

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και
Υδατοκαλλιεργειών
Εργαστήριο Εφαρμοσμένης Υδροβιολογίας
Π.Μ.Σ. Εκτροφή Υδρόβιων Οργανισμών

Διερεύνηση της ικανότητας μάθησης του
Ευρωπαϊκού λαβρακιού (*Dicentrarchus
labrax*) και της έκφρασης σχετικών γονιδίων
του εγκεφάλου

Διάκος Εμμανουήλ

ΑΘΗΝΑ 2015

Τριμελής επιτροπή

Καρακατσούλη Ναυσικά	Επίκουρος καθηγητής
Μήλιου Ελένη	Αναπληρωτής καθηγητής
Χάγιερ Αριάδνη	Επίκουρος καθηγητής

Περίληψη

Η ευζωία, αφορά την εξασφάλιση της καλής ποιότητας ζωής των ζώων και προϋποθέτει την ύπαρξη γνωστικών ικανοτήτων που επιτρέπουν την αξιολόγηση της. Τα περισσότερα σπονδυλωτά διαθέτουν γνωστικές ικανότητες και το ίδιο έχει αποδειχτεί τα τελευταία χρόνια για τους ιχθύς. Η μάθηση, συντελείται στον εγκέφαλο των σπονδυλωτών, αποτελεί βασική γνωστική ικανότητα και αφορά μια μόνιμη αλλαγή των δεξιοτήτων ή της εκδήλωσης συγκεκριμένης συμπεριφοράς που προκύπτει από την εμπειρία. Οι ιχθύς διαφέρουν ως προς τον σχηματισμό του εγκεφάλου τους καθώς στερούνται νεοφλοιοί και μεταιχμιακό σύστημα (ιπόκαμπος, αμυγδαλή), περιοχές του εγκεφάλου θηλαστικών που εμπλέκονται στη μάθηση και τη μνήμη. Παρόλα αυτά έχουν παρατηρηθεί ομόλογα τμήματα του εγκεφάλου τους και συγκεκριμένα του πρόσθιου τμήματος που καλείται τελεγκεφάλος με τον ιπόκαμπο και την αμυγδαλή. Η συνειρμική μάθηση, η μνήμη, η πλοήγηση, ο προσανατολισμός, η συνεργασία, η διάθεση αναπαραγωγής, η «επικοινωνία» θεωρούνται ικανότητες των ιχθύων στις οποίες εμπλέκεται ο ρόλος του τελεγκεφάλου. Σε μοριακό επίπεδο οι παραπάνω ικανότητες και εξελικτικές προσαρμογές συντελούνται βάσει της έκφρασης γονιδίων. Μια συγκεκριμένη κατηγορία γονιδίων που προτείνεται ότι εμπλέκεται στην αντίδραση σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος, ως η «πρώτη γραμμή» έκφρασης, είναι τα πρόωμης έκφρασης γονίδια (Immediate early genes). Τα γονίδια αυτά έχουν παρατηρηθεί στον εγκέφαλο θηλαστικών, στην περιοχή του ιπόκαμπου της αμυγδαλής, αλλά και στους εγκεφάλους πτηνών, ερπετών, τρωκτικών και ιχθύων. Στην παρούσα μελέτη έγινε διερεύνηση της ικανότητας μάθησης 92 ατόμων ευρωπαϊκού λαβρακιού σε κατάλληλα διαμορφωμένο λαβύρινθο και ποσοτικοποιήθηκε, με χρήση ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (qPCR), η έκφραση 2 γονιδίων πρόωμης έκφρασης, *egr-1* και *c-fos* που εμπλέκονται στη χωρική μάθηση, στη μνήμη και σε άλλες λειτουργίες. Έγιναν 2 εκπαιδεύσεις μια 8ήμερη και μια 3ήμερη, με 3 δοκιμές ανά ημέρα και χρησιμοποιήθηκε ως οπτικό ερέθισμα ένα λευκό σημάδι που οδηγούσε το άτομο προς εξέταση στο σωστό θάλαμο του λαβυρίνθου. Σαν επιβράβευση (θετική ενίσχυση) σε κάθε επιτυχημένη δοκιμή, χορηγήθηκε στο άτομο τροφή ενώ υπήρχε και ομοειδές άτομο πίσω από διαφανές τοίχωμα. Τα άτομα που εξετάστηκαν διαχωρίστηκαν σε 3 κατηγορίες: Τα άτομα που τηρούσαν το κριτήριο επιτυχίας (M) και έμαθαν, τα άτομα που δεν έκαναν καμία επιτυχημένη προσπάθεια (ΔM) και τα άτομα που παρόλο που έκαναν επιτυχημένες προσπάθειες δεν τηρούσαν το κριτήριο επιτυχίας (M?). Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων *egr-1* και *c-fos* έγινε για τα άτομα M και ΔM. Τα άτομα M της 8ήμερης εκπαίδευσης, έμαθαν μετά από 8-9 δοκιμές και είχαν μέσο χρόνο επιτυχημένης εισόδου 12 λεπτά που αποτελούσε και τον μικρότερο χρόνο από τα άτομα M? και ΔM. Τα

άτομα Μ της 3ήμερης εκπαίδευσης έμαθαν μετά από 4-6 δοκιμές και είχαν μέσο χρόνο επιτυχημένης εισόδου ~17 λεπτά. Την τελευταία ημέρα (ημέρα δειγματοληψίας) τα άτομα Μ είχαν τους καλύτερους χρόνους συγκριτικά με τους ΔΜ και Μ? και για τις 2 περιόδους εκπαίδευσης. Η σχετική έκφραση των *egr-1* και *c-fos* ήταν σημαντικά αυξημένη στα Μ συγκριτικά με τα ΔΜ και στις 2 περιόδους εκπαίδευσης. Η ανάλυση παραλλακτικότητας έδειξε ότι η σχετική έκφραση και των 2 γονιδίων των ατόμων Μ ήταν μεγαλύτερη στον τελεγκέφαλο στην συνέχεια στον υποθάλαμο – υπόφυση και τέλος στον λοιπό εγκέφαλο. Κατά την 8ήμερη εκπαίδευση η έκφραση του *c-fos* στον τελεγκέφαλο ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα άτομα Μ συγκριτικά με τα ΔΜ ενώ κατά την 3ήμερη εκπαίδευση τόσο η έκφραση των *c-fos* και *egr-1* στον τελεγκέφαλο ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα άτομα Μ συγκριτικά με τα άτομα ΔΜ. Παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ των 2 γονιδίων, ισχυρότερη στον τελεγκέφαλο. Οι αρνητικές συσχετίσεις, μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων και του μέσου χρόνου επιτυχίας αλλά και του μέσου χρόνου δοκιμών, που παρατηρήθηκαν την τελευταία ημέρα υποδηλώνουν την εμπλοκή των γονιδίων αυτών στην διαδικασία μάθησης.

Λέξεις κλειδιά: εξαρτημένη μάθηση, *c-fos*, *egr-1*, τελεγκέφαλος, γνωστικές ικανότητες

Summary

The term “welfare” stands for animals’ good quality of life. The evaluation of welfare demands cognitive abilities which most vertebrates possess. The same applies for fish. Learning takes place in the brain and is a cognitive ability for permanent changes as well as behavioural responses that emerge from experience. Learning and memory evolve in the regions of the mammalian brain called neocortex and limbic system hippocampus, amygdala. Although fish brain differs morphologically from other vertebrates lacking neocortex and limbic system, there are homologies between those regions and the forebrain area of telencephalon. The latter is involved in cognitive processes such as associate learning, memory, imprinting, navigation, cooperation, reproduction and social behaviour. At the molecular level, the above mentioned skills and evolutionary adaptations occur in the basis of the expression of several genes. As a response to environmental stimuli there is a particular group of genes called immediate early genes (IEGs) which have been observed to be expressed in the brain of birds, reptiles, rodents and fish as well as in the areas of hippocampus and amygdala of the mammalian brain. In this study, 92 specimens of European seabass were trained in a maze as an investigation of their learning ability. The expression of two specific IEGs, *egr-1* and *c-fos* which are involved in the processes of learning and memory was measured with real time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). There were two training sessions (an 8-day and a 3-day) with 3 trials per day using a white visual cue as an optical stimulus for each specimen individually, indicating the correct chamber of the maze. When the specimen entered the correct chamber of the maze, a congener was seen through a transparent wall and food was delivered as a reward. The fish tested were categorized in 3 distinct groups according to their performance, the first which learned the task (L), the second which never succeeded (NL) and the third which made a few correct entrances but with no repetition (L?). Specimens belonging to L and NL groups were analyzed for *egr-1* and *c-fos* expression. During the 8-day training session, the group L differed from L? and NL as it had an average time of 12 minutes for the correct entry after 8-9 trials. The same group learned after 4-6 trials having an average time of ~17 minutes during the 3-day training session meeting the learning criteria. Overall, in the last day (day of sampling) the group L had the best times in comparison with the other two (L? and NL). In addition, the expression of *egr-1* and *c-fos* was significantly higher in the L group compared to the NL group. ANOVA analysis showed the highest expression of the L group in the telencephalon, second higher in the hypothalamus-pituitary gland and third higher in the rest of the brain. In the 8-day training session the expression of *c-fos* in the telencephalon was

statistically higher in the L group than the NL group. In the 3-day session the expression of both genes in the telencephalon was significantly higher in the L group than the NL. There was a positive correlation between the expression of the two genes, stronger in the telencephalon. Finally, the negative correlations between the expression of both genes and the average time of correct entries and the average time of trials in the last day, indicate the involvement of both genes in the learning process.

Keywords: conditional learning, c-fos, egr-1, telencephalon, cognitive abilities

Δήλωση Έργου

Ο/Η κάτωθι υπογεγραμμένος/η, (ΠΛΗΡΕΣ ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ) δηλώνω ότι το κείμενο της μελέτης αποτελεί δικό μου, μη υποβοηθούμενο πόνημα. Υποβάλλεται σε μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην (ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΜΔΕ) του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Δεν έχει υποβληθεί ποτέ πριν για οιοδήποτε λόγο ή για εξέταση σε οποιοδήποτε άλλο πανεπιστήμιο ή εκπαιδευτικό ίδρυμα της χώρας ή του εξωτερικού.

.....
(ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ)

.....
(ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ)
(Ημέρα, μήνας, έτος)

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην εκπόνηση της μεταπτυχιακής μου εργασίας και κυρίως στην επιβλέπουσα καθηγήτρια μου Κυρία Καρακατσούλη Ναυσικά για τη συνεχή καθοδήγηση, την υποστήριξη, τις συμβουλές, καθώς και την αδιάκοπη συμπαράσταση και ενθάρρυνση που μου παρείχε σε όλο αυτό το διάστημα. Στη συνέχεια θα ήθελα εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη του Εργαστηρίου Εφηρμοσμένης Υδροβιολογίας, ιδιαίτερα στην Κυρία Μπατζίνα Άλκηστη και στις Κυρίες Μήλιου Ελένη και Χάγιερ Αριάδνη για την συμπαράσταση τους. Επίσης ευχαριστώ θερμά τα μέλη του Εργαστηρίου Γενικής και Ειδικής Ζωοτεχνίας και κυρίως τον Θεοδώρου Γιώργο για την υποστήριξη, τη βοήθεια και τις συμβουλές που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της μελέτης μου.

Πίνακας Περιεχομένων

1.Εισαγωγή.....	10
1.1Μάθηση.....	10
1.2 Κατηγορίες μάθησης.....	10
1.2.1 Συνειρμική μάθηση.....	10
1.2.1.1 Κλασική εξαρτημένη μάθηση.....	10
1.2.1.2 Συντελεστική Εξαρτημένη μάθηση (instrumental - operant conditioning).....	11
1.2.2 Χώρο-χρονική μάθηση.....	11
1.2.3 Κοινωνική μορφή μάθησης.....	11
1.3 Μνήμη.....	12
1.4 Γνωστικές ικανότητες – Επιβίωση.....	12
1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την μάθηση.....	16
1.6 Η μάθηση συντελείται στον εγκέφαλο.....	17
1.6.1 Μεταιχμιακό σύστημα (Ιππόκαμπος – αμυγδαλή).....	17
1.6.2 Τελεγκέφαλος ιχθύων.....	19
1.6.2.1 Ομολογίες τελεγκεφάλου ιχθύων με αμυγδαλή και ιππόκαμπο.....	20
1.7 Λαβύρινθοι.....	22
1.8 Είδη θετικών (επιβράβευση) ή αρνητικών (‘τιμωρία’).....	23
ερεθισμάτων για την μελέτη της ικανότητας μάθησης	
1.9 Πρακτική αξιοποίηση της ικανότητας μάθησης των ιχθύων στις εκτροφές.....	24
1.10 Μάθηση – έκφραση γονιδίων.....	25
1.11 Πρώιμης Έκφρασης Γονίδια (IEGs).....	26
1.11.1 Egr-1.....	27

1.11.1.1 Egr-1 σπονδυλωτών (όχι ιχθύων).....	27
1.11.1.2 Egr-1 στους ιχθύς.....	28
1.11.2 c-fos.....	29
2. Υλικά και μέθοδοι.....	31
2.1 Ιχθύες.....	31
2.2 Πειραματική διαδικασία εκπαίδευσης.....	31
2.2.1 Λαβύρινθος.....	32
2.2.2 Διαδικασία εκπαίδευσης.....	33
2.3 Δειγματοληψία εγκεφάλου.....	36
2.4 Σχετική έκφραση γονιδίων.....	36
2.5 Απομόνωση ολικού RNA.....	36
2.5.1 Απομάκρυνση γενωματικού DNA.....	37
2.5.2 Αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA.....	37
2.5.3 Σχεδιασμός εκκινήτων.....	38
2.5.4 Ποσοτική Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (qPCR).....	38
2.6 Στατιστική ανάλυση.....	39
3. Αποτελέσματα εκπαίδευσης – μάθησης.....	40
3.1 8ήμερη εκπαίδευση.....	40
3.2 3ήμερη εκπαίδευση.....	45
3.3 Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων egr-1 και c-fos.....	48
4. Συζήτηση.....	52
5. Βιβλιογραφία.....	58

1. Εισαγωγή

1.1 Μάθηση

Ο γενικότερος όρος της μάθησης στα ζώα σχετίζεται με μια μόνιμη αλλαγή στη συμπεριφορά τους που οφείλεται σε κάποια αλληλεπίδραση με το περιβάλλον τους. Οι ερευνητές που ασχολούνται με τη μελέτη της συμπεριφοράς θεωρούν ότι διαπλάθεται βάσει ερεθισμάτων του περιβάλλοντος κατά την ανάπτυξη ενός οργανισμού. Η γνωστική ικανότητα – μάθηση στα ζώα, είναι η διαδικασία κατά την οποία προσλαμβάνουν, επεξεργάζονται, αποθηκεύουν και ενεργούν βάσει πληροφοριών που έχουν συλλέξει από το περιβάλλον τους (Shettleworth 2010). Η μάθηση επιτρέπει στα ζώα να μπορούν να προσαρμοστούν σε μεταβαλλόμενες συνθήκες και να τροποποιούν αντίστοιχα τη συμπεριφορά τους ώστε να μπορούν να ανταπεξέλθουν στις απαιτήσεις του περιβάλλοντός τους (Girvan and Braithwaite, 1998). Η αντίδραση που επαναλαμβάνεται στα εκάστοτε ερεθίσματα του περιβάλλοντος συνιστά τη μάθηση. Η έννοια της αντίληψης του χώρου και η ικανότητα της μάθησης και της απομνημόνευσης πληροφοριών αποτελεί σημαντικό παράγοντα για την επιβίωση και αυτό γιατί η τροφή, η φωλιά, η περιοχή του ζευγαρώματος μπορεί να αποτελούν απομακρυσμένα μεταξύ τους σημεία (Μπιζέλης). Η μάθηση διακρίνεται σε 3 φάσεις. Η 1^η φάση αποτελείται από την αντίληψη της πληροφορίας μέσω ενός αισθητήριου οργάνου. Κατά τη 2^η φάση το ζώο επεξεργάζεται την πληροφορία και κατά την 3^η φάση την απομνημονεύει με δυνατότητα ανάκτησης της στο μέλλον.

1.2 Κατηγορίες μάθησης

1.2.1 Συνειρμική μάθηση

Αποτελείται από 2 μορφές την *κλασική εξαρτημένη μάθηση* (classical conditioning) και την *συντελεστική εξαρτημένη μάθηση* (instrumental – operant conditioning)

1.2.1.1 Κλασική εξαρτημένη μάθηση

Η κλασική εξαρτημένη μάθηση αφορά τη συσχέτιση 2 ερεθισμάτων, που συμβαίνουν ταυτόχρονα, με μια συγκεκριμένη ανταπόκριση. Συνέπεια, η ανταπόκριση που οφείλεται στο ένα ερέθισμα γίνεται κοινή και για το 2^ο ξεχωριστά. Στο πείραμα του Pavlov, το **φυσικό (unconditioned) ερέθισμα** για το σκύλο του ήταν η τροφή. Η **αντανακλαστική αντίδραση** του σκύλου στη θέα της τροφής ήταν η έκκριση σιέλου. Το **ουδέτερο ερέθισμα** ήχος δεν προκαλεί την αντίδραση έκκριση σιέλου. Με την επαναλαμβανόμενη όμως και ταυτόχρονη

παρουσίαση του φυσικού και του ουδέτερου ερεθίσματος, ο Pavlov πέτυχε την αντίδραση έκκρισης σιέλου ως αποτέλεσμα του ουδέτερου ερεθίσματος-ήχου. Το ουδέτερο ερέθισμα έγινε **εξαρτημένο ερέθισμα** και η αντίδραση του σκύλου **εξαρτημένη αντίδραση**. Ο σκύλος έμαθε να αντιδρά στο ουδέτερο αρχικά ερέθισμα με μια εξαρτημένη αντίδραση. Τα ζώα έχουν επίσης την ικανότητα να συσχετίζουν ένα γεγονός, μια πράξη, ένα χώρο, ένα άτομο ή ένα πράγμα με κάποια συνέπεια ευχάριστη ή δυσάρεστη.

