άτομα που διέθεταν ελαιοσταγονίδιο (από 100% την ημέρα 3 μετά την εκκόλαψη τόσο για το μάρτυρα όσο και για την επέμβαση, σε 31% για το μάρτυρα και 27% για την επέμβαση την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη), τα εναπομείναντα ιχθύδια με ελαιοσταγονίδιο δεν κατανάλωσαν το λιπιδικό απόθεμα του ελαίου. Το συγκεκριμένο γεγονός ίσως αποτελεί ένδειξη ιδιαίτερα καλών συνθηκών εκτροφής.

4.1.4 Αρχική ιχθυοπυκνότητα

Σύμφωνα με FAO (1999) για την εντατική εκτροφή ιχθυδίων τσιπούρας σε παραγωγική κλίμακα συνίσταται αρχική ιχθυοπυκνότητα 150-200 ανά λίτρο νερού δεξαμενής εκτροφής.

Στην παρούσα μελέτη ο μέσος όρος της αρχικής ιχθυοπυκνότητας του μάρτυρα ήταν 163 ± 3 και 172 ± 2 ανά λίτρο νερού για την επέμβαση.

Το πείραμα σχεδιάστηκε για να πραγματοποιηθεί υπό πραγματικές συνθήκες εντατικής εκτροφής, στοιχείο που αποτυπώνεται και στην αρχική ιχθυοπυκνότητα.

4.2 Επίδραση της προσθήκης σεληνίου και ιωδίου στο σιτηρέσιο ιχθυοδίων τσιπούρας αναφορικά με τη σωματική τους ανάπτυξη μέσω του διατροφικού δείκτη RNA/DNA και το ποσοστό (%) της ημερήσιας αύξησης της πρωτεΐνης (G_{pr}) (Σύνοψη).

Η παρούσα μελέτη δεν έδειξε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ($P>0.05$) τόσο στο λόγο RNA/DNA όσο και στην ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (G_{pr}) ανάμεσα στο μάρτυρα και την επέμβαση για όλα τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν (11, 14 ημέρες μετά την εκκόλαψη), εκτός από την ημέρα 9 μετά την εκκόλαψη (** $P<0.01$, $n=3$ ανά δεξαμενή επέμβασης/αναπτυξιακού σταδίου και $n=2$ ανά δεξαμενή μάρτυρα/αναπτυξιακού σταδίου) (Εικόνα 3.2.2 και Εικόνα 3.2.3). Επισημαίνονται τα εξής:

α) Ο λόγος RNA/DNA και η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (G_{pr}) βρέθηκαν στατιστικώς σημαντικά (** $P<0.01$, $n=3$ για την επέμβαση και $n=2$ για το μάρτυρα) μεγαλύτερα στην επέμβαση έναντι του μάρτυρα την ημέρα 9 μετά την εκκόλαψη (Εικόνα 3.2.2 και Εικόνα 3.2.3).

β) Ο λόγος RNA/DNA και η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (G_{pr}) είχαν τάση να είναι περίπου ίσα ανάμεσα στην επέμβαση και το μάρτυρα την ημέρα 11 μετά την εκκόλαψη ($P>0.05$) (Εικόνα 3.2.2 και Εικόνα 3.2.3).

γ) Ο λόγος RNA/DNA και η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (G_{pr}) είχαν τάση να είναι μεγαλύτερα κατά περίπου 50% στην επέμβαση έναντι του μάρτυρα την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη ($P>0.05$) (Εικόνα 3.2.2 και Εικόνα 3.2.3).

δ) Στατιστικά σημαντικές διαφορές (** $P<0.01$, $n=3$) παρατηρήθηκαν επίσης αναφορικά με το λόγο RNA/DNA και την ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (G_{pr}), ανάμεσα στα αναπτυξιακά στάδια (ημέρες μετά την

εκκόλαψη, dph) της επέμβασης: α) Την ένατη (9 dph) έως την ενδέκατη (11 dph) ημέρα και β) ανάμεσα στην ενδέκατη (11 dph) ημέρα και την δέκατη τέταρτη (14 dph) (Εικόνα 3.2.2 και Εικόνα 3.2.3).

ε) Έως και την ημέρα 9 μετά την εκκόλαψη η επέμβαση είχε μεγαλύτερο διατροφικό δείκτη από το μάρτυρα (** $P < 0.01$) . Από την ημέρα 9 έως και την ημέρα 11 μετά την εκκόλαψη ο μάρτυρας είχε τάση να έχει περίπου 35% μείωση στο διατροφικό δείκτη (RNA/DNA) ενώ η επέμβαση είχε τάση να έχει περίπου 65% μείωση στο ρυθμό ανάπτυξης (RNA/DNA) (Εικόνα 3.2.2 και Εικόνα 3.2.3). Ωστόσο, τόσο ο λόγος RNA/DNA όσο και η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (Gpi) ήταν περίπου ίσα το συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο (11 dph). Από την ημέρα 11 μετά την εκκόλαψη έως και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη ο μάρτυρας είχε τάση περίπου 45% για αύξηση στο διατροφικό δείκτη (RNA/DNA) ενώ η επέμβαση είχε τάση περίπου 110% για αύξηση στο διατροφικό δείκτη (RNA/DNA) (Εικόνα 3.2.2 και Εικόνα 3.2.3). Φαίνεται ότι η τάση για μεγαλύτερο ρυθμό αύξησης στο διατροφικό δείκτη της επέμβασης έναντι του μάρτυρα έως και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη (Εικόνα 3.2.2) (αλλά πολύ πιθανά και σε μετέπειτα αναπτυξιακό στάδιο), φανερώνει την συμβολή του συμπληρώματος Se/I στο σιτηρέσιο, δεδομένου ότι δικαιολογείται να υπάρχει μια καθυστέρηση στα ευεργετικά αποτελέσματα στο διατροφικό δείκτη σε επίπεδο πρωτεϊνοσύνθεσης (όπως εξηγείται παρακάτω, §4.2.1 αλλά και από το διάγραμμα 3.2.1.), στις συγκεκριμένες συνθήκες του πειράματος (είδος ιχθύος, ποσότητα συμπληρώματος κλπ.) και στην περιορισμένη αυτή χρονική περίοδο της δειγματοληψίας.