1.2.1.2 Συντελεστική Εξαρτημένη μάθηση (instrumental - operant conditioning)

Σε αυτή την περίπτωση η επιβράβευση έρχεται μετά την πραγματοποίηση κάποιας ενέργειας, για παράδειγμα με το σπρώξιμο κάποιου μοχλού χορηγείται μέσω ενός μηχανισμού τροφή. Η ενέργεια της κίνησης του μοχλού με την παροχή τροφής αποτελεί παράδειγμα έκφρασης μιας συμπεριφοράς που ενισχύεται θετικά με την τροφή ως επιβράβευση (Braithwaite and Salvanes, 2008). Έρευνες έχουν δείξει ότι τα περισσότερα είδη ζώων, είναι πιθανότερο να μάθουν, και να επαναλάβουν, πράξεις που έχουν ως αποτέλεσμα την ικανοποίηση των προσωπικών τους αναγκών. Βάσει της επιβράβευσης, οι ερευνητές επιτυγχάνουν αυτή τη συγκεκριμένη μορφή μάθησης. Μια συμπεριφορά θα συνδεθεί με κάποια συνέπεια θετική ή αρνητική (Μπιζέλης).

1.2.2 Χώρο – χρονική μάθηση.

Βασίζεται στη μνήμη σχετικά με ένα γεγονός που λαμβάνει χώρα σε ένα συγκεκριμένο σημείο ή περιοχή. Εργαστηριακά έχει ερευνηθεί και η περίπτωση ιχθύων σε ενυδρείο, που θυμούνται το άτομο που τους χορηγεί την τροφή, τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή της ημέρας, αλλά και το σημείο του ενυδρείου στο οποίο εμφανίζεται συχνότερα η τροφή (Brown, 2014).

1.2.3 Κοινωνική μορφή μάθησης

Η κοινωνική μάθηση αποτελεί τη μορφή μάθησης όπου μια πληροφορία περνάει απ το ένα άτομο στο άλλο μέσω της παρατήρησης ή της αλληλεπίδρασης (Brown, 2014). Αυτή η μορφή μάθησης προϋποθέτει υψηλές γνωστικές ικανότητες από τα είδη. Η μίμηση κοινωνικών προτύπων αποτελεί μια κοινότυπη διαδικασία για τα νεαρά άτομα και σχετίζεται με ταχύτερη απόκτηση νέων δεξιοτήτων (Brown, 2014). Επί προσθέτως, αυτή η μορφή μάθησης ιδιαίτερα στον άνθρωπο, σχετίστηκε με την ανάπτυξη κουλτούρας – παράδοσης και επίσης λόγω της

αθροιστικής συλλογής πληροφοριών, ανά τις γενεές, οδήγησε στην τεχνολογική ανέλιξη του σύγχρονου κόσμου.

Όταν μια πληροφορία προέρχεται από ένα κοινωνικό σύνολο, τότε οποιαδήποτε μάθηση που συντελείται βάσει της πληροφορίας αυτής λέγεται κοινωνική. Πιο συγκεκριμένα σχετίζεται με την υιοθέτηση μιας νέας συμπεριφοράς ή πληροφορίας για το περιβάλλον, που προέρχεται από την παρατήρηση, είτε την αλληλεπίδραση με άλλα ζώα (Brown and Laland, 2011).

1.3 Μνήμη

Η μνήμη διακρίνεται σε έκδηλη και άδηλη (Σαράντης, 2010). Η έκδηλη μνήμη σχετίζεται με γεγονότα που συμβαίνουν στη ζωή και απαιτείται συνειδητή γνωστική επεξεργασία. Ο υπόκαμπος αποτελεί δομή υπεύθυνη για τη διαμόρφωση της έκδηλης μνήμης. Άδηλη είναι η μνήμη που βασίζεται σε συνήθειες ή εμπειρίες και δεν προϋποθέτει συνειδητή γνωστική επεξεργασία, δηλαδή για ενέργειες που γίνονται ασυναίσθητα και αποτελούν ενστικτώδεις αντιδράσεις. Για το τμήμα της άδηλης μνήμης εμπλέκεται κυρίως η δομή του εγκεφάλου που λέγεται αμυγδαλή (Σαράντης, 2010). Η άδηλη μνήμη καλείται και συνεπαγόμενη (implicit memory) (Bear *et al.*, 2001) και αφορά αντανακλαστικές συμπεριφορές, εκφράζεται στην αμυγδαλή και στην παρεγκεφαλίδα και έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη ζώων κυρίως σε καταστάσεις φόβου (Krebs, 1989, Portavella *et al.*, 2004, Saito & Watanabe, 2004, 2006, Vargas *et al.*, 2009)

1.4 Γνωστικές ικανότητες - Επιβίωση

Η ανάγκη για επιβίωση, καθιστά αναγκαία την ύπαρξη μνήμης και γνωστικών ικανοτήτων στους ιχθύς. Η επιβίωση εκφράζεται με μια σειρά πολλαπλών και πολύπλοκων διαδικασιών όπως η ανάγκη για αναπαραγωγή, εύρεση τροφής, εύρεση καταφυγίου και αποφυγή θηρευτών. Οι ιχθύς διαθέτουν γνωστικές ικανότητες και σε αυτό οφείλεται και η δυνατότητα τους να εξερευνούν και να βρίσκουν αποτελεσματικά πόρους που εξασφαλίζουν την επιβίωσή τους (Hart *et al.*, 1994, Noda *et al.*, 1994). Η επιβίωση από θηρευτές αποτελεί γνωστική ικανότητα των ιχθύων (Brown, 2003) ενώ η απόδραση από μια κατάσταση θήρευσης και το κρύψιμο σε καταφύγιο μπορεί να αποτελεί απόρροια της μνήμης που διαθέτουν (Aronson, 1971, Markel, 1994, Odling-Smee *et al.*, 2006).

Αρχικά, οι ερευνητές της ηθολογίας ήταν υπέρ της άποψης ότι οι κινήσεις των ιχθύων είναι αντανακλαστικές και αντιδρούν βάσει της έκθεσης τους σε ορισμένα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Παράλληλα οι ιχθύες αποτελούν μια από τις αρχαιότερες ομάδες. Κατά τη διάρκεια της ιστορίας εξελίχθηκαν σε διάφορες μορφές και σχήματα και διαφοροποιήθηκαν. Σήμερα έχει ανευρεθεί αριθμός ειδών > 32000, ο οποίος εξελίσσοντας κατάλληλες προσαρμογές έχει αξιοποιήσει κάθε υδάτινο οικοσύστημα στον πλανήτη (Brown, 2014). Παρόλο που το θαλάσσιο υδάτινο μέσο θεωρείται σχετικά σταθερό και ομοιογενές, περιοδικά λόγω ραγδαίων αλλαγών, στα διάφορα ενδιαίτηματα, προκαλείται μετανάστευση ορισμένων ειδών, ενώ ανεξάρτητα υπάρχουν ανάδρομα και κατάδρομα είδη που μεταναστεύουν κατά τον κύκλο ζωής του. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα είδη έρχονται αντιμέτωπα με νέους περιβαλλοντικούς παράγοντες, νέες κοινωνικές σχέσεις, τοπογραφικές και υδρογραφικές αλλαγές, νέους θηρευτές και νέα θηράματα. Οι ιχθύες, που μπορούν ταχύτερα να προσαρμοστούν στις αλλαγές αυτές και να αναπτύξουν την κατάλληλη συμπεριφορά, έχουν και τη μεγαλύτερη πιθανότητα επιβίωσης (Braithwaite and Salvanes, 2008). Το θέμα της μάθησης στους ιχθύς έχει ραγδαίως αποτελέσει πόλο έλξης των επιστημόνων τις τελευταίες δεκαετίες ενώ συνεχώς δημοσιεύονται πληθώρα επιστημονικών εργασιών (Laland *et al.*, 2003). Οι ερευνητές έχουν καταλήξει ότι οι ιχθύες παρουσιάζουν μια εξελιγμένη, πλούσια, συμπεριφορά. Ο ρόλος της μάθησης, όπως σε όλα τα σπονδυλωτά, έτσι και στους ιχθύς, είναι σημαντικός στην εξέλιξη της συμπεριφοράς (Brown *et al.*, 1983).

Οι διαδικασίες της μνήμης και της μάθησης συμβάλουν σε μεγάλο βαθμό στην ικανότητα προσανατολισμού. Είδη ιχθύων μπορούν να διανύσουν μεγάλες αποστάσεις ώστε να βρεθούν σε περιβάλλον βιολογικής σημασίας και ύπαρξης πόρων ενώ για άλλα είδη μπορεί να είναι απαραίτητο να επιστρέψουν στο περιβάλλον όπου γεννήθηκαν για αναπαραγωγή. Οι ιχθύες έχουν εξαιρετικές δυνατότητες προσανατολισμού και πλοήγησης κατά την μετανάστευση (Dodson, 1988; Quinn & Brannon, 1980). Χαρακτηριστικά αναφέρεται το παράδειγμα του ανάδρομου Σολομού του Ατλαντικού (*Salmo salar*) που επιστρέφει στα γλυκά νερά όπου γεννήθηκε για να αναπαραχθεί, διαδικασία που βασίζεται στην μνήμη βάσει της όσφρησης και καλείται ιχθυλασία. Σε πρώιμο στάδιο της ζωής του ο εγκέφαλος συγκρατεί αυτή την πληροφορία μέχρι το θάνατο. Η όραση και ο φωτοτακτισμός αποτελούν χαρακτηριστικές προσαρμογές των ιχθύων ώστε να μπορούν να χρησιμοποιούν την εικονική πλοήγηση στο περιβάλλον και να μπορούν να μεταναστεύουν (Dodson, 1988). Η όσφρηση όπως και η γεύση αποτελούν αισθήσεις τις οποίες έχουν εξελίξει, οι ιχθύες και ο άνθρωπος. Με την έννοια του χημειοτακτισμού οι ιχθύες έχουν την ικανότητα να αντιλαμβάνονται ένα εύρος ερεθισμάτων

του περιβάλλοντος όπως θηρευτές, επιλογή συντρόφου, εύρεση τροφής αλλά και να επωφελούνται κατά την πλοήγηση (Brown, 2014).

Ο πιο απλός τρόπος προσανατολισμού των ιχθύων, για να βρουν κάποιο στόχο είναι να το συνδυάσουν με κάποιο σημείο αναφοράς (Braithwaite and Salvanes, 2008). Επί προσθέτως, έχει παρατηρηθεί και η ικανότητα των ιχθύων να ακολουθούν διαδοχικά σημεία αναφοράς, όπως στην περίπτωση ατόμων του γένους *Gasterosteus*, όπου έμαθαν σε ενυδρεία στο εργαστήριο, να ακολουθούν μια σειρά σημείων αναφοράς – φυτών, τα οποία σηματοδοτούσαν εισόδους που τελικά οδηγούσαν σε χώρο με αμοιβή (παρουσία τροφής) (Girvan and Braithwaite, 1998). Ο προσανατολισμός αποτελεί για πολλά είδη ιχθύων απαραίτητη προσαρμογή και βασίζεται στην ικανότητα τους να ακολουθούν ορόσημα (Odling-Smee and Braithwaite, 2003).

Έρευνες σε χρυσόψαρα έδειξαν ότι μπορούν να μάθουν να αποφεύγουν ένα αρνητικό ερέθισμα (ασθενές ηλεκτρικό σοκ) σε λαβύρινθο σχήματος Y (Zerbolio & Wickstra, 1980) ενώ επίσης μπορούν να συνδυάσουν την εύρεση τροφής σε συγκεκριμένα σημεία του χώρου βάσει έγχρωμων σημείων αναφοράς (Warburton, 1990).

Ένα περιβάλλον πλούσιο σε τροφικούς πόρους παραμένει καταγεγραμμένο στη μνήμη των ιχθύων ώστε να επιστρέψουν για αναζήτηση τροφής. Η ύπαρξη θηρευτών θα αποτελούσε καταστροφική συνέπεια για κάποιο είδος αν δεν είχε την ικανότητα να μνημονεύει την μορφή τους. Οι ιχθύες έχουν την ικανότητα πέραν των απλών τεχνικών αναζήτησης τροφής να μπορούν να συνεργάζονται ώστε να θηρεύουν τα θηράματα τους (Milinski *et al.* 1990 a,b, Dugatkin 1997). Μπορούν να διακρίνουν τα είδη που μοιράζονται τον ίδιο οικολογικό θώκο και έχουν την ικανότητα να παρακολουθούν την κοινωνική συμπεριφορά και τις μεταξύ τους αλληλεπιδράσεις (McGregor 1993, Bshary *et al.*, 2002, Griffiths 2003). Από παρατηρήσεις πεδίου προέκυψε ότι (1) ιχθύες «πελάτες» θα ζητήσουν έναν συγκεκριμένο «καθαριστή» αφού έχουν παρατηρήσει τη σχέση του με τον προηγούμενο «πελάτη» και δεν υπήρξαν επιπλοκές, (2) θα ζητήσουν λιγότερο τον καθαριστή που δεν θα έχουν παρατηρήσει τη σχέση του με κάποιον «πελάτη» και (3) θα ζητήσουν ελάχιστα ή και θα απομακρυνθούν από τον καθαριστή του οποίου η σχέση με τον προηγούμενο πελάτη κατέληξε σε συμπλοκή. Μεταξύ των ειδών ιχθύων υπάρχουν κάποια που μπορούν να μάθουν να χρησιμοποιούν εργαλεία (Bshary *et al.*, 2002), να χτίζουν πολύπλοκες δομές για φωλιές και να παρουσιάζουν μακρόχρονες μορφές μνήμης (Brown 2001, Warburton 2003). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα συνεργασίας είναι αυτό των ιχθύων ‘καθαριστών’ της οικογένειας *Labridae* (Bshary, 2011). Οι καθαριστές που βρίσκονται συχνά κοντά σε κοραλλιογενείς υφάλους

καθαρίζουν τα παράσιτα και το νεκρό δέρμα από τους ‘πελάτες’ τους, τους οποίους έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να επιλέγουν μεταξύ των διαφορετικών ειδών. Άτομα της ίδιας κατηγορίας δημιουργούν ακόμα και ένα κουκούλι βλέννας που τα περιβάλλει και τα προστατεύει από θηρευτές ή την προσβολή παρασίτων, κατά την ώρα που αναπαύονται (Grutter *et al.*, 2011). Αλλά είδη της οικογένειας *Labridae* μπορούν να συνθλίβουν αχινούς πάνω σε βράχια, ενώ άτομα του είδους *Choerodon schoenleinii* χτυπούν δίθυρα πάνω σε σκληρές επιφάνειες έτσι ώστε να αποκτήσουν πρόσβαση στο εδώδιμο τμήμα τους (Jones *et al.*, 2011). Ένα άλλο παράδειγμα της ικανότητας κάποιων ιχθύων να κατασκευάζουν φωλιές, είναι αυτό του είδους *Novaculichthys taeniourus* που έχει την ικανότητα να συγκεντρώνει μικρές κροκάλες του ιζήματος κατασκευάζοντας το κατάλυμα του για ανάπαυση, το οποίο εγκαταλείπει την επόμενη μέρα (Brown 2014). Όλα αυτά αποτελούν εξαιρετικές δεξιότητες των ιχθύων που υπαγορεύουν εξελιγμένες δράσεις του εγκεφάλου και χωρικής αντίληψης.

Συχνά παρατηρείται ότι οι ιχθύες, στο φυσικό περιβάλλον γνωρίζουν να αποφεύγουν τους θηρευτές τους χωρίς απαραίτητα να έρθουν σε συμπλοκή με αυτούς αλλά γιατί έχουν γίνει μάρτυρες άλλων θηραμάτων που δραπετεύουν και καταφέρνουν να εξασφαλίσουν την επιβίωσή τους.

Τα περισσότερα είδη ιχθύων ζουν σε κοινωνικές ομάδες για τον μεγαλύτερο τμήμα της ζωής τους και δεν θα πρέπει να προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι έχουν αναπτύξει αντίστοιχη συμπεριφορά που υποδεικνύει κοινωνική νοημοσύνη (Bshary *et al.*, 2014). Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα συνεργασίας σχετίζεται με την επιτήρηση θηρευτών σε περιστάσεις αυξημένης επικινδυνότητας. Όταν για παράδειγμα άτομα ιχθύων ως θηράματα υποψιάζονται πιθανή επίθεση από κάποιο θηρευτή, χρησιμοποιούν μια τακτική ώστε να ξεγλιστρούν δεξιά ή αριστερά προκαλώντας αντιπερισπασμό (Brown, 2014). Από έρευνες (Brown *et al.* 2011) για εξέταση της κοινωνικής μάθησης, προέκυψε ότι εκτρεφόμενα είδη σολομού, κατάφεραν να αναγνωρίσουν άγνωστο ζωντανό θηρευτή, αφού ομαδοποιήθηκαν με άλλους σολομούς οι οποίοι γνώριζαν ήδη το θήραμα. Άλλο παράδειγμα κοινωνικής μάθησης είναι αυτό όπου άτομα του είδους *Poecillia reticulata* , εκπαιδεύτηκαν να ακολουθούν συγκεκριμένες διαδρομές ώστε να εντοπίζουν μια περιοχή τροφοληψίας. Προ-εκπαιδευμένα άτομα του είδους που γνώριζαν τη διαδρομή που οδηγούσε στην τροφή, τοποθετήθηκαν σε ίδια ομάδα με άτομα ‘παρατηρητές’ που έμαθαν να ακολουθούν τη σωστή διαδρομή αφού αφαιρέθηκαν οι εκπαιδευτές (Laland and Williams, 1997). Οι ιχθύες μαθαίνουν να συνεργάζονται με ποικίλους τρόπους κατά την αναζήτηση τροφής, τον προσανατολισμό, την αναπαραγωγή και την αποφυγή θηρευτών (Huntingford *et al.* 1994; Johnstone & Bshary 2004; Fitzpatrick *et al.* 2006). Σε έρευνα του πανεπιστημίου του Κέιμπριτζ, το 1998 οι

Lalland K. και Williams K. εκπαίδευσαν άτομα της οικογένειας Cichlidae, ώστε να περνούν διαμέσου μια στρογγυλής οπής με κόκκινο φόντο, αγνοώντας μια όμοια με πράσινο, με σκοπό να βρεθούν στο άλλο τμήμα του ενυδρείου που υπήρχε τροφή. Κατά την εκπαίδευση, κάθε φορά που το άτομο προσπαθούσε να διασχίσει την οπή με το πράσινο φόντο μια πόρτα την έφραζε απότομα. Στα άτομα εκπαιδευτές προστέθηκε ένα άτομο παρατηρητής – εκπαιδευόμενος και για 5 μέρες, είχαν πρόσβαση και στις 2 οπές (πράσινο και κόκκινο φόντο) όπου στο άλλο τμήμα τους υπήρχε τροφή. Οι εκπαιδευτές συνέχισαν να ακολουθούν την γνώριμη σε αυτούς κατεύθυνση διαμέσου της οπής με κόκκινο φόντο και ο μαθητευόμενος είχε την τάση να τους ακολουθεί. Μετά το πέρας των 5 ημερών τα άτομα εκπαιδευτές αφαιρέθηκαν και παρέμεινε για να παρατηρηθεί ο μαθητής μόνος. Το άτομο αυτό συνέχισε κατ'επανάληψη να προτιμάει την οπή με το κόκκινο φόντο βάσει των κοινωνικών προτύπων. Τα άτομα που πετύχαιναν την διαδικασία γινόντουσαν «νέοι» εκπαιδευτές σε άλλα άτομα.