στ) Για όλα τα παραπάνω, εκτός των περιπτώσεων στατιστικά σημαντικών διαφορών (** $P < 0.01$), φαίνεται ξεκάθαρα ότι αποτελούν

καταγεγραμμένες τάσεις βασιζόμενες κυρίως στους μέσους όρους, λαμβάνοντας υπόψη το στατιστικό σφάλμα του δείγματος. Επίσης εξήγηση της όποιας παραλλακτικότητας στα αποτελέσματα των μετρήσεων του δείκτη, δίνεται ουσιαστικά μέσω της φύσης του δείκτη RNA/DNA και της αναφοράς στη διεθνή βιβλιογραφία.

4.2.1 Ο λόγος RNA/DNA και η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (G_{pi}).

Ο λόγος RNA/DNA είναι ένας χρήσιμος δείκτης, ευρέως χρησιμοποιούμενος για την εκτίμηση της διατροφικής κατάστασης των ιχθυδίων (Clemmensen, 1993). Θεωρητικά ένα ιχθύδιο που καλύπτει τις διατροφικές απαιτήσεις του, αυξάνεται ταχέως με την αύξηση της συνολικής μυϊκής του μάζας. Αυτό συνδέεται με την αυξημένη σύνθεση RNA. Ενώ η περιεκτικότητα σε RNA δείχνει μεγάλη διακύμανση και εξάρτηση σε σχέση με τη διαθεσιμότητα της τροφής, η περιεκτικότητα DNA ανά κύτταρο δεν αλλάζει σημαντικά. Γίνεται η παραδοχή ότι κατά την ασιτία το περιεχόμενο DNA ανά κύτταρο διατηρείται αλλά το περιεχόμενο RNA ελαττώνεται (Alemany, 2003). Η % ημερήσια αύξηση της πρωτεΐνης προτάθηκε από τον Buckley (1984) και συναρτάται με το λόγο RNA/DNA και τη θερμοκρασία όπως φαίνεται και από τον τύπο:

$$\mathbf{G_{pi} = 0.93 * T + 4.75 * RNA/DNA - 18.18}$$

Όπου G_{pi} είναι η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης και T είναι η θερμοκρασία του νερού (σε βαθμούς κελσίου). Ο τύπος αυτός έχει ισχύ για θερμοκρασίες νερού μεταξύ 2 και 20 βαθμών κελσίου. Ο λόγος RNA/DNA επηρεάζεται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως τη θερμοκρασία και την πυκνότητα του ζωοπλαγκτού που χρησιμοποιείται ως σιτηρέσιο (Buckley, 1984) (στην παρούσα μελέτη η θερμοκρασία ήταν σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και η πυκνότητα των Τροχοζώων μέσα στη δεξαμενή ήταν σταθερή και ίδια

για όλες κατά την έναρξη των γευμάτων). Όταν ο λόγος RNA/DNA είναι μικρότερος του 1.5 τότε τα ιχθύδια βρίσκονται σε κατάσταση ασιτίας (Clemmensen, 1989). Για τα μεγαλύτερα ιχθύδια ισχύει ότι βρίσκονται σε φάση ασιτίας όταν ο λόγος είναι μικρότερος του 2.5. Να σημειωθεί ότι τα παραπάνω κριτήρια θεσπίστηκαν μελετώντας ιχθύδια ρέγγας (*Clupea harengus*). Η Clemmensen (1989) συμπέρανε ότι οι λόγοι RNA/DNA σε μικρότερα ηλικιακά ιχθύδια σε ασιτία ήταν αρκετά μικρότεροι σε σχέση με εκείνους, μεγαλύτερων ηλικιακά ιχθυδίων που βρίσκονταν και αυτά σε ασιτία. Συμπέρανε ότι ίσως τα μακρομόρια μεγαλύτερων οργανισμών να απαιτούν περισσότερο χρόνο για να αντιδράσουν σε μεταβολές στη διαθεσιμότητα της τροφής λόγω των μεγαλύτερων ενεργειακών αποθεμάτων που έχουν σε σχέση με τους μικρότερους ζωικούς οργανισμούς. Η Clemmensen (1994) καθιέρωσε τον αριθμό 1.2 ως κρίσιμο σημείο εκτίμησης του λόγου RNA/DNA για ιχθύδια ρέγγας μήκους 10 mm. Τα μεγαλύτερα ιχθύδια (14 dph) που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη για προσδιορισμό του λόγου RNA/DNA είχαν μέσο σταθερό μήκος 4.5-5 mm. Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το κρίσιμο σημείο εκτίμησης του λόγου RNA/DNA για τα ιχθύδια τσιπούρας της παρούσας μελέτης πρέπει να είναι αρκετά μικρότερο του 1.2. Σημαντικές διαφορές στο λόγο RNA/DNA ανάμεσα σε καλώς διατρεφόμενα ιχθύδια τσιπούρας και ιχθύδια σε ασιτία παρατηρήθηκαν μετά από 3 ημέρες ασιτίας (Faria et al., 2011). Οι Richard et al. (1991) διαπίστωσαν το ίδιο σε ιχθύδια *Solea solea*. Το συγκεκριμένο στοιχείο είναι σημαντικό διότι εάν αναμένονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στο λόγο του RNA/DNA, ανάμεσα σε ιχθύδια που είναι σε πλήρη ασιτία και σε ιχθύδια που διατρέφονται κανονικά, σε δειγματοληπτικό χρονικό διάστημα τουλάχιστον 3 ημερών τότε είναι σαφώς δυσκολότερο να αναμένονται στατιστικά σημαντικές διαφορές στο λόγο RNA/DNA σε μελέτες όπως την παρούσα όπου, ούτε ο μάρτυρας αλλά ούτε και η

επέμβαση δεν είναι σε πλήρη ασιτία αλλά διατρέφονται κανονικά. Όταν η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (GPI) είναι μικρότερη του μηδενός τότε τα ιχθύδια βρίσκονται σε φάση ασιτίας ενώ όταν είναι μικρότερη του 2 τότε βρίσκονται σε κακή διατροφική κατάσταση (Folkvord et al., 1996).