Σε ένα κοινωνικό σύνολο – κοπάδι, η ικανότητα αναγνώρισης και αντίδρασης σε κοινωνικά ερεθίσματα επιτρέπει στους ιχθύς να είναι για λιγότερο χρονικό διάστημα σε καταστάσεις stress και με αυτό τον τρόπο να μπορούν να διαθέσουν περισσότερο χρόνο στην εύρεση τροφής και στην αναπαραγωγή (Brown and Laland, 2003, Griffiths, 2003, Hoare and Krause, 2003).

1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την μάθηση

Η ενίσχυση που χαρακτηρίζεται από την συχνότητα, την ένταση και την χωρική και χρονική συνάφεια των γεγονότων, όπως σε άλλα σπονδυλωτά έτσι και στους ιχθύς, επηρεάζει την συνειρμική μάθηση. Θετική ενίσχυση είναι κάθε ερέθισμα που θα κάνει το άτομο προς εξέταση να επαναλάβει μια αντίδραση.

Σε χρυσόψαρα του είδους *Carassius auratus*, η παγίωση της μνήμης, όσον αφορά την συσχέτιση ενός νέου ερεθίσματος (π.χ. οπτικό) με μια επιβράβευση (π.χ. χορήγηση τροφής), είναι ισχυρότερη όταν ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ ερεθίσματος και επιβράβευσης είναι όσο το δυνατό μικρότερος (Breuning *et al.*, 1981).

Το κίνητρο, αποτελείται από 2 διακριτές συνιστώσες, το επίπεδο στέρησης του ζώου αλλά και την ελκυστικότητα του ερεθίσματος που του παρουσιάζεται (Lieberman, 1990). Η χορήγηση τροφής, αποτελεί κίνητρο που χαρακτηρίζεται από την αλληλεπίδραση του αισθήματος πείνας, stress, κοινωνικών ερεθισμάτων, αλλά και της φυσιολογίας του οργανισμού (fish cognition and behavior).

Μια οικολογική παράμετρος που επηρεάζει τη συμπεριφορά και την απόδοση των ιχθύων, στην ανάπτυξη δεξιοτήτων χωρικής μάθησης μπορεί να είναι η θήρευση συναρτήσει του περιβάλλοντος διαβίωσης. Επί παραδείγματι, έχει βρεθεί από παρατηρήσεις ατόμων του είδους *Brachyrhaphis episcyroi* ότι σε περιοχές όπου υπήρχαν λιγότεροι θηρευτές, τα άτομα ανακάλυπταν ταχύτερα ένα σημείο που υπήρχε κρυμμένη τροφή, σε αντίθεση με περιοχές υψηλής θήρευσης όπου ο χρόνος ήταν περισσότερος (Brown & Braithwaite 2005).

1.6 Η μάθηση συντελείται στον εγκέφαλο

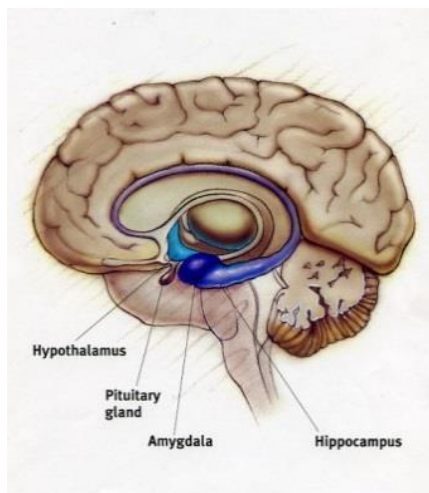
Ο εγκέφαλος και η ικανότητα μάθησης αποτελούν θέματα εξαιρετικού ενδιαφέροντος στη μελέτη της εξέλιξης των σπονδυλωτών. Η δομή και η πολυπλοκότητα του εγκεφάλου διαφέρει μεταξύ των τάξεων. Η σύγχρονη εξελικτική θεωρία υποστηρίζει ότι όλες οι ομάδες σπονδυλωτών παρά τις οντογενετικές διαφορές του εγκεφάλου τους διαθέτουν ομόλογες περιοχές που σχετίζονται με τις γνωστικές ικανότητες.

Οι γνωστικές ικανότητες των ζώων αποτελούν απαραίτητη προϋπόθεση για την αντίληψη του περιβάλλοντός τους την ύπαρξη και έκφραση συναισθημάτων. Οι ιχθύες αποτελούν μια κατηγορία σπονδυλωτών που διαφέρουν ως προς το σχηματισμό του εγκεφάλου τους καθώς δεν διαθέτουν νεοφλοιό και Μεταιχμιακό σύστημα δομές του εγκεφάλου των θηλαστικών. Ο νεοφλοιός αποτελεί τον πιο πρόσφατο εξωτερικό χιτώνα του φλοιού του εγκεφάλου των Πρωτευνόντων Θηλαστικών, ο οποίος μαζί με το μεταιχμιακό σύστημα και τα κέντρα συνείδησης και γλώσσας εμπλέκονται κυρίως στην ικανότητα μάθησης και την ευφυΐα.

1.6.1 Μεταιχμιακό σύστημα (Ιππόκαμπος – αμυγδαλή)

Ο ιππόκαμπος (Εικόνα 1) διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε γνωστικές λειτουργίες και κυρίως στη μνήμη και στη μάθηση. Η μνήμη και η μάθηση αφορούν μακροχρόνιες προσαρμοστικές αλλαγές των νευρικών κυκλωμάτων του εγκεφάλου ως ανταπόκριση σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος (Σαράντης, 2010). Οι αλλαγές αυτές στους νευρώνες του εγκεφάλου, σε συνδυασμό με τη μνήμη από προηγούμενες εμπειρίες έχουν ως τελικό αποτέλεσμα την αντίδραση του οργανισμού σε αλλαγές του περιβάλλοντος (Bear *et al.*, 2001). Στον ιππόκαμπο διαμορφώνεται ένας «χωρικός χάρτης» που αποτελεί μια ενδογενή αναπαράσταση του χώρου στον οποίο κινείται το πειραματόζωο. Κατά την είσοδο σε ένα νέο περιβάλλον νέοι χωρικοί χάρτες δημιουργούνται οι οποίοι μπορούν να παραμείνουν στη μνήμη για λίγες εβδομάδες έως και μήνες (Σαράντης, 2010).

Εικόνα1. Εγκέφαλος θηλαστικών όπου διακρίνεται ο ιππόκαμπος (Hippocampus), η αμυγδαλή (amygdala), ο υποθάλαμος (hypothalamus) και η υπόφυση (pituitary gland) του μεταιχμιακού συστήματος.



Στα Θηλαστικά, η ικανότητα της μάθησης συντελείται στον ιππόκαμπο και την αμυγδαλή του εγκεφάλου σε αντίθεση με τους ιχθύς όπου ο τελεγκέφαλος, εμπλέκεται σε αυτές τις διαδικασίες (Schacter *et al.*, 1994). Είναι ευρέως γνωστό ότι ο ιππόκαμπος σχετίζεται με τη πληροφορία του χώρου και την συνειρμική μάθηση (O'Keefe *et al.*, 1978; Burgess *et al.*, 1999; Eichenbaum *et al.*, 1999; Jeffery *et al.*, 2004) ενώ η αμυγδαλή σχετίζεται περισσότερο με την έκφραση συναισθημάτων (Gallagher & Chiba, 1996; Davis, 1992; LeDoux, 1995). Έρευνες σε πτηνά και ερπετά υποστηρίζουν ότι υπάρχουν ομόλογες περιοχές του ιππόκαμπου και της αμυγδαλής του εγκεφάλου των θηλαστικών, με τη μορφή νευρικών ιστών σε περιοχές του τελεγκεφάλου τους, που εμπλέκονται στη χωρική μάθηση, τη μνήμη και την κοινωνική συμπεριφορά. (Kling & Brothers, 1992; Sherry & Duff, 1996; Lopez *et al.*, 2001), καταλήγοντας στην υπόθεση ότι αυτό ισχύει για όλα τα χερσαία ζώα (Northcutt, 1981; Ulinski, 1990; Nieuwenhuys *et al.*, 1998).

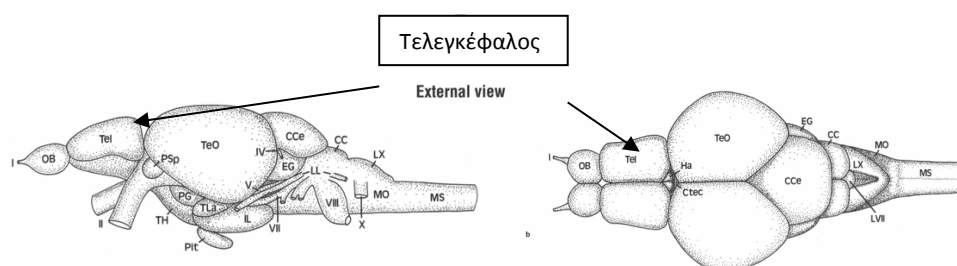
Η συμμετοχή του ιππόκαμπου στις λειτουργίες της μνήμης προκύπτει από πειράματα σε ζώα τα οποία χρησιμοποιούν την χωρική μνήμη για πλοήγηση στο χώρο (Black *et al.*, 1977, Nadel 1991, Maguire *et al.*, 1997, Morris *et al.*, 1997). Ο ρόλος του ιππόκαμπου έχει επισημανθεί και σε μοντέλα για τη διερεύνηση της συμπεριφοράς όπως αυτό του ακτινωτού λαβυρίνθου όπου το πειραματόζωο επιλέγει τη σωστή διαδρομή (Σαράντης, 2010).

Η αμυγδαλή είναι το τμήμα του εγκεφάλου, σπονδυλωτών με μεταιχμιακό σύστημα, που εμπλέκεται κυρίως σε συναισθηματικά φορτισμένες καταστάσεις (Salas *et al.*, 2006). Στην περίπτωση των ιχθύων ομολογίες της αμυγδαλής έχουν παρατηρηθεί με περιοχές του τελεγκεφάλου (Salas *et al.*, 2006) που σχετίστηκαν με αισθήματα φόβου και επιθετικότητας .

1.6.2 Τελεγκέφαλος ιχθύων

Είναι γεγονός ότι ο εγκέφαλος των ιχθύων στερείται νεοφλοιού, την εξωτερική στοιβάδα του φλοιού του εγκεφάλου των θηλαστικών, όπου λαμβάνουν χώρα οι ανώτερες νοητικές λειτουργίες (π.χ. σκέψη, συνείδηση, γλώσσα). Ο νεοφλοιός, σε συνεργασία με το μεταιχμιακό σύστημα, ιδιαίτερα τις περιοχές της αμυγδαλής και του ιππόκαμπου, υποστηρίζουν λειτουργίες όπως τη μνήμη και τη μάθηση. Στους ιχθύς οι λειτουργίες του μεταιχμιακού συστήματος υποστηρίζονται από ομόλογες περιοχές του πρόσθιου εγκέφαλου – τελεγκέφαλος (Salas, 2006) (Εικόνα 2).

Εικόνα 2. Εγκέφαλος ιχθύων, διακρίνεται το πρόσθιο τμήμα που καλείται τελεγκέφαλος



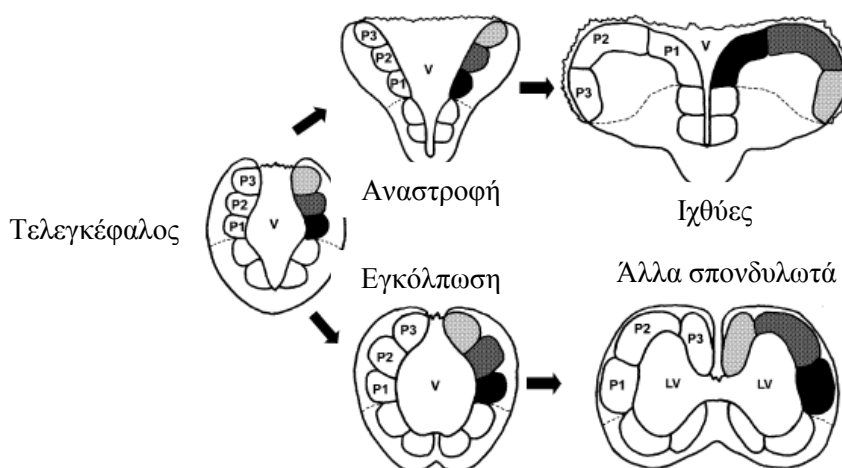
Ο τελεγκέφαλος των ιχθύων έχει συσχετιστεί με ένα πλήθος ψυχολογικών διεργασιών, όπως η προσοχή, η λήψη αποφάσεων, η λειτουργία της μνήμης, ενώ η εμπλοκή του στη μάθηση αποτελεί αντικείμενο ερευνών (Broglia *et al.*, 2003). Η παρεγκεφαλίδα των ιχθύων εκτός από τις περιπτώσεις εξαρτημένης μάθησης, εμπλέκεται και σε πιο σύνθετες λειτουργίες όπως η χωρική αντίληψη.

Οι Broglia *et al.*, το 2010 δίνουν εξήγηση για την χωρική αντίληψη σε χρυσόψαρα (*Carassius auratus*), εξετάζοντας τις νευρικές λειτουργίες του εγκεφάλου τους και τα αποτελέσματα τους υποδεικνύουν ότι υπάρχει ομολογία περιοχών του τελεγκεφάλου των ιχθύων με τον ιππόκαμπο των χερσαίων σπονδυλωτών (Broglia *et al.*, 2010). Η ικανότητα μάθησης των ιχθύων εξαρτάται από τμήματα του εγκεφάλου τους που παρουσιάζουν ομοιότητες με ομόλογα τμήματα του εγκεφάλου πτηνών και θηλαστικών (Laland, 2003). Οι O' Keefe και Nadel (1978) αναφέρουν ότι υπάρχει στους ιχθύς, όπως στα θηλαστικά και τα πτηνά, η δυνατότητα να δημιουργούν εσωτερική αναπαράσταση του περιβάλλοντος χώρου – χωρικούς χάρτες, βάσει των οποίων εξυπηρετείται η διαδικασία της πλοήγησης τους. Με ελεγχόμενες εργαστηριακές μελέτες, όπου παρέχονται ιδανικές συνθήκες, αποκαλύπτονται οι χωρικές ικανότητες των ιχθύων και καθορίζονται οι μηχανισμοί που χρησιμοποιούνται από τα ζώα για τον προσανατολισμό και την πλοήγηση (Broglia *et al.*, 2003).

1.6.2.1 Ομολογίες τελεγκεφάλου ιχθύων με αμυγδαλή και ιπόκαμπο

Για να παρατηρηθεί εάν υπάρχει ομολογία με τον τελεγκεφαλο των ιχθύων έγιναν πειράματα με εκτομές σε περιοχές του τελεγκεφάλου ιχθύων, και διαπιστώθηκε ότι προκλήθηκαν διαταραχές στην διαδικασία της χωρικής αντίληψης, την μνήμη και της αντίδρασης σε δοκιμές εξαρτημένης μάθησης (Broglia *et al.*, 2005). Οι διαφορές κατά την οντογένεση, όσον αφορά την εξέλιξη του εγκεφάλου, μεταξύ ιχθύων και άλλων σπονδυλωτών (Εικόνα 3), αποτελούν πιθανή εξήγηση της παρουσίας ομολογιών του μεταιχμιακού συστήματος με τον τελεγκεφαλο. Παρόλα αυτά τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί ότι ο εγκέφαλος των περισσότερων σπονδυλωτών και ιχθύων μοιάζουν αρκετά παρουσιάζοντας ομολογίες. Το ραχιαίο τμήμα (dorsal telencephalon) του τελεγκεφάλου των ιχθύων αντιπροσωπεύει τον χιτώνα (pallium) ενώ το κοιλιακό τμήμα (ventral telencephalon) τον υποχιτώνα (subpallium) (Rink and Wullimann 2004).

Εικόνα 3. Σχηματική αναπαράσταση της διαφοράς οντογένεσης του εγκεφάλου ιχθύων και άλλων σπονδυλωτών. Στην περίπτωση του τελεγκεφάλου των ιχθύων παρατηρείται μια διαδικασία αναστροφής προς αυτή της εγκόλπωσης που παρατηρείται στα υπόλοιπα σπονδυλωτά.



Αφαίρεση του τελεγκεφάλου προκαλεί διαταραχές στην συνειρμική μάθηση (κλασσική εξαρτημένη και συντελεστική εξαρτημένη) (Schacter and Tulving, 1994). Από έρευνες σε ιχθύς, στους οποίους πραγματοποιήθηκε εκτομή ολόκληρου του τελεγκεφάλου, εξήχθη το συμπέρασμα της άμεσης σχέσης του με την αντίδραση σε ερεθίσματα του περιβάλλοντος (Hollis & Overmier, 1982; Overmier & Curnow, 1969). Παρατηρήθηκαν, μείωση της επιθετικότητας και της αναπαραγωγικής διάθεσης (Overmier & Gross, 1974; Shapiro *et al.*,

1974) αλλά και μειωμένη απόδοση σε περιπτώσεις πειραμάτων που σχετίζονταν με χωρική μάθηση σε λαβυρίνθους. Στην περίπτωση αφαίρεσης πλάγιων τμημάτων του τελεγκεφάλου επηρεάστηκε η διαδικασία μάθησης σε λαβύρινθο σχήματος T (Rodriguez *et al.*, 2002). Σε πείραμα και πάλι με χρυσόψαρα αφαιρέθηκαν τμήματα του μέσου φλοιού (medial pallium) επηρεάζοντας αρνητικά την ανταπόκριση των ατόμων σε ερεθίσματα που είχαν εκπαιδευτεί να τους προκαλούν αποφυγή, ενώ παράλληλα διαπιστώθηκε ότι διαφορετικές περιοχές του τελεγκεφάλου σχετίζονται με διαφορετικές λειτουργίες της μάθησης (Portavella *et al.*, 2004a,b). Οι αντιδράσεις αποφυγής από επώδυνα ερεθίσματα αποτελούν συμπεριφορά που εκφράζεται ως φόβος για τους ιχθύς. Ο φόβος παρά τη ανθρωποκεντρική του έννοια έχει αποτελέσει εξελικτική προσαρμογή για την αποφυγή επικίνδυνων καταστάσεων (Segner, 2012).