4.2.1.1 Χρόνος απόκρισης και λανθάνουσα φάση του λόγου RNA/DNA και της πρωτεΐνης.

Τόσο ο λόγος RNA/DNA όσο και η αύξηση της πρωτεΐνης περιγράφουν την κατάσταση των ιχθυδίων σε ένα χρονικό διάστημα προθύστερο της δειγματοληψίας. Υπάρχει δηλαδή μια λανθάνουσα φάση της τάξης των 1 έως 2 ημερών (Folkvord et al., 1996). Οι Houlihan et al. (1995) διαπίστωσαν ραγδαία αυξητική μεταβολή (5 έως 10 φορές), εντός περίπου 2 ωρών στο ποσοστό της πρωτεϊνοσύνθεσης (λόγω αύξησης της αποτελεσματικότητας του RNA) ιχθυδίων ρέγγας (*Clupea harengus*) που από τη φάση της ασιτίας μόλις είχαν εισέλθει σε φάση σίτισης. Οι Folkvord et al. (1996) συσχέτισαν την αύξηση του βάρους, την αύξηση του μήκους και της πρωτεΐνης ως προς τον χρόνο απόκρισης, για τον χρονικό προσδιορισμό λανθανουσών φάσεων μεταξύ των παραπάνω παραμέτρων. Βρήκαν ότι δυο πληθυσμοί ιχθυδίων ρέγγας είχαν ίσο ποσοστό αύξησης του ξηρού βάρους τους, 2 ημέρες πριν να έχουν ίσο ποσοστό αύξησης του μήκους. Οι δυο πληθυσμοί ιχθυδίων ρέγγας είχαν ίσο ποσοστό αύξησης της πρωτεΐνης, 1 έως 2 ημέρες μετά αφού είχαν ήδη ίσο ποσοστό αύξησης του μήκους. Η καθυστερημένη χρονική απόκριση της αύξησης της πρωτεΐνης και του μήκους σε σχέση με το βάρος αναμένεται σύμφωνα με τους Folkvord et al. (1996), αφού η αύξηση του βάρους συνδέεται πιο στενά με τη λήψη της τροφής. Μια μείωση του ξηρού βάρους θα φανερώσει μια περίοδο ασιτίας που όμως

τα ιχθύδια θα συνεχίσουν να μεγαλώνουν σε μήκος (φάση καθυστέρησης), για ένα μικρό όμως χρονικό διάστημα κατά την ασιτία.

4.2.1.2 Ο λόγος RNA/DNA και η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (Gpi) στην παρούσα μελέτη.

Η παρούσα μελέτη δεν έδειξε στατιστικά σημαντικές διαφορές ($P > 0.05$) στο λόγο RNA/DNA και στην ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης στα αναπτυξιακά στάδια 11 dph και 14 dph. Έδειξε στατιστικά σημαντική διαφορά ($**P < 0.01$) στο λόγο RNA/DNA και στην ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης στο αναπτυξιακό στάδιο 9 dph.

Υπήρξε παραλλακτικότητα στις τιμές. Η παρατηρούμενη παραλλακτικότητα μπορεί να οφείλεται στην πολύ άμεση μεταβολή των τιμών (Houlihan et al., 1995) του RNA ως απόκριση σε ενδεχόμενες ταχείες αλλαγές λίγο πριν τη δειγματοληψία και πολύ πιθανά στο μέγεθος του δείγματος, λαμβάνοντας υπόψη και το σφάλμα που έχει η επέμβαση του πειραματιστή. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να τονιστεί ότι τα δείγματα λαμβάνονταν το πρωί (7 ώρες μετά την κατανομή του τελευταίου τους γεύματος και 3 ώρες πριν το επόμενο) της ημέρας της δειγματοληψίας (δηλαδή ηλικιακά δεν είχαν ολοκληρώσει την ένατη, την ενδέκατη και τη δέκατη τέταρτη ημέρα αλλά μόλις τις διένυαν) (εντός δέκα λεπτών). Οι Richard et al. (1991) έκαναν δειγματοληψίες ιχθυδίων για προσδιορισμό του λόγου RNA/DNA νωρίς το πρωί και πριν τη χορήγηση σιτηρεσίου ώστε να ελαχιστοποιήσουν τις επιμολύνσεις από την τροφή που είχε καταναλωθεί την προηγούμενη ημέρα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω τα μεγαλύτερα ιχθύδια έχουν περισσότερα ενεργειακά αποθέματα στους ιστούς τους, το οποίο θα μπορούσε να εξηγήσει την αύξηση του λόγου RNA/DNA με το μέγεθος, καθιστώντας τα πιο ανεκτικά σε περιόδους ασιτίας και ακολούθως επηρεάζοντας το λόγο RNA/DNA (Clemmensen., 1989). Στην παρούσα μελέτη όπου δεν

έγινε προσδιορισμός του λόγου RNA/DNA ανά ιχθύδιο αλλά προέκυψε από το μέσο όρο αρκετά σημαντικού αριθμού ιχθυδίων, θα μπορούσε, λαμβάνοντας υπόψη την παραλλακτικότητα του λόγου RNA/DNA λόγω διαφορών στο μέγεθος, να έχει επηρεαστεί σε αυτά τα πολύ δυναμικά αναπτυξιακά στάδια. Αυτό πολύ χαρακτηριστικά φαίνεται στην Εικόνα 3.2.1 όπου δεν υπάρχει μια πραγματική γραμμική σχέση στο διατροφικό δείκτη (RNA:DNA) και την πρωτεΐνη (Gpi) ανά στάδιο ανάπτυξης και συγκλίνει περισσότερο σε πολυωνυμική. Ως εκ τούτου οι μεταβολές μεταξύ αυτών των σταδίων μεταξύ της αύξησης των ιχθυδίων (συναρτήσει του αναπτυξιακού σταδίου) και της πρωτεϊνοσύνθεσης (όπως μετράται με το δείκτη (RNA:DNA) δεν είναι ανάλογες. Επίσης, υπάρχει συσχέτιση όσον αφορά στην παραλλακτικότητα του μάρτυρα, ως προς το σταθερό μήκος, την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη, και αυτήν του μάρτυρα, ως προς το λόγο RNA/DNA, την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη. Ο μάρτυρας εμφανίζει μεγαλύτερη παραλλακτικότητα από την επέμβαση και στο λόγο Gpi την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη. Οι Richard et al. (1991) διαπίστωσαν μεγάλη παραλλακτικότητα στο λόγο RNA/DNA ανάμεσα σε ιχθύδια *Solea solea* που διατρέφονταν κανονικά. Μεγάλη παραλλακτικότητα επίσης στο λόγο RNA/DNA διαπίστωσαν και οι Garcia et al. (1998). Σε μερικές μελέτες όπως του Buckley (1984) δεν αναφέρεται η παραλλακτικότητα στους εκτιμώμενους λόγους RNA/DNA.

Για τον παρακάτω σχολιασμό των αποτελεσμάτων τονίζεται ότι για το δείκτη RNA/DNA το κρίσιμο όριο καλής διατροφικής κατάστασης αναμένεται να είναι αρκετά μικρότερο (λόγω πολύ μικρότερου μεγέθους των ιχθυδίων τσιπούρας που μελετήθηκαν) του 1.2 όπως η Clemmensen (1994) το προσδιόρισε για ιχθύδια ρέγγας μήκους 10 mm. Σύμφωνα με αυτό στην μελέτη μας, τόσο ο μάρτυρας όσο και η επέμβαση πληρούν κατά πολύ το παραπάνω κριτήριο καλής διατροφικής κατάστασης σε όλα

τα αναπτυξιακά στάδια που μελετήθηκαν. Λαμβάνοντας υπόψη το κριτήριο των Folkvord et al. (1996), τόσο ο μάρτυρας όσο και η επέμβαση πληρούν κατά πολύ το κριτήριο της καλής διατροφικής κατάστασης σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια, με βάση την πρωτεΐνη (Gpi). Είναι σαφές ότι τόσο ο μάρτυρας όσο και η επέμβαση βρίσκονταν σε ιδιαίτερος καλή διατροφική κατάσταση σε όλα τα μελετώμενα αναπτυξιακά στάδια.

Λόγω όλων των προαναφερθέντων παραγόντων που αυξάνουν την παραλλακτικότητα του δείκτη RNA/DNA (μέγεθος ιχθυδίων, σύντομος χρόνος απόκρισης RNA σε διατροφικές αλλαγές) συμπεραίνεται ότι απαιτείται περισσότερη έρευνα για την πλήρη κατανόηση της σημασίας του λόγου RNA/DNA για τα ιχθύδια τσιπούρας. Σημαντικό επίσης είναι να αναφερθεί είναι ότι ενδεχόμενος υπολογισμός της εκτίμησης της σύνθεσης του RNA ανά ιχθύδιο (larva) θα ανέλυε καλύτερα τις μεταβολές και θα εξέφραζε καλύτερα την πραγματική σχέση του διατροφικού δείκτη με το ρυθμό αύξησης των συγκεκριμένων ιχθυδίων, όπως έχει υιοθετηθεί από άλλους ερευνητές (Caldarone et al., 2003). Τούτο θα πρέπει να γίνει στο δικό μας πείραμα στο μέλλον για να έχουμε πληρέστερη εικόνα των μεταβολών αύξησης και την σχέση της με την πρωτεϊνοσύνθεση.

Την ημέρα 9 μετά την εκκόλαψη (κατά την έναρξη της) η επέμβαση είχε στατιστικώς σημαντικό (** $P < 0.01$) μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης (RNA/DNA) από το μάρτυρα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί η ημέρα 8 μετά την εκκόλαψη συμπίπτει σύμφωνα με τους Yuferra et al. (1993) με το «point of no return» για τα ιχθύδια τσιπούρας εκτρεφόμενα στους 19 βαθμούς κελσίου. Το «point of no return» σηματοδοτεί το χρονικό όριο πέρα από το οποίο επέρχεται ο θάνατος για τα ιχθύδια τσιπούρας που δεν διατρέφονται ικανοποιητικά. Την ημέρα 11 μετά την εκκόλαψη υπήρξε τάση για πτώση στο ρυθμό ανάπτυξης (RNA/DNA)

τόσο του μάρτυρα όσο και της επέμβασης, με την επέμβαση τελικά να έχει τάση για περίπου ίσο ρυθμό ανάπτυξης (RNA/DNA) με το μάρτυρα.

Τέλος, την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη υπήρξε τάση για αύξηση στο ρυθμό ανάπτυξης τόσο του μάρτυρα (45%) όσο και της επέμβασης (110%). Συνολικά μπορεί να διατυπωθεί ότι μέχρι και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη η επέμβαση είχε τάση για μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης από το μάρτυρα. Η στατιστικώς σημαντική διαφορά ($*P < 0.05$) που φαίνεται να έχει η επέμβαση με το μάρτυρα, ως προς το σταθερό μήκος (SL), την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη, με τα ιχθύδια της επέμβασης να είναι μεγαλύτερα από εκείνα του μάρτυρα, φαίνεται να δικαιολογείται από την καταγεγραμμένη τάση για μεγαλύτερο ρυθμό ανάπτυξης της επέμβασης έναντι του μάρτυρα έως και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη. Πρέπει να σημειωθεί εδώ ότι όσον αφορά στην ενέργεια, τα ιχθύδια τσιπούρας σε αυτά τα αναπτυξιακά στάδια επενδύουν το 35% περίπου της ενέργειας τους σε σωματική ανάπτυξη ενώ το 65% καταναλώνεται σε μεταβολικές διεργασίες (Parra & Yufera, 2001). Θα μπορούσε λοιπόν, ενδεχομένως, και λαμβάνοντας υπόψη και τα προαναφερθέντα (περί λανθάνουσας φάσης RNA και πρωτεϊνοσύνθεσης και χρόνου απόκρισης σε διατροφικές αλλαγές), να υπάρξει μια κατάσταση κατά την οποία αυξημένος λόγος RNA/DNA να μη συμπίπτει με αυξημένη σκελετική ανάπτυξη, λόγω χρήσης της ενέργειας και για επιτέλεση μεταβολικών λειτουργιών και όχι μόνο για σωματική ανάπτυξη. Οι Parra & Yufera, (2001) έδειξαν πτώση στο ρυθμό ανάπτυξης και στα ενεργειακά αποθέματα των ιχθυδίων της γλώσσας της Σενεγάλης (*Solea senegalensis*) κατά την αρχή της μεταμόρφωσης τους. Οι Richard et al. (1991) διαπίστωσαν μελετώντας ιχθύδια *Solea solea* ότι μετά τη μεταμόρφωση, το ξηρό βάρος και το περιεχόμενο RNA, DNA, και πρωτεΐνη ανά ιχθύδιο αυξάνονταν πιο αργά σε σχέση με την περίοδο πριν τη μεταμόρφωση. Ίσως λοιπόν σε περιόδους βιολογικών αλλαγών