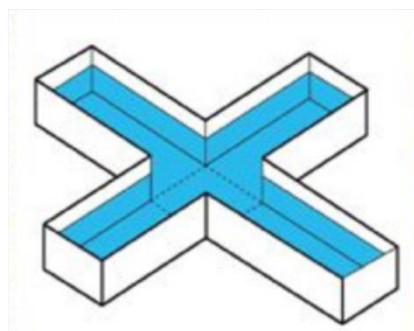
1.7 Λαβύρινθοι

Για να διερευνηθεί η ικανότητα μνήμης και μάθησης στα ζώα χρησιμοποιούνται, σε πλήθος ερευνών, αναλύσεις των χωρικών ικανοτήτων τους (Healy, 1998). Ο περιορισμός των ιχθύων σε κλειστού τύπου συστήματα, όπως το περιβάλλον μιας δεξαμενής, για μεγάλες περιόδους, οδηγεί στο σχηματισμό ομαδικών σχέσεων ισχυρότερων απ' ό,τι θα συνέβαινε στο φυσικό περιβάλλον. Το νερό ενός κλειστού εργαστηριακού κυκλώματος, χαρακτηρίζεται από αυξημένη συγκέντρωση οσμών που συσσωρεύεται από τα ενυδρεία που το αποτελούν, διευκολύνοντας την αναγνώριση μεταξύ των ατόμων (fish cognition and behavior p.203). Με βάση τα παραπάνω η μελέτη της μαθησιακής ικανότητας των ιχθύων γίνεται με χρήση λαβυρίνθων. Υπάρχει πλήθος σχημάτων σε λαβύρινθους με διάφορες προσαρμογές ώστε να εξυπηρετούν την πολυπλοκότητα του εκάστοτε πειράματος. Στη βιβλιογραφία απαντώνται λαβύρινθοι σχήματος T, Y, ακτινωτοί, με πόρτες (Εικόνα 4α,β)

Εικόνα 4α. Λαβύριθος τύπου T



Εικόνα 4β. Λαβύριθος τύπου +



Η χρήση λαβυρίνθων βασίζεται στην φυσιολογική συμπεριφορά των ιχθύων να χρησιμοποιούν ορόσημα για να προσανατολιστούν και να πλοηγηθούν στο φυσικό περιβάλλον με χρήση χρωμάτων, ορόσημων και ομοειδών ατόμων.. Οι λαβύρινθοι αποτελούν τον πιο αποδοτικό τρόπο διερεύνησης των χωρικών ικανοτήτων των ιχθύων. Μπορούν να ελεγχθούν αντιδράσεις που σχετίζονται με την επιλογή του διαμερίσματος του λαβυρίνθου που σχετίζεται με τη λήψη κάποιας επιβράβευσης (Chung, 2008).

Παρατηρήθηκε ότι οι ιχθύες μετά από έναν αριθμό επαναλήψεων συνηθίζουν αυτές τις διαδικασίες και παρουσιάζουν μια μειωμένη τάση να εκτελέσουν την εκάστοτε δραστηριότητα. Γεγονός που υπαγορεύει ότι οι διαδοχικές επαναλήψεις πρέπει να είναι περιορισμένες ανά ημέρα και η περίοδος εκπαίδευσης να μην ξεπερνά τις μερικές εβδομάδες (Agrillo, 2010). Επί προσθέτως κατά τις επαναλαμβανόμενες μεταφορές από την δεξαμενή διαβίωσης στην δεξαμενή όπου λαμβάνει χώρα το πειραματικό μέρος οι ιχθύες υπόκεινται

stress που αποτελεί δυσμενή παράγοντα για την ευζωία και την απόδοση τους (Agrillo *et al.*, 2012)

1.8 Είδη θετικών (επιβράβευση) ή αρνητικών (‘τιμωρία’) ερεθισμάτων για την μελέτη της ικανότητας μάθησης

Στα πειράματα με χρήση λαβύρινθου ως θετική ενίσχυση χρησιμοποιείται η χορήγηση τροφής. Η χρήση της τροφής ως επιβράβευση αποτελεί θετική ενίσχυση. Άλλες έρευνες χρησιμοποίησαν κοινωνική ενίσχυση για μορφή επιβράβευσης. Οι Sovrano *et al.* το 2002, μελέτησαν την ικανότητα προσανατολισμού ατόμων του είδους *Xenotoca eiseni*, με οπτικό ερέθισμα μια χρωματιστή περιοχή που οδηγούσε σε ομοειδή άτομα (θετική ενίσχυση) καταλήγοντας ότι έχουν την ικανότητα συναφούς μάθησης ορόσημων με γεωγραφική σημασία. Οι Al-Imari and Gerlai (2008), επιτυχώς εκπαίδευσαν με κοινωνική ενίσχυση ζεβρόψαρο (*Danio rerio*), σε ακτινωτό λαβύρινθο τεσσάρων βραχιόνων, ώστε να επιλέγει τον βραχίονα που είχε ένα κόκκινο σημάδι που σηματοδοτούσε την σωστή διαδρομή για να φτάσει σε μια ομάδα ομοειδών του. Επί προσθέτως η μάθηση και η μνήμη, στην εκτροφή των ιχθύων, έχει σχετιστεί με τη εξεύρεση νέου τεχνικού εξοπλισμού (χορήγηση τροφής) , την προσαρμογή τους σε νέο περιβάλλον (προσαρμογή) αλλά και θέσπιση κανόνων ευζωίας.

Η μάθηση μιας αντίδρασης μπορεί να γίνει και με αρνητικό ερέθισμα. Ένα αρνητικό ερέθισμα που επαναλαμβάνεται προκαλεί μια αντίδραση η οποία θα σχετίζεται με την αποφυγή του. Η αίσθηση πόνου ή φόβου εκφράζονται γενικά ως κατάσταση stress στους ιχθύς. Η ύπαρξη θηρευτών αποτελεί πρόκληση για την επιβίωση των ιχθύων που πρέπει να μάθουν να αμύνονται, να δραπετεύουν με στόχο την επιβίωση τους. Ένας θηρευτής σαν αρνητικό ερέθισμα θα προκαλούσε σαν αντίδραση την δραπετεύση των απειλούμενων. Σε πείραμα, άτομα της οικογένειας Cichlidae στα πλαίσια εκπαίδευσης, κυνηγήθηκαν για 1-2 μέρες από ομοειδή τους ενήλικα άτομα και έμαθαν να ξεφεύγουν με μεγαλύτερη ευκολία από επιθέσεις μετά από διάστημα περίπου 10 εβδομάδων σε αντίθεση με ιχθύδια που δεν είχαν κυνηγηθεί ποτέ, γεγονός που αφορά μορφή μνήμης που σχετίζεται όχι με την ταυτοποίηση του θηρευτή αλλά με τον τρόπο διαφυγής.

1.9 Πρακτική αξιοποίηση της ικανότητας μάθησης των ιχθύων στις εκτροφές

Η κλασική εξαρτημένη μάθηση μπορεί να φανεί αρκετά χρήσιμη στην βελτιστοποίηση της συμπεριφοράς, των ιχθύων και άλλων ζώων, όσον αφορά γεγονότα υψηλής βιολογικής σημασίας και θα μπορούσε να εφαρμοστεί ενισχύοντας ορισμένες μεθόδους εκτροφής (Hollis, 1999). Πολλές μορφές εξαρτημένης μάθησης, με ερεθίσματα όπως φως ή ηχητικά μηνύματα, έχουν βρει εφαρμογή στην εκτροφή ιχθύων, συνήθως, για να σηματοδοτήσουν την χορήγηση τροφής (Jobling *et al.*, 2001).

Στην εκτροφή, η ικανότητα μάθησης των ιχθύων είναι ωφέλιμη, ενισχύοντας την προσαρμογή διαφόρων ειδών ιχθύων στο ανάλογο περιβάλλον και την ικανότητα να ανταπεξέρχονται στα ερεθίσματα που προκύπτουν. Ιδιαίτερα σε εντατικές μεθόδους εκτροφής, το περιβάλλον διαβίωσης διαφέρει κατά πολύ από το φυσικό. Η υψηλή ιχθυοπυκνότητα, ο περιορισμένος χώρος, το είδος της τροφής και οι ανθρώπινοι χειρισμοί είναι κάποιες από τις πτυχές των υδατοκαλλιεργειών. Ένα ερέθισμα του περιβάλλοντος εκτροφής, αν δεν ακολουθείται από οδυνηρό γεγονός, περιοδικά λαμβάνει ασθενέστερη ανταπόκριση από τους ιχθύς, διαδικασία που καλείται εξοικείωση (*habituation*). Τα είδη προς εκτροφή θα πρέπει να μπορούν να υποστούν αυτές τις συνθήκες και να εξοικειωθούν με σκοπό να προσαρμοστούν. Επί προσθέτως, θα πρέπει να μπορούν να μάθουν να συμβιώνουν σε ομάδες ατόμων και να προσαρμόζονται στις ελεγχόμενες συνθήκες της υδατοκαλλιέργειας που προσομοιάζονται όσο το δυνατό με αυτές του φυσικού περιβάλλοντος, συμβάλλοντας στην ευζωία των ατόμων (Brown *et al.*, 2011). Οι ανθρωπογενείς χειρισμοί σε ένα περιβάλλον εκτροφής συνήθως προάγουν καταστάσεις stress. Το stress επηρεάζει αρνητικά την ευζωία αλλά και την αποδοτικότητα της εκτροφής.

Κατάσταση stress δημιουργείται κατά το καθάρισμα των δεξαμενών, την απόρριψη νεκρών ατόμων, διαδικασίες κατά τις οποίες, βάσει της εξαρτημένης μάθησης, ουδέτερο ερέθισμα (ανθρωπογενής παρέμβαση) συνδυάζεται με μια αρνητική κατάσταση (stress). Μετά το πέρας των παραπάνω διαδικασιών χορηγείται τροφή ώστε να επανέρθουν τα άτομα από μια κατάσταση stress στις φυσιολογικές λειτουργίες της ζωής. Ως γενική αρχή, θα πρέπει οι ανθρωπογενείς επεμβάσεις να είναι προβλέψιμες από τα εκτρεφόμενα είδη και τα δεύτερα να λαμβάνουν θετική επιβράβευση.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται κατά την εκτροφή, για να προκαλέσουν μια αντίδραση που σχετίζεται με την συνειρμική μάθηση, είναι με χρήση οπτικών ή ηχητικών ερεθισμάτων που

συνεπάρχονται την χορήγηση τροφής (Midling *et al.*, 1987). Η έρευνα προς το παρόν έχει επικεντρωθεί στην ατομική εξέταση διαφόρων ειδών ως προς την ικανότητα μάθησης ενώ θα πρέπει η εξέταση αυτή να γίνει και σε πολυπληθείς ομάδες ιχθύων όπως και σε πλωτούς κλωβούς.

Η συντελεστική μάθηση έχει βρει εφαρμογή στις υδατοκαλλιέργειες. Εκτρεφόμενα είδη μπορούν να μάθουν να ενεργοποιούν αυτοματοποιημένους μηχανισμούς, με το σπρώξιμο ενός μοχλού ή με το τράβηγμα ενός νήματος και να ενεργοποιούν, με αυτόν τον τρόπο, αυτόματη χορήγηση τροφής. Έχει αποδειχθεί πειραματικά (Anthouard, 1987) μέσω της κοινωνική μάθησης, ότι ιχθύδια του είδους *Dicentrarchus labrax*, παρακολουθώντας ομοειδή άτομα, έμαθαν να προσλαμβάνουν τροφή μέσω του σπρωξίματος ενός μοχλού.

1.10 Μάθηση – έκφραση γονιδίων

Στα σπονδυλωτά οι λειτουργίες της μάθησης και της μνήμης έχουν συσχετιστεί με την έκφραση των γονιδίων *egr-1* και *c-fos* στον εγκέφαλο. Το κεντρικό νευρικό σύστημα προκαλεί ανάλογα αντιδράσεις βάσει των ερεθισμάτων που δέχεται από το περιβάλλον. Τα σπονδυλωτά, μαθαίνουν να αντιδρούν σε διαφορετικά ερεθίσματα. Ο εγκέφαλος τους ποτέ δεν σταματάει να προσαρμόζεται στις προκλήσεις του περιβάλλοντος και αυτό οφείλεται στην πλαστικότητα. Η πλαστικότητα αποτελεί ένα από τα πιο αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά του νευρικού συστήματος. Δεν περιορίζεται μόνο στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του εγκεφάλου αλλά συντελείται και κατά την ενηλικίωση και αποτελεί εγγενές χαρακτηριστικό εξέλιξης της εγκεφαλικής λειτουργίας (Loeblich and Nedivi 2009). Αποτελεί την ιδιότητα των νευρώνων να παρουσιάζουν βραχυπρόθεσμες ή μακροπρόθεσμες φαινοτυπικές αλλαγές βάσει διαφορετικών ερεθισμάτων και κυτταρικών διεργασιών (Hughes and Dragunow 1995; Loeblich and Nedivi 2009). Τα άμεσης έκφρασης πρώιμα γονίδια (Immediate Early Genes) έχει προταθεί ότι διαδραματίζουν ποικίλους ρόλους, μεσολαβώντας στη πλαστικότητα του εγκεφάλου, ενώ αποτελούν διαύλους διαμέσου των οποίων νευρώνες μετατρέπουν εξωκυτταρικά χημικά ή ηλεκτρικά σήματα σε ενεργοποίηση του γονιδιώματος (Desjardins 2010).

1.11 Πρώιμης Έκφρασης Γονίδια (IEGs)

Τα πρώιμης έκφρασης γονίδια (IEGs) είναι γονίδια – πρωτεΐνες στην πρώτη γραμμή αντίδρασης. Η ενεργοποίηση τους σε νευρώνες γίνεται από ερεθίσματα που σχετίζονται με ένα εύρος βιολογικών διεργασιών (ανάπτυξη, αισθήσεις, αναπαραγωγή) αλλά και την εκδήλωση κάποιας συμπεριφοράς (επιθετικότητα, εξερεύνηση, αντίδραση σε ερεθίσματα) και η έκφραση τους σε διαφορετικές περιοχές χρησιμοποιείται σαν ένδειξη νευρικής δραστηριότητας (Okuyama *et al.* 2011). Τα IEGs κωδικεύουν διαφόρων ειδών πρωτεΐνες όπως και αυξητικούς παράγοντες και ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό. Οι βιοχημικές και κυτταρικές ιδιότητες αυτών των μορίων μπορούν να προσδώσουν σημαντική πληροφορία όσον αφορά τους μηχανισμούς της νευρικής πλαστικότητας (Lanahan and Worley, 1998). Έχει αναφερθεί ότι η έκφρασή τους εμπλέκεται στην λειτουργία της μνήμης από ερεθίσματα που στο παρελθόν έχουν προκαλέσει φόβο (Bozon *et al.* 2003). Τα IEGs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ανάπτυξη του εγκεφάλου, στη διαδικασία της μνήμης και της μάθησης αλλά και σε περιπτώσεις αντίδρασης σε χημικές ουσίες όπως αμφεταμίνες και αλκαλοειδή (Perez – Cadahia *et al.*, 2011).

Κάποια IEGs αποτελούν μεταγραφικούς παράγοντες. Οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι πρωτεΐνες που είτε ενισχύουν είτε διακόπτουν τον ρυθμό έκφρασης άλλων γονιδίων (Loeblich and Nedivi, 2009). Μεταξύ αυτών μερικά είναι τα AP-1, egr-1 (ή zif268), egr-2, c-fos, c-myc, c-jun και arc. Ο αριθμός των πρωτεϊνών, που εμπλέκεται στην ενεργοποίηση της διαδικασίας μεταγραφής στους νευρώνες των θηλαστικών, ανέρχεται μεταξύ 1000 με 10000, με ένα σημαντικό τμήμα να αποτελεί μεταγραφικούς παράγοντες (Herdegen and Leah 1998). Η ανάπτυξη εγκεφαλικής λειτουργίας, ως απόρροια της μεταγραφικής διαδικασίας, και κατά τα πρώιμα στάδια της ζωής αλλά και κατά την ενηλικίωση, συνοδεύεται από την έκφραση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων. Μεταξύ αυτών και οι μεταγραφικοί παράγοντες είναι υπεύθυνοι για την ρύθμιση της κυτταρικής αντιγραφής και διαφοροποίησης με ακριβή χωροχρονική σειρά (He *et al.* 1989).

Δύο από τα πιο ευρέως διαδεδομένα IEGs είναι το c-fos και το egr-1 (Clayton 2000), τα οποία κατά την έκφραση τους υποδεικνύουν την εγκεφαλική δραστηριότητα και ο ρόλος τους συνεπάγεται την έκφραση άλλων γονιδίων (Loeblich and Nedivi 2009). Σήμερα, η έκφραση των c-fos και egr-1 αλλά και άλλων IEGs, δικαιολογεί τη λειτουργία νευρικών ώσεων και χρησιμοποιούνται για την παρατήρηση της εγκεφαλικής δραστηριότητας και πλαστικότητας κατά το σχηματισμό της μνήμης (Lanahan and Worley 1998; Loeblich and Nedivi 2009). Έκφραση αυτής της κατηγορίας γονιδίων, σε εγκεφάλους σπονδυλωτών παρατηρήθηκε

ύστερα από την κοινωνική συμπεριφορά, σε τρωκτικά (Pfaus *et al.*,1997), σε ωδικά πτηνά (Mello *et al.*,1992) και σε βατράχους (Hoke *et al.*, 2004). Είναι γεγονός πλέον ότι αυτή η κατηγορία γονιδίων εκφράζεται σε διαφορετικές περιοχές του εγκεφάλου βάσει ενός πλήθους αντίστοιχων ερεθισμάτων (Beckmann and Wilce 1997).