και τα ιχθύδια τσιπούρας να εμφανίζουν μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και των ενεργειακών αποθεμάτων. Υπενθυμίζεται ότι σύμφωνα με FAO (1999) την ημέρα 15 μετά την εκκόλαψη συμβαίνουν σημαντικές, ενεργοβόρες ίσως, βιολογικές αλλαγές για τα ιχθύδια τσιπούρας (ολοκληρώνουν την διαδικασία πλήρωσης της νηκτικής κύστης με αέρα, το ουραίο πτερύγιο αρχίζει να αναπτύσσεται και το 100% του ελαιοσταγονιδίου απορροφάται). Υπενθυμίζεται επίσης, ότι στην παρούσα μελέτη, η διακύμανση του ρυθμού αναπτύξεως τόσο του μάρτυρα όσο και της επέμβασης πολύ κοντά στο προαναφερθέν κομβικό αναπτυξιακό στάδιο (15 dph), περιελάμβανε τα εξής:

α) Κατεγράφη αρχικά τάση (μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων 9 dph έως 11 dph) για μείωση του ρυθμού αναπτύξεως του μάρτυρα. Στατιστικώς σημαντική (** $P < 0.01$) μείωση του ρυθμού αναπτύξεως υπήρξε για την επέμβαση κατά το ίδιο αναπτυξιακό στάδιο.

β) Υπήρξε τάση (μεταξύ των αναπτυξιακών σταδίων 11 dph έως 14 dph) για αύξηση του ρυθμού αναπτύξεως του μάρτυρα. Στατιστικώς σημαντική (** $P < 0.01$) αύξηση του ρυθμού αναπτύξεως υπήρξε για την επέμβαση κατά το ίδιο αναπτυξιακό στάδιο. που όμως όπως έχει προαναφερθεί αντανακλά ένα προθύστερο πολύ πρόσφατο χρονικό διάστημα.

Ενδεχομένως η μείωση του ρυθμού αναπτύξεως από το στάδιο 9 dph έως 11 dph να αντανακλά ενεργειακή επένδυση των ιχθυδίων σε μεταβολικές λειτουργίες και όχι σε σωματική ανάπτυξη, που συνδέονται με επικείμενες μεταβολές για το επόμενο αναπτυξιακό στάδιο μετά την ημέρα 14, μετά την εκκόλαψη.

4.2.1.3. Ηλεκτροφορητική ανάλυση RNA, DNA.

Από την παρατήρηση των αποτελεσμάτων της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης στην Εικόνα 3.2.4, όπου στο πήκτωμα αγαρόζης φορτώθηκαν ίσοι όγκοι στην αραιώση (1:10) των δειγμάτων που μετρήθηκαν στο φασματοφωτόμετρο για την εκτίμηση των ολικών νουκλεϊκών οξέων, τεκμηριώνεται η παρατηρούμενη διακύμανση των ποσοτήτων που υπολογίστηκαν από την απορρόφηση των απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων (OD_{260}) με την φωτομέτρηση, για τον ίδιο όγκο των δειγμάτων (25 μ l). Αυτό γίνεται πιο καταφανές από την Εικόνα 3.2.6 της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης ίσων ποσοτήτων των δειγμάτων (~5 μ g), μετά την εκτίμηση από τον μέτρηση της απορρόφησης των απομονωμένων νουκλεϊκών οξέων (OD_{260}). Όπως φαίνεται και από την Εικόνα 3.2.6, δεν υπάρχει σημαντική διακύμανση στις ποσότητες που φορτώθηκαν στο πήκτωμα της αγαρόζης καθότι υπολογίστηκαν ίσες ποσότητες νουκλεϊκών οξέων από κάθε δείγμα με βάση την πρώτη φασματοφωτομέτρηση των ολικών νουκλεϊκών. Αυτό συνηγορεί υπέρ αυτής της προσέγγισης, ότι η πραγματοποιηθείσα μέτρηση είναι χωρίς σημαντικό σφάλμα, εκτός της ευαισθησίας που υπαγορεύει η παρούσα μεθοδολογία της προετοιμασίας των νουκλεϊκών και το ίδιο το φασματοφωτόμετρο. Η εκτίμησή μας αποτελεί εναλλακτικό τρόπο προσέγγισης ολικών νουκλεϊκών οξέων, DNA και RNA για την εκτίμηση του δείκτη RNA/DNA, χωρίς την άμεση φθορισμομέτρηση που απαιτεί ιδιαίτερο εργαστηριακό όργανο.

Δεδομένου ότι η ευαισθησία της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης με τον φθορισμό του βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide) σε πήκτωμα αγαρόζης για την εκτίμηση των νουκλεϊκών οξέων, είναι εφάμιλλη της μεθόδου του φθορισμομετρικού προσδιορισμού της περιεχομένης ποσότητας των RNA και DNA που έχει εφαρμοσθεί από διάφορους ερευνητές (Clemmensen, 1993; Chicaro et al., 1995), η δε ευαισθησία της

της ηλεκτροφορητικής ανάλυσης με τον φθορισμό του αιθιδίου, είτε είναι με οπτική εκτίμηση είτε με ανάλυση εικόνα, είναι περίπου της τάξης του 1-5 ng/ζώνη (όπου ζώνη αποτελεί μια ανεξάρτητη ζώνη ενός και μοναδικού προϊόντος συγκεκριμένου μεγέθους, σε βάσεις ή κιλοβάσεις (bp ή kb).