1.11.1 Egr-1

1.11.1.1 Egr-1 σπονδυλωτών (όχι ιχθύων)

Το *egr-1* (γνωστό και ως *zif268*, *NGFI-A*, *krox-24*, *ZENK*) αποτελεί αρχικό στάδιο γονιδιακής έκφρασης και ενεργοποιείται από ένα εύρος ποικίλων φυσικών ερεθισμάτων που δέχεται το νευρικό σύστημα κατά την εκδήλωση κάποιας συμπεριφοράς (Beckmann and Wilce 1997). Στα θηλαστικά παρατηρείται έκφραση του γονιδίου *egr-1* στον ιππόκαμπο και εμπλέκεται σε διαδικασίες πλαστικότητας, σχηματισμού και παγίωσης της μνήμης (Bozon *et al.*, 2002, Tokuyama *et al.*, 2002, Frankland *et al.*, 2004). Σε περιπτώσεις καταστολής της έκφρασης του γονιδίου *egr-1*, όπως και σε περιπτώσεις μετάλλαξής του, έχει παρατηρηθεί κακή παγίωση και σχηματισμός της μνήμης, πιθανότατα λόγω μειωμένης συναπτικής πλαστικότητας στον ιππόκαμπο (Emmanuel Rajan, 2011). Έχει παρατηρηθεί ότι προάγει, ως μεταγραφικός παράγοντας, και την έκκριση εκλυτικής ορμόνης γοναδοτροπινών (Gonadotropin-Releasing Hormone) που σχετίζεται με την αναπαραγωγή (Burmeister *et al.*, 2005). Ερεθίσματα του περιβάλλοντος, καταστάσεις stress, εγκεφαλικοί τραυματισμοί και ισχαιμία είναι μερικά παραδείγματα από ένα πλήθος εργασιών που επηρεάζουν την έκφραση του *egr-1* (Beckmann and Wilce 1997). Οι πιο αξιοσημείωτες παρατηρήσεις της έκφρασης του γονιδίου *egr-1*, έχουν παρατηρηθεί σε ωδικά πτηνά που εκτίθονταν στον κελήδημα ατόμου του ίδιου είδους (Liu and Nottebohm, 2005; Mello and Clayton, 1994; Mello *et al.*, 1992).

Έχει παρατηρηθεί έκφραση του *egr-1* στον οσφρητικό λοβό τρωκτικών, κατά την αντίδραση τους σε οσφρητικά ερεθίσματα (Kress and Wullimann 2012). Επί προσθέτως, σε τρωκτικά, στην περιοχή του υποθαλάμου παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του *egr-1* σε πείραμα με εναλλαγές φωτός (Rusak *et al.*, 1990), όπως και στο πρόσθιο τμήμα του εγκεφάλου (forebrain) ωδικών πτηνών κατά το άκουσμα μουσικής (Gentner *et al.*, 2001, Mello *et al.*, 1992). Σε αρουραίους του είδους *Microtus ochrogaster* οι Northcutt και Lonstein (2009) παρατήρησαν θετική συσχέτιση της έκφρασης του *egr-1* και του *c-fos*, σε περιοχές της αμυγδαλής του εγκεφάλου τους, με φαινόμενα κοινωνικότητας και αναπαραγωγικής

διαδικασίας. Έκφραση του *egr-1*, όπως προαναφέρθηκε, υπάρχει και στην αμυγδαλή του εγκεφάλου θηλαστικών. Η περιοχή αυτή του εγκεφάλου είναι υπεύθυνη για την παραγωγή φερομονών που παράγονται και στους ιχθύς και σχετίζονται με την αναπαραγωγική διάθεση. Αυτές οι αντιστοιχίες μεταξύ τροφτικών και ιχθύων υποδεικνύουν ισχυρή διατήρηση της γονιδιακής έκφρασης και λειτουργίας του *egr-1*.

1.11.1.2 Egr-1 στους ιχθύς

Έχουν παρατηρηθεί ομολογίες περιοχών του τελεγκεφάλου των ιχθύων, με την αμυγδαλή και τον ιππόκαμπο των θηλαστικών για την έκφραση του *egr-1* (Hansen *et al.*, 2003, 2004). Το γονίδιο *egr-1* έχει σχετιστεί με λειτουργίες του νευρικού συστήματος και στους ιχθύς (Burmeister and Fernald, 2005). Οι Kress and Wullimann το 2012, παρατήρησαν σημαντική μείωση της έκφρασης του γονιδίου *egr-1* στον τελεγκέφαλο, στον διεγκεφαλο (υποθάλαμος) και στον μεσεγκέφαλο του ζεβρόψαρου (*Danio rerio*) σε πείραμα μεταβατικής οσφρητικής στέρησης με χρήση μιας χημικής ουσίας (Triton X-100) ενώ πρότειναν ότι η ιχνηλασία η αναπαραγωγική διάθεση και οσφρητικά ερεθίσματα προάγουν την έκφραση του γονιδίου. Αποδίδουν το γεγονός της έκφρασης του γονιδίου σε αυτές τις περιοχές σε μια σχέση με τις λειτουργίες της μνήμης και της μάθησης. Το *egr-1* εκφράζεται σε κύτταρα σε διάφορες περιοχές του εγκεφάλου των ιχθύων. Σε άτομα του είδους *Apteronotus leptorhynchus*, ηλεκτροφόρα είδη ιχθύων, (Harvey-Girard *et al.*, 2010) κατά την επικοινωνία τους μεταξύ ηχητικών μηνυμάτων – τερετισμάτων αλλά και κατά την παγίωση της μνήμης για λίγες ημέρες, παρατηρήθηκε έκφραση του γονιδίου *egr-1* σε περιοχές του τελεγκεφάλου ομόλογες του ιππόκαμπου των θηλαστικών. Λόγω της ανεύρεσης του *egr-1* σε αρκετές περιοχές του τελεγκεφάλου και του υποθαλάμου προτάθηκε (Poirier *et al.* 2008) η ύπαρξη συσχέτισης με τις λειτουργίες μάθησης, μνήμης και συναπτικής πλαστικότητας τόσο στα θηλαστικά όσο και στους ιχθύς. Έρευνα σε είδη της οικογένειας Cichlidae, έδειξε ότι αυξημένη έκφραση *egr-1* σε περιοχές του τελεγκεφάλου (subpallial regions), σχετίζονταν με την ιεραρχική ανέλιξη μεταξύ αρσενικών ομοειδών και τις φυσιολογικές διαδικασίες που σχετίζονται με την αναπαραγωγική διάθεση (Burmeister *et al.*, 2005). Επιθετική δραστηριότητα συσχετίστηκε με υψηλά επίπεδα έκφρασης των γονιδίων *egr-1* και *c-fos* σε εγκεφαλικές περιοχές ομόλογες του ιππόκαμπου και της αμυγδαλής σε είδη της οικογένειας (*Astatotilapia Burtoni*) (Desjardins, 2010). Η σημασία του *egr-1* καθίσταται ουσιώδης για τον σχηματισμό (Jones *et al.*, 2001) και την παγίωση της μακροπρόθεσμης μνήμης (Jones *et al.*, 2001; Bozon *et al.*, 2002, 2003; Malkani *et al.*, 2004).

Παρόλα αυτά ο ακριβής του ρόλος στις διάφορες βιολογικές διεργασίες που λαμβάνει χώρα παραμένει άγνωστος (Boyer *et al.*, 2013). Σε έρευνα με ζεβρόψαρο (*Danio rerio*) συσχετίστηκε η γευστική αποστροφή με έκφραση του *egr-1*. Παρατηρήθηκαν διαφορετικές αντιδράσεις και αντίστοιχα έκφραση του γονιδίου, σε τροφές οι οποίες αποτελούνταν από διαφορετικά αμινοξέα σε σταθερή συγκέντρωση καταλήγοντας στην υπόθεση ότι η γευστική αποστροφή αποτελεί παράγοντα διέγερσης της έκφρασης του *egr-1* (Boyer *et al.*, 2013). Οι Knapska and Kaczmarek (2004) παρουσίασαν την ίδια συσχέτιση έκφρασης του *egr-1* και γευστικής αποστροφής σε πείραμα μάθησης με αρουραίους.

1.11.2 c-fos

Το *c-fos* αποτελεί γονίδιο πρώιμης έκφρασης (IEG). Η έκφραση του παρατηρείται σε νευρικές αντιδράσεις από ερεθίσματα του περιβάλλοντος (Matsuoka, 1997). Το πρωτεϊνικό προϊόν του *c-fos* λέγεται Fos και συμμετέχει στις ρυθμίσεις μεταγραφής των γονιδίων που απαιτούνται για μακροπρόθεσμες αλλαγές στην νευρική δραστηριότητα του κεντρικού νευρικού συστήματος. Οι περιοχές που εντοπίζεται έκφραση του *c-fos* σηματοδοτούν περιοχές ενεργοποίησης του νευρικού συστήματος και έχουν συνδεθεί και με τη μάθηση και την ιχθυλασία. Η ιχθυλασία, αποτελεί χαρακτηριστικό ειδών της οικογένειας Salmonidae, καθώς τα άτομα εντοπίζουν περιοχές με την όσφρηση για να οδηγηθούν στο ποτάμι που εκκολάφθηκαν. Οι Matsuoka *et al.*, το 1997 εντόπισαν αυξημένη έκφραση *c-fos* σε περιοχές του εγκεφάλου ιριδιζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) που εμπλέκονται με την ιχθυλασία.

Αυξημένη έκφραση του *c-fos* έχει επίσης παρατηρηθεί και κατά την έκθεση ιχθύων σε διάφορα περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Η περίπτωση ενός ραγδαίου πολλαπλασιασμού φυτοπλακτονικών οργανισμών έχει ως αποτέλεσμα την κατάρρευση του πληθυσμού (algal bloom) και αποτελεί μια κατάσταση stress για τα υπόλοιπα είδη. Άτομα του είδους *Fundulus heteroclitus* παρουσίασαν αυξημένη έκφραση *c-fos* σε περιοχές του τελεγκεφάλου που σχετίστηκε με την έκθεση τους σε ραγδαίο πολλαπλασιασμό φυτοπλακτού (Salierno, 2006). Αυξημένη έκφραση του *c-fos* έχει παρατηρηθεί στους ιχθύς σε καταστάσεις stress, όπως κατά τη μεταφορά, αλλά και σε πείραμα με δονήσεις, από μεταλλική ράβδο με λαστιχένια επένδυση που προσέκρουε σε μια από τις πλευρές της δεξαμενής (Bosch *et al.*, 2001, Salierno *et al.*, 2006). Το *c-fos* έχει παρατηρηθεί σε εγκεφάλους θηλαστικών και τρωκτικών να παρουσιάζει υψηλή έκφραση, σε χρονικό διάστημα λίγων λεπτών, σε μια κατάσταση stress που σχετίζεται με αυξημένη συγκέντρωση CO₂ (Sato *et al.*, 1992). Στους ιχθύες υψηλή

συγκέντρωση CO₂ στο αίμα (hypercapnia), οδήγησε σε έκφραση του c-fos σε περιοχές του εγκεφάλου, του κοινού λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) (Rimoldi, 2009).

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Ιχθύες

Το πείραμα διεξήχθη με άτομα Ευρωπαϊκού λαβρακιού (*Dicentrarchus labrax*) εγκλιματισμένα σε εργαστηριακές συνθήκες για περίπου 12 μήνες και ηλικίας 2+. Πριν την πειραματική διαδικασία, οι ιχθύες παρέμειναν σε δεξαμενή (1077 lt) κλειστού συστήματος θαλασσινού νερού (θερμοκρασία: 23 °C, τιμή pH: 7,6, δεσμευμένο οξυγόνο: 6,8 ppm και αλατότητα: 23 ‰) για περίπου 2 μήνες. Στα άτομα χορηγούνταν τροφή σε μορφή σύμπηκτου 2 φορές την εβδομάδα σε επίπεδο κορεσμού. Περίπου 1 μήνα πριν την περίοδο της πειραματικής διαδικασίας τα άτομα μεταφέρθηκαν σε 4 δεξαμενές (147 lt) με 30 άτομα ανά δεξαμενή. Μία φορά την ημέρα (11:00), εκτός σαββατοκύριακου χορηγούνταν τροφή (γαρίδα, μύδι, σύμπηκτα). Επιλέχτηκαν οι νωπές τροφές καθώς είχαν πιο έντονη οσμή και προκαλούσαν μεγαλύτερη παρακίνηση

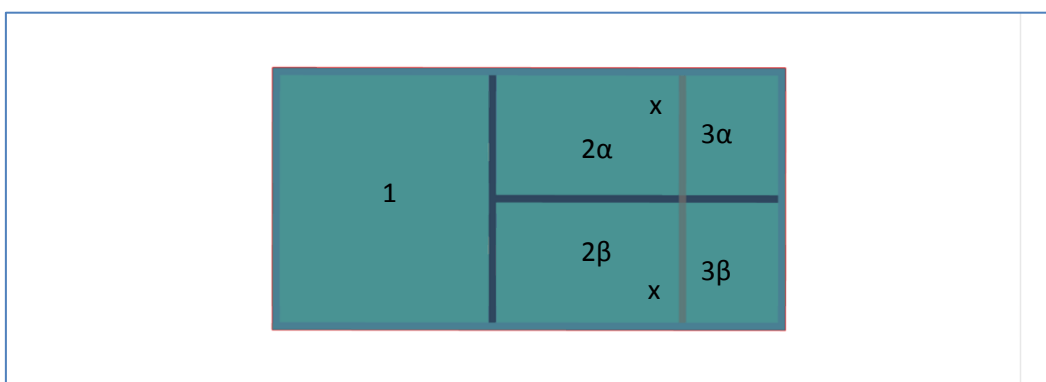
2.2 Πειραματική διαδικασία εκπαίδευσης

Αρχικά, το εκάστοτε προς εξέταση άτομο απομονώθηκε για 4 μέρες σε δεξαμενή (73.5 lt) ώστε να εγκλιματιστεί για την ατομική διαδικασία που θα ακολουθούσε στο λαβύρινθο. Κατά την περίοδο αυτών των 4 ημερών στα άτομα δεν χορηγήθηκε τροφή ώστε να έχουν μεγαλύτερο κίνητρο να εξερευνήσουν.

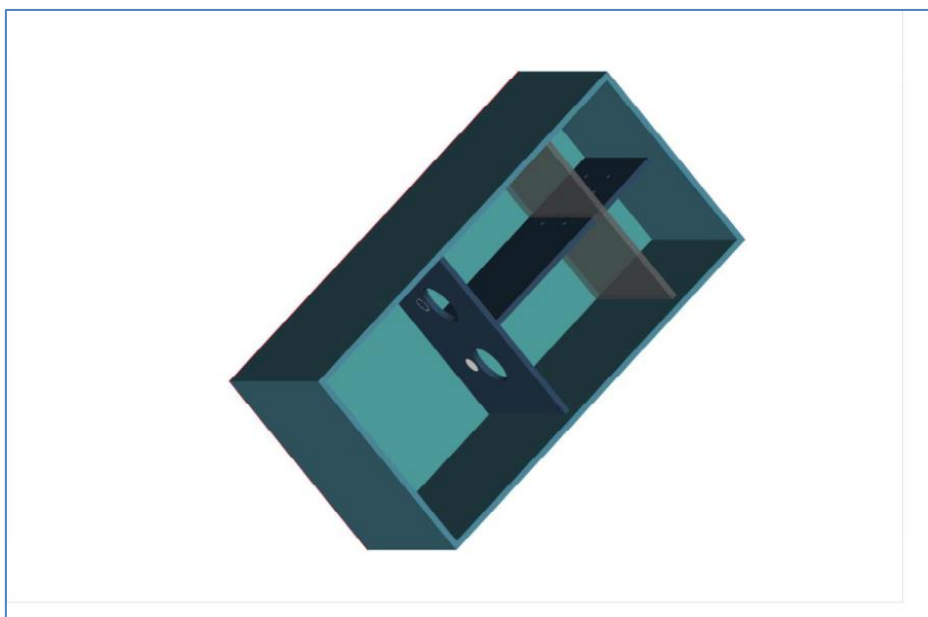
2.2.1 Λαβύρινθος

Χρησιμοποιήθηκαν 2 δεξαμενές όγκου 138 lt (97.5 cm x 47.5 cm x 30 cm), στις οποίες όλα τα πλευρικά τοιχώματα (εκτός της επιφανείας) ήταν καλυμμένα με φελιζόλ ανοιχτού γαλάζιου χρώματος, και στις οποίες τοποθετήθηκε κατάλληλα διαμορφωμένος λαβύρινθος κατασκευασμένος από Plexiglas χρώματος γαλάζιο (Εικόνα 5, 6). Το πρώτο διαμέρισμα του λαβυρίνθου ονομάστηκε χώρος εκκίνησης (1) (start box) και ήταν η αφετηρία της πειραματικής διαδικασίας. Ο χώρος εκκίνησης χωριζόταν με τον υπόλοιπο λαβύρινθο με κάθετο αδιαφανές τοίχωμα, που έφερε δύο στρογγυλές οπές, αριστερά και δεξιά (Εικόνα 6). Η κάθε οπή οδηγούσε είτε σε θάλαμο που περιείχε την επιβράβευση είτε σε θάλαμο χωρίς επιβράβευση (θάλαμοι 2α/2β, Εικόνα 5, 6). Οι θάλαμοι 2α και 2β χωρίζονταν με αδιαφανές κάθετο τοίχωμα. Η μορφή επιβράβευσης που επιλέχθηκε ήταν τόσο η παρουσία ομοειδούς ατόμου (οπτικό ερέθισμα) όσο και η χορήγηση τροφής. Από προηγούμενες έρευνες στην χωρική μάθηση σε λαβύρινθο με λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*), αποδείχτηκε ότι τα άτομα θεωρούν ένα ομοειδή τους σαν ελκυστικό οπτικό ερέθισμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μορφή επιβράβευσης (Benhaim *et al.*, a, b, c., 2013). Το ομοειδές άτομο τοποθετήθηκε στον θάλαμο 3α/3β (Εικόνα 5). Οι θάλαμοι 2 και 3 χωρίζονταν με κάθετο διαφανές τοίχωμα (Εικόνα 5, 6), ώστε μετά την είσοδο του υπό εξέταση ατόμου στο σωστό διαμέρισμα του θαλάμου 2, το ομοειδές άτομο-επιβράβευση να είναι αμέσως ορατό. Η τροφή, αποτελούνταν από τεμαχισμένη γαρίδα και μύδια τοποθετημένα σε διχτυωτό πλέγμα αναρτημένο στον θάλαμο 2 (Εικόνα 5). Το πλέγμα

Εικόνα 5. Κάτοψη λαβυρίνθου με αρίθμηση στους θαλάμους : 1: Χώρος εκκίνησης. 2α,2β: Θάλαμοι επιτυχίας – επιβράβευσης/ αποτυχίας – καμία ενέργεια (αριστερά ή δεξιά ανάλογα τη θέση του σημαδιού κατά τη δοκιμή. 3α,3β: Θάλαμος όπου βρισκόταν άτομο του ίδιου είδους – οπτικό ερέθισμα. x: σημείο χορήγησης τροφής.



Εικόνα 6. Λαβύρινθος σε τρισδιάστατη προβολή, όπου φαίνονται οι θέσεις του σημαδιού – οπτικού ερεθίσματος που οδηγεί από τον χώρο εκκίνησης στο θάλαμο επιβράβευσης.



της τροφής τοποθετούνταν αμέσως πριν την έναρξη της κάθε δοκιμής για να προκαλέσει με οσφρητικά ερεθίσματα το υπό εξέταση άτομο και ανανεωνόταν σε κάθε δοκιμή. Το διαχωριστικό τμήμα των θαλάμων 2α και 2β, ήταν διάτρητο ώστε, οι οσμές από την τροφή να εισέρχονται και στους δύο θαλάμους 2α και 2β, ανεξάρτητα ποιος περιέχει την επιβράβευση. Τέλος, για τον καλό αερισμό του νερού κατά την διάρκεια των δοκιμών, υπήρχαν αερόπετρες τόσο στον χώρο εκκίνησης (κατά μήκος του πρόσθιου τοιχώματος), όσο και στους θαλάμους 2α και 2β (μικρές στρογγυλές αερόπετρες στερεωμένες στην αντίθετη γωνία από εκείνη όπου τοποθετούνταν η τροφή. Οι θέσεις των αεροπετρών επιλέχτηκε έτσι ώστε να μην διαφοροποιηθεί το ρεύμα νερού που δημιουργούν μεταξύ της αριστερής και δεξιά πλευράς του λαβυρίνθου. Η πλήρωση του λαβυρίνθου με νέο νερό γινόταν κάθε 3 δοκιμές (δηλαδή, μετά την ολοκλήρωση της εκπαίδευσης της κάθε ημέρας για ένα άτομο ιχθύος).

2.2.2 Διαδικασία εκπαίδευσης

Η εκπαίδευση είχε σκοπό το υπό εξέταση άτομο να συνδυάσει το ουδέτερο ερέθισμα (λευκή διακριτική σήμανση κάτω από την οπή) με το θετικό ερέθισμα επιβράβευσης (παρουσία ομοειδούς ατόμου και χορήγηση τροφής). Το εξεταζόμενο άτομο, για να προσλάβει την επιβράβευση έπρεπε να μάθει να διέρχεται από την οπή εκείνη που ήταν σημασμένη με το

ουδέτερο ερέθισμα. Σε κάθε δοκιμή, το ερέθισμα που σηματοδοτούσε το σωστό διαμέρισμα εναλλασσόταν (αριστερά και δεξιά) για να αποφευχθεί η όποια επίδραση της αριστερής ή δεξιάς πλευράς του λαβυρίνθου.

Ένα άτομο θεωρήθηκε ότι έμαθε όταν κάθε ημέρα εκπαίδευσης βελτίωνε τον χρόνο επιτυχούς ολοκλήρωσης της διαδρομής του λαβυρίνθου και εισερχόταν στο σωστό διαμέρισμα σε διαδοχικές δοκιμές πολλές φορές.

Η ικανότητα μάθησης διερευνήθηκε σε δύο χρονικές περιόδους εκπαίδευσης, 8ήμερη και 3ήμερη εκπαίδευση:

8ήμερη εκπαίδευση: Εξετάστηκαν, ατομικά, 44 άτομα Ευρωπαϊκού λαβρακιού (Πίνακας 1). Κάθε άτομο υποβαλλόταν σε 3 δοκιμές ανά ημέρα εκπαίδευσης, δηλαδή συνολικά σε 24 δοκιμές.

3ήμερη εκπαίδευση: Εξετάστηκαν, ατομικά, 48 άτομα Ευρωπαϊκού λαβρακιού (Πίνακας 1). Κάθε άτομο υποβαλλόταν σε 3 δοκιμές ανά ημέρα εκπαίδευσης, δηλαδή συνολικά σε 9 δοκιμές.

Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε σε κάθε δοκιμή ήταν κοινή και για τις δύο χρονικές περιόδους εκπαίδευσης και αποτελούνταν από εξής στάδια: 1) Ήρεμη αλίευση του υπό εξέταση ατόμου και τοποθέτησή του στον χώρο εκκίνησης του λαβυρίνθου. 2) Παραμονή στον χώρο εκκίνησης για 5 min (εγκλιματισμός στο χώρο). Κατά την περίοδο αυτή, οι στρογγυλές οπές παρέμειναν κλειστές με ένα αδιαφανές συρόμενο κατακόρυφο τοίχωμα. 3) Αφαίρεση του συρόμενου τοιχώματος και ελεύθερη πρόσβαση μέσω των στρογγυλών οπών στους θαλάμους 2α και 2β. 4) Καταγραφή (βιντεοσκόπηση) της συμπεριφοράς του ιχθύος για μέγιστο χρόνο 30 min (=1800 sec). Εάν το υπό εξέταση άτομο ολοκλήρωνε επιτυχώς τον λαβύρινθο εντός των 30 min, τότε η δοκιμή διακόπτονταν, περιορίζοντας το άτομο στον χώρο επιβράβευσης (χρησιμοποιώντας τα συρόμενα τοιχώματα που έφρασαν την οπή στο στάδιο 2) και χορηγώντας επιπλέον 2-3 σύμπληκτα. Μετά την πάροδο 1 min το άτομο οδηγούνταν με ήπιο τρόπο (ανασηκώνοντας όλον τον λαβύρινθο και όχι σπρώχνοντας τον ιχθύ) προς το χώρο εκκίνησης, όπου περιοριζόταν εκ νέου (στάδιο 2) για την επόμενη δοκιμή της ημέρας. Εάν το υπό εξέταση άτομο δεν ολοκλήρωνε επιτυχώς τον λαβύρινθο σε μέγιστο χρόνο 30 min, γινόταν τοποθέτηση του κάθετου συρόμενου τοιχώματος που απέκλειε την πρόσβαση στις οπές και το άτομο ξεκινούσε την επόμενη δοκιμασία της ημέρας από το στάδιο 2. Μετά το πέρας και της 3^{ης} δοκιμής κάθε άτομο επανατοποθετούνταν στην αρχική δεξαμενή απομόνωσης έως την επόμενη ημέρα εκπαίδευσης. Όταν ένα άτομο κατά τη διάρκεια της δοκιμής δεν ολοκλήρωνε επιτυχώς το

λαβύρινθο, ο χρόνος ορίστηκε ως 1800 sec και αριθμός δοκιμής για το σύνολο θεωρήθηκε το 25 (8ήμερο) και 10 (3ήμερο).

Πίνακας 1. Βάρος και σωματομετρήσεις των ατόμων που συμμετείχαν στην 8ήμερη και 3ήμερη εκπαίδευση

	8-ήμερη εκπαίδευση	3-ήμερη εκπαίδευση
Αριθμός ατόμων	44	48
Βάρος (g)	112.3±5.86	121.6±8.65
Ολικό μήκος (Ο.μ., cm)	23.4±0.47	23.8±0.50
Σταθερό μήκος (Σ.μ., cm)	19.8±0.37	20.1±0.48
Συντελεστής ευρωστίας (Ο.μ.) [#]	0.873±0.0209	0.888±0.0154
Συντελεστής ευρωστίας (Σ.μ.) [#]	1.430±0.0405	1.469±0.0253

Συντελεστής ευρωστίας = Βάρος (g) x Μήκος (cm)⁻³ x 100

2.3 Δειγματοληψία εγκεφάλου

Με το πέρας της τελευταίας δοκιμής (24ης για την 8ήμερη εκπαίδευση και 9η για την 3ήμερη εκπαίδευση), κάθε άτομο αλιεύτηκε ήπια από τον λαβύρινθο και τοποθετήθηκε σε μπάνιο υπερβολικής δόσης αναισθητικής ουσίας (διάλυμα φαινοξυ-αιθανόλης 4ml/1lt, στάδιο 5 αναισθησίας < 30 sec). Στη συνέχεια, μετά από ατομικό ζύγισμα (ζυγός ακρίβειας 0.1 g) και μέτρηση του ολικού και σταθερού μήκους (με χρήση παχύμετρου ακριβείας 0,1 mm), πραγματοποιήθηκε η λήψη του εγκεφάλου. Ο εγκέφαλος χωρίστηκε σε 3 τμήματα, α) τελεγκέφαλος (T), β) υποθάλαμος και υπόφυση μαζί (YY), και γ) όλος ο λοιπός εγκέφαλος (ΛΕ). Τα δείγματα εγκεφάλου τοποθετήθηκαν σε αλουμινόχαρτο και καταψύχθηκαν άμεσα με εμβάπτιση σε υγρό άζωτο. Ο χρόνος που μεσολάβησε από τη στιγμή θανάτωσης του κάθε ατόμου μέχρι και την τοποθέτηση του δείγματος στο υγρό άζωτο λιγότερο από 2 min. Στη συνέχεια τα δείγματα διατηρήθηκαν στους -80°C μέχρι την ανάλυση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων.

2.4 Σχετική έκφραση γονιδίων

Από την ανάλυση της 8ήμερης και 3ήμερης εκπαίδευσης των ιχθύων, οι ιχθύες διακρίθηκαν σε 3 κατηγορίες (βλ. Αποτελέσματα): 1) Άτομα που μαθαίνουν (M), καθώς κάθε ημέρα βελτιώναν το χρόνο επιτυχούς ολοκλήρωσης της διαδρομής του λαβυρίνθου σε τουλάχιστον δύο διαδοχικές δοκιμές, 2) άτομα με ασαφή αποτελέσματα (M?), τα οποία δεν είχαν σταθερή απόδοση και 3) άτομα που δεν μαθαίνουν (ΔM), τα οποία ούτε δεν ολοκλήρωσαν σωστά τον λαβύρινθο. Επειδή κατά την 8ήμερη εκπαίδευση εντοπίστηκαν 7 M άτομα και κατά την 3ήμερη εκπαίδευση εντοπίστηκαν 5 M άτομα, η ανάλυση των γονιδίων περιορίστηκε σε αυτά τα άτομα και σε ίσο αριθμό (με τυχαία επιλογή) ατόμων ΔM από κάθε διάρκεια εκπαίδευσης αντίστοιχα, σε όλα τα τμήματα του εγκεφάλου που ελήφθησαν. Τα άτομα M? δεν αναλύθηκαν.

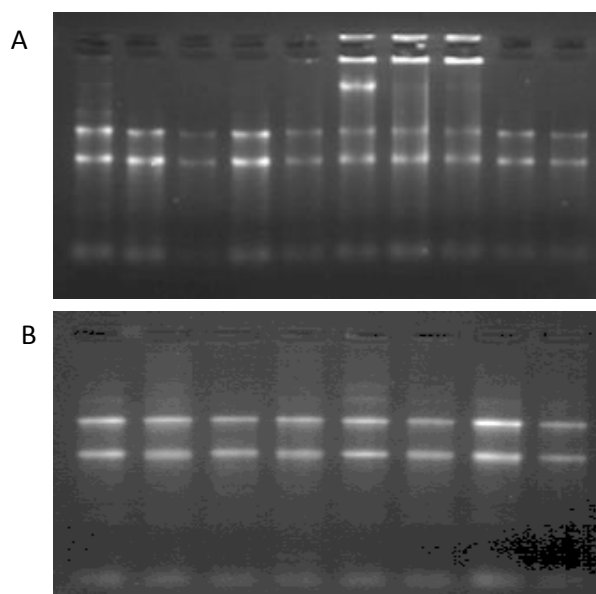
2.5 Απομόνωση ολικού RNA

Έγινε απομόνωση ολικού RNA στα δείγματα εγκεφάλου (τελεγκέφαλος, υποθάλαμος – υπόφυση και λοιπός εγκέφαλος) των λαβρακιών που εξετάστηκαν βάσει του πρωτοκόλλου Lysis and Homogenization of Fatty Tissues Using the Tissue Raptor, QIAzol Handbook, 01/2009. Ακολούθησε ποσοτικοποίηση του ολικού RNA με τη χρήση φωτομέτρου

μικροποσοτήτων και έλεγχος της ποιότητας του ολικού RNA με ηλεκτροφόρηση 1 μg RNA σε gel αγαρόζης 2%.

2.5.1 Απομάκρυνση γενωματικού DNA

Για την απομάκρυνση γενωματικού DNA ακολουθήθηκε κατεργασία των δειγμάτων με το ένζυμο DNase I (New England Biolabs) βάσει του θερμικού πρωτοκόλλου που προτείνει η κατασκευάστρια εταιρία. Χρησιμοποιήθηκαν 10μg RNA από κάθε δείγμα. Στη συνέχεια τα δείγματα κατακρημνίστηκαν με Sodium Acetate και επαναδιαλύθηκαν σε H₂O. Ακολούθησε εκ νέου ποσοτικοποίηση του ολικού RNA με τη χρήση φωτομέτρου μικροποσοτήτων και έλεγχος της ποιότητας του ολικού RNA με ηλεκτροφόρηση 1 μg RNA σε gel αγαρόζης 2% (Εικόνα 7).



Εικόνα 7: Αντιπροσωπευτική φωτογραφία δειγμάτων RNA σε gel αγαρόζης 2% πρίν (A) και μετά (B) την απομάκρυνση γενωματικού DNA

2.5.2 Αντίστροφη μεταγραφή σε cDNA

Πραγματοποιήθηκε αντίστροφη μεταγραφή του ολικού RNA σε cDNA με τη χρήση του PrimeScript RT reagent Kit, (Takara), 500ng ολικού RNA από κάθε δείγμα μεταγράφηκαν αντίστροφα σε cDNA με τη χρήση oligodT και τυχαίων εξανουκλεοτιδικών εκκινήτων.

2.5.3 Σχεδιασμός εκκινητών

Κατασκευάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές για qPCR για τα γονίδια *egr1*, *c-fos* και β -ακτίνη (ενδογενές γονίδιο) με τη χρήση του προγράμματος PerlPrimer με βάση τις ήδη δημοσιευμένες αλληλουχίες των μεταγράφων των εν λόγω γονιδίων στην GenBank (AJ537421.1 β -ακτίνη, DQ838581.1 *c-fos*, KC442100.1 *egr1*). Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για τα τρία γονίδια.

Πίνακας 2: Αλληλουχίες εκκινητών που κατασκευάστηκαν για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης για τα γονίδια της β -ακτίνης, του *c-fos* και του *egr1* και μεγέθη προϊόντων PCR

Γονίδιο	Εκκινητής	Αλληλουχία	Μέγεθος προϊόντος (bp)
β -ακτίνη	F-ACTb diclab	CTGTCCCTGTATGCCTCTG	212
	R-ACTb diclab	ACGCACGATTTCCCTCTC	
<i>c-fos</i>	F-cFOS diclab	ACCAGTCCTCTGATTCCC	137
	R-cFOS diclab	TGTCCATTCCATAGCCCT	
<i>egr1</i>	F-EGR1 diclab	GTCACATCCGCATCCAC	171
	R-EGR1 diclab	TGCCTCTTCCTCTCGTC	

2.5.4 Ποσοτική Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (qPCR)

Όλες οι αντιδράσεις έγιναν με τη χρήση του KAPA SYBR® FAST qPCR Kit (Kapa Biosystems) στο θερμικό κυκλοποιητή πραγματικού χρόνου ABI7500 (Applied Biosystems). Καταρχήν κατασκευάστηκαν πρότυπες καμπύλες (συγκέντρωση primers στα 200nM) όλων των γονιδίων που εξετάστηκαν (*egr1*, *c-fos*, β -ακτίνη) σε κάθε ιστό (τελεγκέφαλος (α), υποθάλαμος-υπόφυση (β), λοιπός εγκέφαλος (γ)) με μια σειρά αραιώσεων: 1:4, 1:16, 1:64, 1:256. Μετά την επιβεβαίωση της αποδοτικότητας (efficiency) των αντιδράσεων (90-110%) αναλύθηκαν τα δείγματα μεμονωμένα σε αραιώση 1:8 και η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του κάθε γονιδίου προσδιορίστηκε με βάση τη μέθοδο του Pfaffl (2001) χρησιμοποιώντας ως γονίδιο αναφοράς τη β -ακτίνη. Για όλες τις αντιδράσεις ακολουθήθηκε το εξής θερμικό πρωτόκολλο: 95°C 3', 40*(95 °C 5'', 60 °C 30''), ενώ στη συνέχεια ακολούθησε ανάλυση τήξης του προϊόντος της qPCR (melt curve analysis).

2.6 Στατιστική ανάλυση

Τα αποτελέσματα της 8ήμερης και 3ήμερης εκπαίδευσης αναλύθηκαν με μονοπαραγοντική ανάλυση παραλλακτικότητας (one-way ANOVA) ανάλογα με την ικανότητα μάθησης των ατόμων (άτομα που έμαθαν – M, άτομα που δεν έμαθαν – ΔM και άτομα με αρχικές ενδείξεις μάθησης – M?). Για κάθε χρονικό διάστημα εκπαίδευσης, ο μέσος χρόνος δοκιμών, ο αριθμός λανθασμένων εισόδων και το ποσοστό επιτυχημένων δοκιμών αναλύθηκαν με μονοπαραγοντική ανάλυση παραλλακτικότητας ανάλογα με την ημέρα εκπαίδευσης. Η επίδραση της ικανότητας μάθησης και του τμήματος του εγκεφάλου που αναλύθηκε στην έκφραση των γονιδίων *egr-1* και *c-fos* εξετάστηκαν με πολυπαραγοντική ανάλυση παραλλακτικότητας (multi-factor ANOVA). Όταν το επίπεδο σημαντικότητας ήταν σημαντικό ($P < 0.05$), οι μέσοι όροι συγκρίθηκαν με το κριτήριο Duncan. Όλες οι παράμετροι ελέγχθηκαν για την ισχύ της κανονικότητας και της ομοιογένειας της διασποράς, ενώ όπου δεν ίσχυαν έγιναν οι απαραίτητες μετατροπές (π.χ. λογάριθμος, τετραγωνική ρίζα, κτλ). Επίσης, με t-test συγκρίθηκε η σχετική έκφραση των παραπάνω γονιδίων μεταξύ των ατόμων που έμαθαν και των ατόμων που δεν έμαθαν για κάθε τμήμα του εγκεφάλου χωριστά. Η ενσωμάτωση της χρονικής διάρκειας εκπαίδευσης (8 ή 3 ημέρες) στην παραπάνω πολυπαραγοντική ανάλυση παραλλακτικότητας δεν παρουσίασε σημαντική επίδραση ούτε ως κύριος παράγοντας ούτε στις σχετικές αλληλεπιδράσεις. Έτσι, στο σύνολο των ατόμων που έμαθαν (δηλαδή της 8ήμερης και 3ήμερης εκπαίδευσης μαζί) υπολογίστηκαν οι συντελεστές συσχέτισης κατά Spearman μεταξύ α) της σχετικής έκφρασης των γονιδίων μεταξύ τους για κάθε τμήμα του εγκεφάλου και β) της σχετικής έκφρασης των γονιδίων και των αποτελεσμάτων μάθησης. Τα δεδομένα που παρουσιάζονται στο κείμενο και στους πίνακες αφορούν μέσους όρους \pm τυπικό σφάλμα χωρίς μετατροπές.