Επίσης απο την Εικόνα 3.2.5 καταδεικνύεται η απουσία του RNA μετά την ενζυμική επώαση με το ένζυμο της RNase A και η μέτρηση αυτή από τους υπολογισμούς δείχνει μόνο μικρότερες ποσότητες από το γενωμικό DNA ή θραύσματα δίκλωνου αλλά όχι μονόκλωνων νουκλεϊκών οξέων. Και στις τρεις Εικόνες (Εικόνα 3.2.4, Εικόνα 3.2.5 και Εικόνα 3.2.6) παρατηρείται η απουσία πρωτεΐνης λόγω της πρωταρχικής επέμβασης του ενζύμου της πρωτεϊνάσης (Proteinase K) που διαλυτοποίησε κάθε πεπτίδιο και αποβλήθηκε στο διαχωρισμό φάσεων με την εκχύλιση της φαινόλης και του χλωροφορμίου (phenol-chloroform). Αυτό έγινε προφανές και με την παρουσία των υψηλών λόγων OD_{260}/OD_{280} και OD_{260}/OD_{230} (που φανερώνουν την παρουσία ή όχι προσμίξεων πρωτεΐνης και πολυσακχαριτών ή άλλων, αντίστοιχα) στην αρχή του πειράματος. Οι λόγοι αυτοί αργότερα φθίνουν με την απομάκρυνση του RNA και την παρουσία του ενζύμου (RNase A) στο μίγμα της φωτομέτρησης όπου εκεί ενδέχεται να υπάρχει ένα μικρό σφάλμα.

Τέλος και από τα αποτελέσματα της καμπύλης αναφοράς επιβεβαιώνεται η ακρίβεια και ευαισθησία της μεθόδου μέτρησής μας, αν και απλούστερη, δεν είναι υποδεέστερη του άμεσου φθορισμομετρικού προσδιορισμού της περιεχομένης ποσότητας των RNA και DNA που έχει εφαρμοσθεί από άλλους ερευνητές (Clemmesen, 1993) και μπορεί να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά σε εργαστήριο για την μέτρηση του λόγου RNA/DNA ως διατροφικού δείκτη, χωρίς την χρήση φθορισμόμετρου.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η προσθήκη σεληνίου και ιωδίου στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων τσιπούρας (*Sparus aurata*) επηρέασε στατιστικώς σημαντικά ($*P < 0.05$) την αύξηση του σταθερού τους μήκος, με τα ιχθύδια που κατανάλωσαν Τροχόζωα εμπλουτισμένα με σελήνιο και ιώδιο έως και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη να είναι μεγαλύτερα έναντι εκείνων που δεν κατανάλωσαν Τροχόζωα εμπλουτισμένα με σελήνιο και ιώδιο.
- Η προσθήκη σεληνίου και ιωδίου στο σιτηρέσιο των ιχθυδίων τσιπούρας (*Sparus aurata*) δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά ($P > 0.05$) το ρυθμό ανάπτυξης (RNA/DNA, Gpi) μεταξύ των ιχθυδίων που κατανάλωσαν Τροχόζωα εμπλουτισμένα με σελήνιο και ιώδιο την ημέρα 11 μετά την εκκόλαψη και την ημέρα 14 μετά την εκκόλαψη και εκείνων που δεν κατανάλωσαν Τροχόζωα εμπλουτισμένα με σελήνιο και ιώδιο. Όμως ο λόγος RNA/DNA και η ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (Gpi) ήταν στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερα ($**P < 0.01$) στην επέμβαση έναντι του μάρτυρα, την ημέρα 9 μετά την εκκόλαψη.
- Στατιστικά σημαντικά διαφορές ($**P < 0.01$) παρατηρήθηκαν αναφορικά με το λόγο RNA/DNA και την ημερήσια % αύξηση της πρωτεΐνης (Gpi), ανάμεσα στα εξής αναπτυξιακά στάδια της επέμβασης: α) Την ένατη (9 dph) έως την ενδέκατη (11 dph) ημέρα και β) ανάμεσα στην ενδέκατη (11 dph) ημέρα και την δέκατη τέταρτη (14 dph).
- Η χρήση σεληνίου και ιωδίου ως συμπλήρωμα διατροφής είναι εφικτή και με χαμηλό κόστος για εμπορικούς ιχθυογεννητικούς σταθμούς. Απαιτείται όμως περαιτέρω έρευνα πάνω σε αυτό για την εφαρμογή του. Επισημαίνεται ότι είναι η πρώτη φορά στη

διεθνή βιβλιογραφία όπου εφαρμόζεται το συγκεκριμένο συμπλήρωμα διατροφής σε ιχθύδια τσιπούρας και σε τέτοια κλίμακα, επηρεάζοντας θετικά την ανάπτυξη τους. Τονίζεται ότι το σύνολο των ιχθυδίων των πειραματικών δεξαμενών αντιστοιχούσε δυνητικά σε περίπου 150 τόνους ιχθύων εμπορικού μεγέθους (περίπου 300g).

6. ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Alemaný I.A.C., 2003. Condition indices and their relationship with environmental factors in fish larvae. Thesis doctoral, University of Barcelona, Department of Ecology.

Attramadal Kari J.K., Tondel B., Salvesen I., Oie G., Vadstein O., Olsen Y., 2012. Ceramic clay reduces the load of organic matter and bacteria in marine fish larval culture tanks. *Aquacultural Engineering*, 49, 23-34.

Avila Enrique. M., Juario M., Jesus V., 1987. Yolk and oil globule utilization and developmental morphology of the digestive tract epithelium in larval rabbitfish, *Siganus guttatus* (Bloch). *Aquaculture*, 65, Issues 3–4, 319-331.

Bell J.G., Pirie B.J.S., Adron J.W. & Cowey C.B., 1986. Some effects of selenium deficiency on glutathione peroxidase (EC1.11.1.9) activity and tissue pathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *British Journal of Nutrition* , 55, 305-331.

Blanton M.L., Specker J.L., 2007. The Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis in Fish and Its Role in Fish Development and Reproduction. *Critical Reviews in Toxicology*, 37, 97–115.

Bristow B.T., Summerfelt R.C., 1994. Performance of Larval Walleye Cultured Intensively in Clear and Turbid Water. *Journal of the World Aquaculture Society*, 25, No 3, 454-464.