3. Αποτελέσματα εκπαίδευσης – μάθησης

3.1 8ήμερη εκπαίδευση

Από το σύνολο των ατόμων που εκπαιδεύτηκαν για 8 ημέρες (44 άτομα), το 16% θεωρήθηκε ότι έμαθε (M), περίπου το 39% ότι δεν έμαθε (ΔM), ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό (45.5% - M?) αφορούσε άτομα που ενώ έδειξαν ενδείξεις μάθησης, η συνολική εικόνα δεν πληρούσε τα κριτήρια που τέθηκαν ώστε ένα άτομο να θεωρηθεί ότι έμαθε (Πίνακας 3)

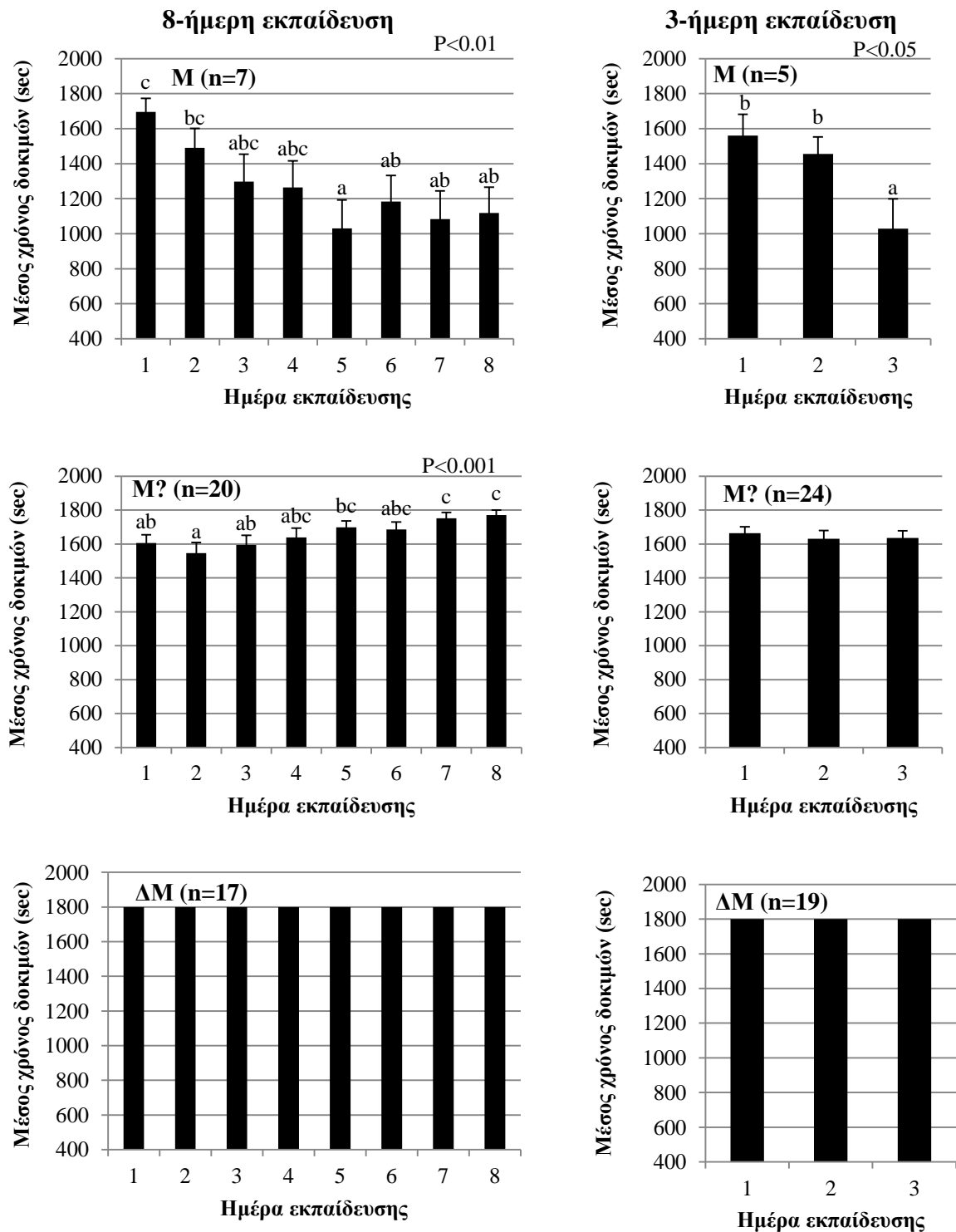
Πίνακας 3. Αποτελέσματα μάθησης κατά την 8ήμερη εκπαίδευση των ατόμων που έμαθαν (Μ), δεν έμαθαν (ΔΜ) και εκείνων με ενδείξεις μάθησης (Μ?)

	Μ	Μ?	ΔΜ	Επίπεδο σημαντικότη τας (<i>P</i>)
Αριθμός ατόμων (%)	7 (15.9)	20 (45.5)	17 (38.6)	
Πρώτη επιτυχημένη εισόδος				
Αριθμός δοκιμής	8.6±2.62 b	5.0±0.91 a	25.0±0.0 c	***
Χρόνος (sec)	621±186 a	1033±107 b	1800±0.0 c	***
Δύο διαδοχικές επιτυχημένες εισόδοι				
Αριθμός δοκιμής				
1 ^η φορά	10.5±2.44 a	12.7±2.20 a	25.0±0.0 b	***
2 ^η φορά	12.1±2.72 a	17.7±2.04 b	25.0±0.0 c	***
3 ^η φορά	14.6±2.31 a	21.0±1.71 b	25.0±0.0 b	***
Χρόνος (sec)				
1 ^η φορά	776±140 a	1254±115 b	1800±0 c	***
2 ^η φορά	819±123 a	1365±119 b	1800±0 c	***
3 ^η φορά	666±95 a	1521±115 b	1800±0 b	***
Μέσος χρόνος (sec) όλων των επιτυχημένων εισόδων	642±61 a	955±88 b	1800±0 c	***
Συνολικός αριθμός λανθασμένων εισόδων	18±4.8 b	9.7±4.4 ab	0.5±0.2 a	***
Ποσοστό επιτυχημένων δοκιμών (% συνολικού αριθμού δοκιμών)	43.5±5.29 a	16.0±2.02 b	0±0 c	***
Μέσος χρόνος (sec) των δοκιμών της τελευταίας ημέρας	1118±215 a	1771±29 b	1800±0 b	***
Μέσος χρόνος (sec) επιτυχημένων εισόδων της τελευταίας ημέρας	981±236 a	1712±88 b	1800±0 b	***
Αριθμός λανθασμένων εισόδων της τελευταίας ημέρας	4.4±2.4	3.2±2.4	0.1±0.1	ΜΣ

Συγκεκριμένα, τα άτομα Μ εισήλθαν 1^η φορά στο σωστό διαμέρισμα μετά από 8-9 δοκιμές (δηλαδή κατά την 3^η ημέρα εκπαίδευσης). Κατά την διάρκεια της μετέπειτα εκπαίδευσης (από την 4^η ημέρα εκπαίδευσης και μετά), τα άτομα αυτά εισέρχονταν συχνά, τουλάχιστον δύο διαδοχικές φορές, στο σωστό διαμέρισμα (δοκιμές 10-11, 12-13, 14-15) με μέσο χρόνο

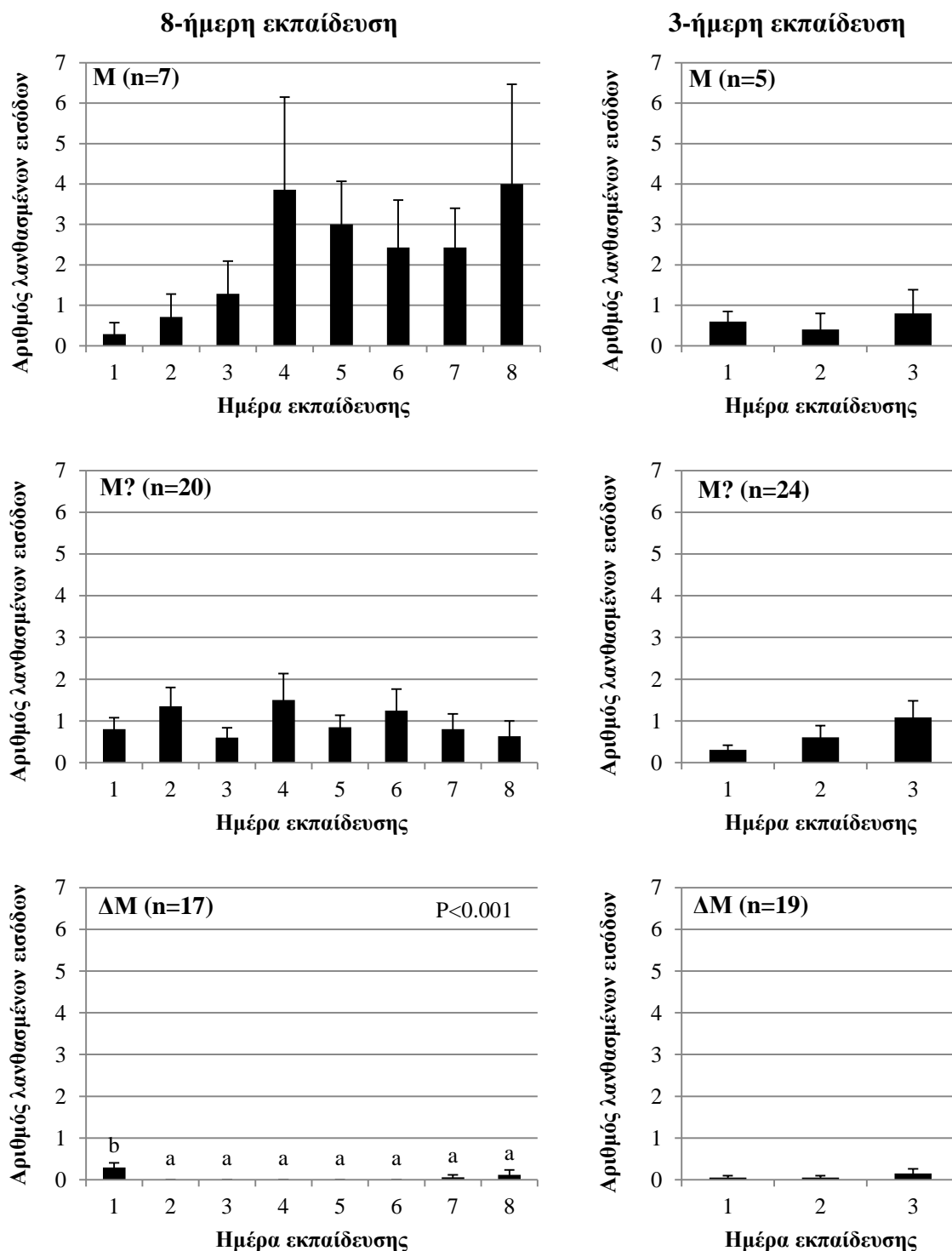
περίπου 13 min για την 1^η και 2^η φορά και περίπου 11 min για την 3^η φορά (Πίνακας 3). Γενικά, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του χρόνου των δοκιμών, ο οποίος μετά την 4^η ημέρα σταθεροποιήθηκε στα 16-20 min (Εικόνα 8).

Εικόνα 8. Μέσος χρόνος δοκιμών κατά την 8ήμερη και 3ήμερη εκπαίδευση των ατόμων που έμαθαν (M), δεν έμαθαν (ΔM) και εκείνων με ενδείξεις μάθησης (M?)



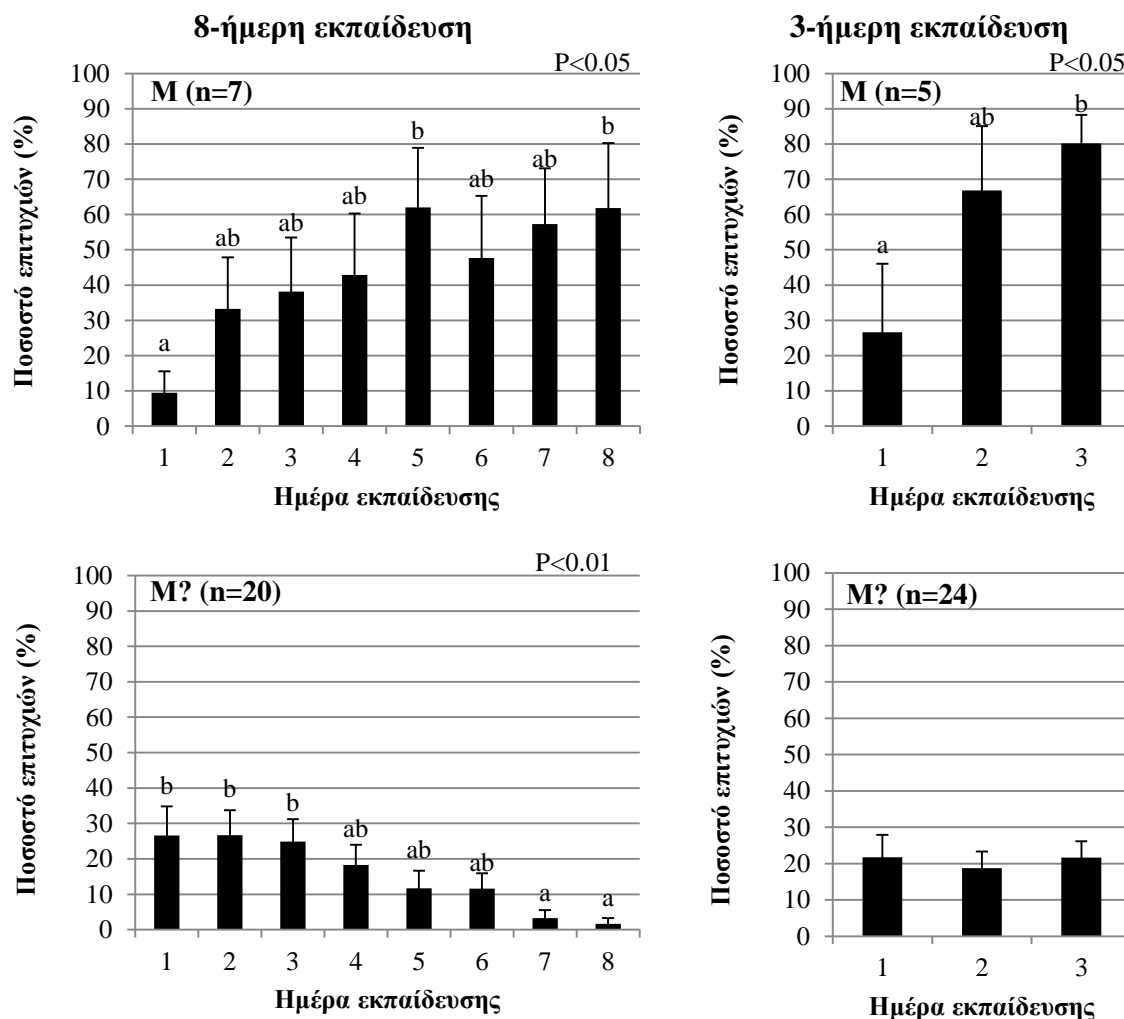
Ο μέσος χρόνος όλων των επιτυχημένων εισόδων στα Μ άτομα ήταν ο μικρότερος που παρατηρήθηκε (Πίνακας 3). Τα άτομα Μ ήταν εκείνα που έκαναν τις περισσότερες εισόδους στο λάθος διαμέρισμα (Πίνακας 3), ιδιαίτερα με την πάροδο των ημερών εκπαίδευσης (Εικόνα 9), και μετά την 4^η ημέρα τα άτομα αυτά εισέρχονταν στο λάθος διαμέρισμα, πριν την είσοδό τους στο σωστό, 2-4 φορές/ημέρα (Εικόνα 9).

Εικόνα 9. Αριθμός λανθασμένων εισόδων κατά την 8ήμερη και 3ήμερη εκπαίδευση των ατόμων που έμαθαν (Μ), δεν έμαθαν (ΔΜ) και εκείνων με ενδείξεις μάθησης (Μ?)



Τα άτομα Μ παρουσίασαν το μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχημένων δοκιμών συγκριτικά με τα Μ? και ΔΜ άτομα (Πίνακας 3). Το ποσοστό αυτό ήταν χαμηλό τις πρώτες ημέρες της εκπαίδευσης και σταδιακά βελτιώθηκε φτάνοντας το 50-60% μετά την 5^η ημέρα (Εικόνα 10).

Εικόνα 10. Ποσοστό επιτυχημένων δοκιμών κατά την 8ήμερη και 3ήμερη εκπαίδευση των ατόμων που έμαθαν (Μ), δεν έμαθαν (ΔΜ) και εκείνων με ενδείξεις μάθησης (Μ?)



Δεν Μαθαίνουν (ΔΜ): 0% ποσοστό επιτυχίας

Τέλος σημειώνεται ότι ο μέσος χρόνος των δοκιμών της τελευταίας ημέρας και ο μέσος χρόνος των επιτυχημένων εισόδων της τελευταίας ημέρας ήταν μικρότερος συγκριτικά με τα Μ? και ΔΜ άτομα (Πίνακας 3).

Τα άτομα ΔΜ ποτέ δεν εισήλθαν στο σωστό διαμέρισμα (Πίνακας 3, Εικόνα 8). Σημειώνεται ότι τα άτομα ΔΜ εισήλθαν στο λάθος διαμέρισμα μόνο κατά την 1^η, 7^η και 8^η ημέρα εκπαίδευσης (Εικόνα 9), ενώ ο αριθμός των λανθασμένων εισόδων ήταν πολύ μικρότερος των Μ ατόμων (Πίνακας 3, Εικόνα 9).