Buckley L.J., 1984. RNA-DNA ratio: an index of larval fish growth in fish. *Marine Biology*, 80, 291-298.

Buckley L.J., Caldarone, E., Ong, T.L. 1999. RNA-DNA ratio and other nucleic acid-based indicators for growth and condition of marine fishes. *Hydrobiology*, 401, 265-277.

Bulow J.F. 1970. RNA-DNA ratios as indicators of recent growth rates of fish. *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 27, 2343-2349.

Caldarone E.M., St. Onge-Burns J.M., Buckley L.J. 2003. Relationship of RNA/DNA ratio and temperature to growth in larvae of Atlantic cod *Gadus morhua*, *Marine Ecology. Progressive. Series*, 262, 229–240

Carr J.A., Patino R., 2011. The hypothalamus–pituitary–thyroid axis in teleosts and amphibians: Endocrine disruption and its consequences to natural populations. *General and Comparative Endocrinology*, 170, 299-312.

Chassaigne, H., Chéry, C.C., Bordin, G., Rodriguez, A.R., 2002. Development of new analytical methods for selenium speciation in selenium-enriched yeast material. *Journal of Chromatography A* 976, 409–422.

Chicharo, L & A, Chicharo., 1995. The DNA/RNA ratio as a useful indicator of the nutritional nutrition in juveniles of *Ruditapes decussatus*. *Marine Science*, 59, 95-101.

Clemmesen C., 1989. RNA/DNA ratios of laboratory-reared and wild herring larvae determined with a highly sensitive fluorescence method. *Journal of Fish Biology*, 35, 331-333.

Clemmesen C., 1993. Improvements in the fluorimetric determination of the RNA and DNA content of individual marine fish larvae. *Marine Ecology Progress Series*, 100, 177-183.

Clemmensen C., 1994. The effect of food availability, age or size on the RNA/DNA ratio of individually measured herring larvae. *Marine Biology*, 118, 377-382.

Colorni A., 1989. Pathology of marine warm water finfish in Israel : problems and research. *Advances in tropical aquaculture*, 9, 133-142.

Dabrowski K., 1984a. The feeding of fish larvae: «present state of art» and perspectives. *Reproduction. Nutrition. Development*, 24 (6), 807-833.

Divanach P & Kentouri M., 1983. Influence des conditions trophiques initiales sur la resorption des reserves lipidiques, la croissance et la survie des larves de daurades, *Sparus auratus*, en elevage extensif. *Aquaculture*, 35, 43-55.

Domeneghini C., R. Pannelli-Straini, and A. Veggetti., 1998. Gut glycoconjugates in *Sparus aurata L.* (Pisces, Teleostei). A comparative histochemical study in larval and adult ages. *Histology. Histopathology*, 13, 359-372.

Dhert P., Rombaut G., Suantika G., Sorgeloos P., 2001. Advancement of rotifer culture and manipulation techniques in Europe. *Aquaculture*, 200, 129–146.

Encinar JR., Sliwka-Kaszynska M., Polatajko A., Vacchina V., Szpunar J., 2003. Methodological advances for selenium speciation analysis in yeast. *Analytical Chimical Acta*, 500,171–183.

FAO., 1996. Manual on the production and use of live food for aquaculture. Rome

FAO., 1999. Manual on hatchery production of sea bass and gilthead sea bream. Rome

Faria A.M., Chicaro M.A., Gonsalves E.J., 2011. Effects of starvation on swimming performance and body condition of pre-settlement *Sparus aurata* larvae. *Aquatic Biology*,12, 281-289.

Folkvord A., Ystanes L., Johannessen A., Moksness E., 1996. RNA:DNA ratios and growth of herring (*Clupea harengus*) larvae reared in mesocosms. *Marine Biology*, 126, 591-602.

Garcia A., Cortes D., Ramirez T., 1998. Daily larval growth and RNA DNA content of the NW Mediterranean anchovy *Engraulis encrasicolus* and their relations to the environment. *Marine Ecology Progress Series*, 166, 237-245.

Hamre K., Opstad I., Espe M., Solbakken J., Hemre G-I., Pittman K ., 2002. Nutrient composition and metamorphosis success of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus, L.*) larvae fed natural zooplankton or Artemia. *Aquaculture Nutrition*, 8, 139–148.

Hamre K., Baeverfjord G., Harboe T ., 2005. Macronutrient composition of formulated diets for Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus, L.*) juveniles, II: protein / lipid levels at low carbohydrate. *Aquaculture*, 244, 283–291.

Hamre K., Holen E., Moren M., 2007. Pigmentation and eye migration in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus L.*) larvae: new findings and hypotheses. *Aquaculture Nutrition*, 13, 65–80.

Hamre K., Srivastava A., Rønnestad I., Mangor-Jensen A., Stoss J., 2008. Several micronutrients in the rotifer *Brachionus sp.* may not fulfill the nutritional requirements of marine fish larvae. *Aquaculture Nutrition*, 14, 51–60.

Hamre K., Yufera M., Rønnestad I., Boglione C., Conceicao L.E.C., Izquierdo M., 2013. Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. *Reviews in Aquaculture*, 5, 526-558.

Hawkyard M., Sæle O., Nordgreen A., Langdon C., Hamre K., 2011. Effect of iodine enrichment of *Artemia sp* on their nutritional value for larval zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture*, 316, 37–43.

Hodson, P. V., and J. W. Hilton., 1983. The nutritional requirements and toxicity to fish of dietary and waterborne selenium. *Environmental Biogeochemical Ecology (Stockholm)*,35, 335-340.

Holm-Hansen, O., Sutcliffe, W.H. Jr., Sharp, J. 1968. Measurement of the deoxyribonucleic acid in the ocean and its ecological significance. *Limnology and Oceanography*, 13, 507-514.

Houlihan D.F., Pedersen B.H., Steffensen J.F., Brechin J., 1995. Protein synthesis, growth and energetics in larval herring (*Clupea harengus*) at different feeding regimes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14, 195-208.

Kamisaka Y., Olderbakk Jordal Ann-Elise, Edvardsen Rolf Brudvik. , Kryvi H., Otterlei E., Rønnestad I., 2010. A case report on the distended gut syndrome (DGS) in cultured larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 309, 38-48.

Klaren P.H.M., Wunderink Y.S., Yufera M., Mancera J.M, Flik G., 2008. The thyroid gland and thyroid hormones in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) during early development and metamorphosis. *General and Comparative Endocrinology*,155, 686–694.

Kohrle J., Jakob F., Contempre B., Dumont J.E., 2005. Selenium, the Thyroid, and the Endocrine System. *Endocrine Reviews*, 26, 944–984.

Koumoundouros G., Kiriakos Z., Divanach P., Kentouri M., 1995. Morphometric relationships as criteria for the evaluation of larval quality of gilthead sea bream. *Aquaculture International*, 3, 143-149.

Mauguit Q., Gennotte V., Becco C., Baras E., Vandewalle N., Vandewalle P., 2010. Ontogeny of Swimming Movements in the Catfish *Clarias gariepinus*. *The Open Fish Science Journal*, 3, 16-29.

van der Meeren T., Olsen RE., Hamre K., Fyhn HJ., 2008. Biochemical composition of copepods for evaluation of feed quality in production of juvenile marine fish. *Aquaculture*, 274, 375–397.

Moren M., Opstad I., T.Van der Meeren., Hamre K., 2006. Iodine enrichment of Artemia and enhanced levels of iodine in Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus L.*) fed the enriched Artemia. *Aquaculture Nutrition*, 12, 97–102.

Moren M., Sloth J.J., Hamre, K., 2008. Uptake of iodide from water in Atlantic halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus L.*). *Aquaculture*, 285, 174-178.

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

NRC ., 2011. Nutrient Requirements of Fish and Shrimp. National Academic Press, Washington D.C.

Nordgreen A., Penglase S., Hamre K., 2013. Increasing the levels of the essential trace elements Se, Zn, Cu and Mn in rotifers (*Brachionus plicatilis*) used as live feed. *Aquaculture*, 380–383, 120–129.

Parra G., Yufera M., 2001. Comparative energetics during early development of two marine fish species, *Solea senegalensis* (Kaup) and *Sparus aurata* (L.). *The Journal of Experimental Biology*, 204, 2175–2183.

Pavlidis M.A and Mylonas C.C., 2011. Sparidae: Biology and aquaculture of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and other species. *Wiley-Blackwell Publication*, 2011.

Penglase S., Nordgreen A., Van der Meeren T., OlsviK P.A., Saele O., Sweetman J.W., Baeverfjord G., Helland S., Hamre K., 2010. Increasing the level of selenium in rotifers (*Brachionus plicatilis* ‘Cayman’) enhances the mRNA expression and activity of glutathione peroxidase in cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*, 306, 259-269.

Penglase S., Hamre K., Sweetman J.W., Nordgreen A., 2011. A new method to increase and maintain the concentration of selenium in rotifers (*Brachionus* spp.). *Aquaculture*, 315, 144-153.

Penglase S., Nordgenn A., Hamre K., 2012. The effects of increasing the level of Se, Zn and I in rotifers (*Brachionus plicatilis*) on cod (*Gadus morhua* L.) larvae reared under commercial conditions. Prosjekt 185006/S40 Vedlegg 12

Penglase S., Harboe T., Sæle Ø., Helland S., Nordgreen A., Hamre K., 2013. Iodine nutrition and toxicity in Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae. *PeerJ* 1:e20; DOI 10.7717/peerj.2

Polatajko A., Jakubowski N., Szpunar J., 2006. State of the art report of selenium speciation in biological samples. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 21, 639–654.

Poston H.A. & Combs G.F Jr., 1979. Interrelationships between requirements for dietary selenium, vitamin E and L-ascorbic acid by Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed a semi purified diet. *Fish Health News*, 84,6-7.

Power D.M., Liewellyn L., Faustino M., Nowell M.A., Bjornsson B.Th., Einarsdottir I.E., Canario A.V.M., Sweeney G.E., 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 130, 447- 459.

Ribeiro A.A., Ribeiro L., Dinis M.T., Moren M., 2011. Protocol to enrich rotifers (*Brachionus plicatilis*) with iodine and selenium. *Aquaculture Research*, 42, 1737-1740.

Ribeiro A.R.A., Ribeiro L., Sale O., 2012. Iodine and selenium supplementation increased survival and changed thyroid hormone status in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in a recirculation system. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 725–734.

Richard P., Bergeron J.P., Boulhic M., Galois R., Person – le Ruyet J., 1991. Effect of starvation on RNA, DNA and protein content of laboratory – reared larvae and juveniles of *Solea solea*. *Marine Ecology Progress Series*, 72, 69-77.

Rønnestad I., Koven W.M., Tandler A., Harel M., Fyhn H.J., 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Marine Biology*, 120, 187-196.

Rønnestad I., Finn R N., Lein I., Lie Ø., 1995. Compartmental changes in the contents of total lipid, lipid classes and their associated fatty acids in developing yolk-sac larvae of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.). *Aquaculture Nutrition* ,1, 119–130.

Srivastava A., Hamre K., Stoss J., Chakrabarti R., Tonheim SK., 2006. Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): with emphasis on the water soluble fraction. *Aquaculture*, 254, 534–543.

Schrauzer G.N., 2006. Selenium yeast: composition, quality, analysis and safety. *Pure Applied Chemistry*, 78, 105-109.

Yen., 2001. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiological reviews*, 81, No 3.

Yúfera M., E Pascual., A. Polo & M. C. Sarasquete., 1993. Effect of starvation on the feeding ability of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.)

larvae at first feeding. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 169, 259-272.

Watanabe T., Kiron V., Satoh S., 1997. Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151, 185-207.

Zambonino Infante J.L., Gisbert E., Sarasquete C., Navarro I., Gutierrez J., Cahu C.L., 2008. Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. *Feeding and digestive functions of fishes*, 281-348.

Κλημογιάννη Α., 2004. Μελέτη της οντογένεσης του λυθρινιού (*Pagellus erythrinus* L. 1758) και επίδραση της θερμοκρασίας στα επιμέρους ανάπτυξιακά στάδια σε συνθήκες εντατικής εκτροφής. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών.

Παπουτσόγλου Σ.Ε., 2008. Διατροφή ιχθύων. Εκδόσεις Σταμούλη