Τα άτομα M? παρουσίασαν ιδιαίτερη συμπεριφορά κατά την διάρκεια της εκπαίδευσης. Συγκεκριμένα, εισήλθαν για 1^η φορά στο σωστό διαμέρισμα μετά από 5 δοκιμές (2^η ημέρα εκπαίδευσης), αλλά οι μετέπειτα επιτυχημένες εισοδοι, για τουλάχιστον δύο διαδοχικές φορές, είχαν μεγάλη χρονική απόσταση μεταξύ τους (δοκιμές 12-13, 17-18, 21-22) (Πίνακας 3). Επιπλέον, δεν παρατηρήθηκε βελτίωση στους σχετικούς χρόνους, οι οποίοι ήταν σημαντικά μεγαλύτεροι των ατόμων M και κυμάνθηκαν από 21-23 min (Πίνακας 3). Γενικά, ο μέσος χρόνος όλων των επιτυχημένων εισόδων παρουσίασε ενδιάμεσες τιμές μεταξύ των M και ΔM ατόμων (Πίνακας 3). Κατά την διάρκεια της εκπαίδευσης παρατηρήθηκε μικρή και σταδιακή αύξηση του μέσου χρόνου των δοκιμών (Εικόνα 8), μικρός και σχετικά σταθερός αριθμός εισόδων στο λάθος διαμέρισμα (Εικόνα 9) και σταδιακή μείωση του ποσοστού επιτυχημένων δοκιμών (Εικόνα 10). Τέλος σημειώνεται ότι ο μέσος χρόνος των δοκιμών της τελευταίας ημέρας και ο μέσος χρόνος των επιτυχημένων εισόδων της τελευταίας ημέρας ήταν μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των M ατόμων και δεν διέφερε από τα ΔM άτομα (Πίνακας 3).

3.2 3ήμερη εκπαίδευση

Από το σύνολο των ατόμων που εκπαιδεύτηκαν για 3 ημέρες (48 άτομα), το 10% θεωρήθηκε ότι έμαθε (M), περίπου το 40% ότι δεν έμαθε (ΔM), και το 50% (M?) αν και παρουσίασε ενδείξεις μάθησης δεν πληρούσε τα κριτήρια που τέθηκαν ώστε ένα άτομο να θεωρηθεί ότι έμαθε (Πίνακας 4).

Πίνακας 4. Αποτελέσματα μάθησης κατά την 3ήμερη εκπαίδευση των ατόμων που έμαθαν (Μ), δεν έμαθαν (ΔΜ) και εκείνων με ενδείξεις μάθησης (Μ?)

	Μ	Μ?	ΔΜ	Επίπεδο σημαντικότη τας (<i>P</i>)
Αριθμός ατόμων (%)	5 (10.4)	24 (50.0)	19 (39.6)	
Πρώτη επιτυχημένη εισόδος				
Αριθμός δοκιμής	3.8±0.97 a	4.7±0.51 a	10.0±0.0 b	***
Χρόνος (sec)	1176±279 a	1093±90 a	1800±0.0 b	***
Δύο διαδοχικές επιτυχημένες εισοδοί				
Αριθμός δοκιμής				
1 ^η φορά	4.7±0.97 a	8.0±0.65 b	10.0±0.0 b	***
2 ^η φορά	6.1±1.12 a	9.0±0.46 b	10.0±0.0 b	***
3 ^η φορά	7.3±1.23 a	9.7±0.27 b	10.0±0.0 b	***
Χρόνος (sec)				
1 ^η φορά	1122±246 a	1576±80 b	1800±0 b	***
2 ^η φορά	1026±259 a	1660±69 b	1800±0 b	***
3 ^η φορά	1182±264 a	1750±50 b	1800±0 b	***
Μέσος χρόνος (sec) όλων των επιτυχημένων εισόδων	929±179 a	1005±73 a	1800±0 b	***
Συνολικός αριθμός λανθασμένων εισόδων	1.8±0.8 b	2.2±0.4 b	0.3±0.1 a	***
Ποσοστό επιτυχημένων δοκιμών (% συνολικού αριθμού δοκιμών)	55.6±9.30 a	20.4±2.28 b	0±0 c	***
Μέσος χρόνος (sec) των δοκιμών της τελευταίας ημέρας	856±286 a	1642±37 b	1800±0 b	***
Μέσος χρόνος (sec) επιτυχημένων εισόδων της τελευταίας ημέρας	746±237 a	1373±100 b	1800±0 c	***
Αριθμός λανθασμένων εισόδων της τελευταίας ημέρας	0.8±0.6 b	1.1±0.4 b	0.0±0.0 a	**

Τα άτομα Μ εισήλθαν 1^η φορά στο σωστό διαμέρισμα κατά την 2^η ημέρα εκπαίδευσης (δοκιμές 3-4, Πίνακας 4) και στη συνέχεια εισέρχονταν συχνά τουλάχιστον δύο διαδοχικές φορές (δοκιμές 4-5, 6-7, 7-8) στο σωστό διαμέρισμα με μέσο χρόνο περίπου 18 min (Πίνακας 4). Γενικά, παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του χρόνου των δοκιμών, ο οποίος την 3^η ημέρα ήταν 16 min (Εικόνα 8). Ο μέσος χρόνος όλων των επιτυχημένων εισόδων στα Μ άτομα δεν διέφερε από τον αντίστοιχο χρόνο των Μ? αλλά ήταν μικρότερος από εκείνον των ΔΜ ατόμων (Πίνακας 4). Τα άτομα Μ έκαναν περισσότερες λανθασμένες εισόδους από τα ΔΜ άτομα αλλά όχι και από τα Μ? άτομα (Πίνακας 4, Εικόνα 9). Τα άτομα Μ παρουσίασαν το μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχημένων δοκιμών συγκριτικά με τα Μ? και ΔΜ άτομα (Πίνακας 4). Το ποσοστό αυτό ήταν χαμηλό τις πρώτες ημέρες της εκπαίδευσης και γρήγορα βελτιώθηκε φτάνοντας το 80% την 3^η ημέρα (Εικόνα 10). Τέλος σημειώνεται ότι ο μέσος χρόνος των επιτυχημένων εισόδων της τελευταίας ημέρας στα Μ άτομα ήταν ο μικρότερος που παρατηρήθηκε, ενώ ο μέσος χρόνος των δοκιμών της τελευταίας ημέρας ήταν μικρότερος τόσο από τα Μ? όσο και από τα ΔΜ άτομα (Πίνακας 4).

Όπως παρατηρήθηκε και στην 8ήμερη εκπαίδευση, τα άτομα ΔΜ ποτέ δεν εισήλθαν στο σωστό διαμέρισμα (Πίνακας 4, Εικόνα 8). Σημειώνεται ότι τα άτομα ΔΜ εισήλθαν στο λάθος διαμέρισμα και τις 3 ημέρες εκπαίδευσης (Εικόνα 9), ενώ ο αριθμός των λανθασμένων εισόδων ήταν πολύ μικρότερος των Μ ατόμων (Πίνακας 4, Εικόνα 9).

Τα άτομα Μ? εισήλθαν για 1^η φορά στο σωστό διαμέρισμα κατά την 2^η ημέρα εκπαίδευσης (δοκιμές 4-5), αλλά δεν εισήλθαν δύο διαδοχικές φορές στο σωστό διαμέρισμα παρά μόνο κατά τις δοκιμές 7-8 και 8-9, δηλαδή την 3^η ημέρα εκπαίδευσης, με μέσο χρόνο επιτυχημένης εισόδου περίπου 27 min (Πίνακας 4) και χωρίς να παρατηρηθεί βελτίωση του χρόνου κατά την εκπαίδευση (Εικόνα 8). Ο μέσος χρόνος όλων των επιτυχημένων εισόδων δεν διέφερε από τον αντίστοιχο χρόνο των Μ ατόμων και ήταν μικρότερος από εκείνον των ΔΜ ατόμων (Πίνακας 4). Επίσης, κατά την διάρκεια της εκπαίδευσης παρατηρήθηκε μικρός αριθμός λανθασμένων εισόδων (παρόμοιος με τα Μ άτομα, Πίνακας 4, Εικόνα 9) και σταθερά μικρό ποσοστό επιτυχημένων δοκιμών (Πίνακας 4, Εικόνα 10). Τέλος σημειώνεται ότι ο μέσος χρόνος επιτυχημένων εισόδων της τελευταίας ημέρας παρουσίασε ενδιάμεση τιμή μεταξύ των Μ και ΔΜ ατόμων, αλλά ο μέσος χρόνος των δοκιμών της τελευταίας ημέρας ήταν μεγαλύτερος από τον αντίστοιχο των Μ ατόμων και δεν διέφερε από τα ΔΜ άτομα (Πίνακας 4).

3.3 Αποτελέσματα έκφρασης γονιδίων *egr-1* και *c-fos*

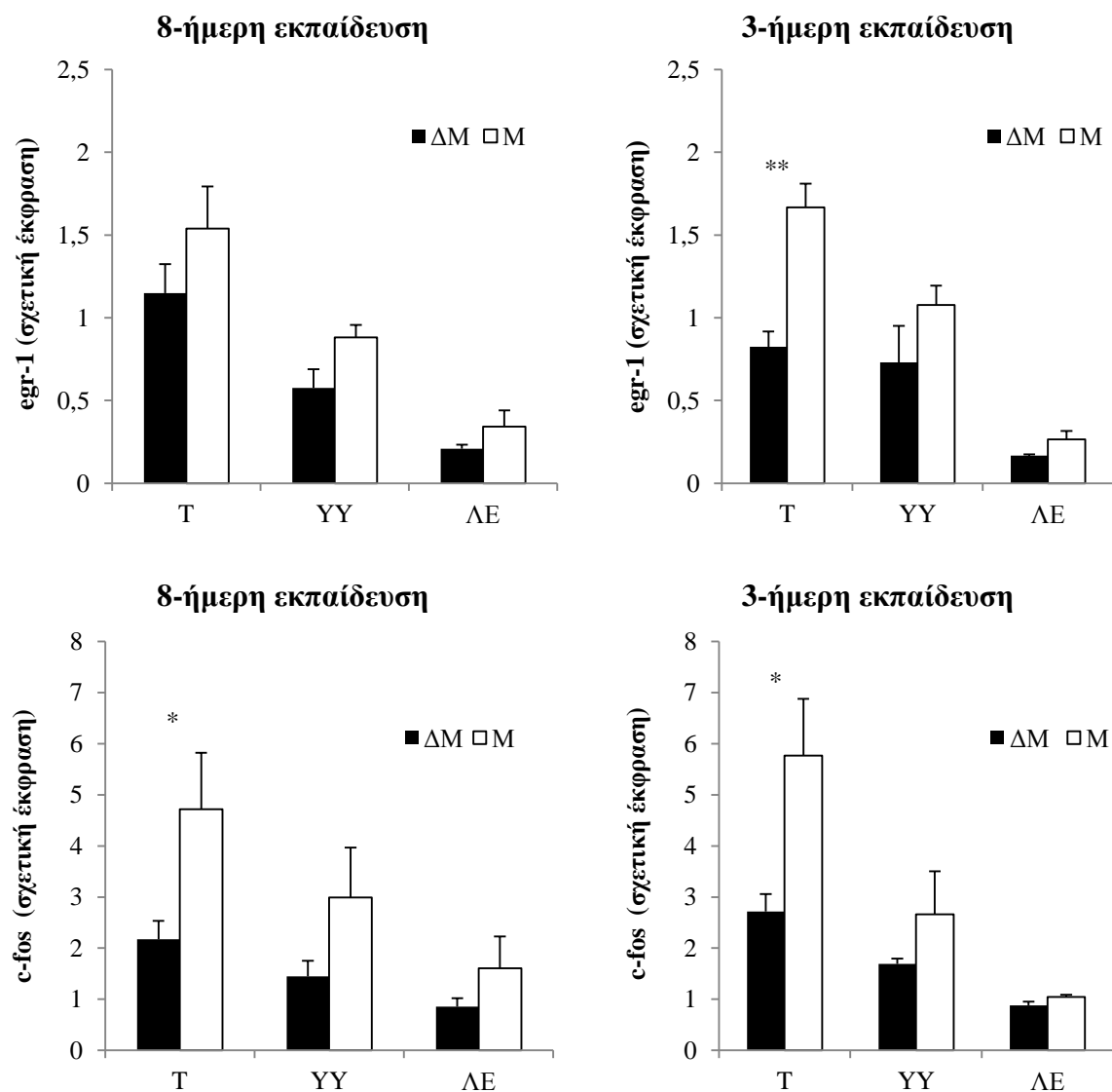
Η σχετική έκφραση των γονιδίων *egr-1* και *c-fos* ήταν στατιστικά σημαντικά αυξημένη στα άτομα Μ συγκριτικά με τα άτομα ΔΜ, τόσο μετά από την 8ήμερη όσο και μετά την 3ήμερη εκπαίδευση (Πίνακας 5). Επίσης, διαπιστώθηκε, ότι σε όλα τα τμήματα του εγκεφάλου που εξετάστηκαν, η σχετική έκφραση των γονιδίων *egr-1* και *c-fos* ήταν μεγαλύτερη στον τελεγκέφαλο, μικρότερη στον υποθάλαμο/υπόφυση και ακόμα μικρότερη στον λοιπό εγκέφαλο (Πίνακας 5).

Πίνακας 5. Σχετική έκφραση γονιδίων *egr-1* και *c-fos* ανάλογα με την ικανότητα μάθησης (ΙΜ) και το τμήμα του εγκεφάλου (ΤΕ) μετά από την 8ήμερη και 3ήμερη εκπαίδευση

	<i>egr-1</i>	<i>c-fos</i>
8-ήμερη εκπαίδευση (n=7)		
Ικανότητα μάθησης (ΙΜ)		
M	0.95±0.151 b	3.19±0.600 b
ΔΜ	0.64±0.109 a	1.49±0.200 a
Τμήμα εγκεφάλου (ΤΕ)		
T	1.34±0.158 c	3.45±0.661 c
ΥΥ	0.72±0.080 b	2.16±0.506 b
ΛΕ	0.27±0.049 a	1.20±0.307 a
Two-way Anova		
ΙΜ	**	**
ΤΕ	***	***
ΙΜ x ΤΕ	ΜΣ	ΜΣ
3-ήμερη εκπαίδευση (n=5)		
Ικανότητα μάθησης (ΙΜ)		
M	1.00±0.165 b	3.31±0.710 b
ΔΜ	0.57±0.107 a	1.77±0.246 a
Τμήμα εγκεφάλου (ΤΕ)		
T	1.25±0.162 c	4.24±0.748 c
ΥΥ	0.90±0.131 b	2.23±0.476 b
ΛΕ	0.22±0.029 a	0.95±0.050 a
Two-way Anova		
ΙΜ	***	**
ΤΕ	***	***
ΙΜ x ΤΕ	*	ΜΣ

Η αναλυτική σύγκριση της σχετικής έκφρασης των γονιδίων μεταξύ των Μ και ΔΜ ατόμων για κάθε τμήμα του εγκεφάλου χωριστά (t-test), έδειξε ότι στη δήμερη εκπαίδευση η έκφραση c-fos ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα Μ άτομα σε σχέση με τα ΔΜ άτομα στον τελεγκέφαλο (Εικόνα 11). Στην 3ήμερη εκπαίδευση, τόσο η έκφραση του egr-1 όσο και του c-fos ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα Μ άτομα συγκριτικά με τα ΔΜ άτομα, στον τελεγκέφαλο (Εικόνα 11).

Εικόνα 11. Σχετική έκφραση των γονιδίων egr-1 και c-fos στον τελεγκέφαλο (T), υποθάλαμο/υπόφυση (YY) και στο λοιπό τμήμα εγκεφάλου (ΛΕ) σε άτομα που έμαθαν (M) και δεν έμαθαν (ΔΜ) μετά από την δήμερη και 3ήμερη εκπαίδευση (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, t-test)



Για τα Μ άτομα, σε κάθε τμήμα του εγκεφάλου που εξετάστηκε, η έκφραση του egr-1 παρουσίασε θετική συσχέτιση με την έκφραση του c-fos και ο μεγαλύτερος συντελεστής συσχέτισης κατά Spearman παρατηρήθηκε για τα γονίδια του τελεγκεφάλου (Πίνακας 6). Επίσης, η έκφραση του egr-1 στον τελεγκέφαλο παρουσίασε θετική συσχέτιση τόσο με την έκφραση του egr-1 όσο και του c-fos του λοιπού εγκεφάλου, ενώ η έκφραση του c-fos του τελεγκεφάλου παρουσίασε θετική συσχέτιση με την έκφραση του c-fos του υποθαλάμου/υπόφυση (Πίνακας 6).

Πίνακας 6. Συντελεστές συσχέτισης κατά Spearman μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων egr-1 και c-fos στον τελεγκέφαλο (T), υποθάλαμο/υπόφυση (YY) και στο λοιπό τμήμα εγκεφάλου (ΛΕ) για τα άτομα που έμαθαν (M, n=12)

	c-fos T	egr-1 YY	c-fos YY	egr-1 ΛΕ	c-fos ΛΕ
egr-1 T	0.7364*	0.0364	0.3818	0.8455**	0.8636**
c-fos T		0.4182	0.6636*	0.4727	0.8273**
egr-1 YY			0.6364*	0.0000	0.3000
c-fos YY				0.4182	0.6000
egr-1 ΛΕ					0.7000*

Επιπλέον, για τα Μ άτομα, στον τελεγκέφαλο, η σχετική έκφραση του egr-1 συσχετίστηκε αρνητικά με τον μέσο χρόνο των δοκιμών της τελευταίας ημέρας εκπαίδευσης και με τον μέσο χρόνο των επιτυχημένων εισόδων της τελευταίας ημέρας, δηλαδή η αυξημένη έκφραση του γονιδίου συνδέεται με χαμηλότερους χρόνους επιτυχημένων εισόδων (Πίνακας 7). Παρόμοια αρνητική συσχέτιση παρατηρήθηκε για το c-fos και τον μέσο χρόνο των επιτυχημένων εισόδων της τελευταίας ημέρας στον τελεγκέφαλο, καθώς και το c-fos και τον μέσο χρόνο των δοκιμών της τελευταίας ημέρας εκπαίδευσης στον λοιπό εγκεφαλο (Πίνακας 7). Δεν παρατηρήθηκε καμία άλλη σημαντική συσχέτιση της έκφρασης των γονιδίων egr-1 και c-fos με τα άλλα αποτελέσματα της μάθησης.

Πίνακας 7. Συντελεστές συσχέτισης κατά Spearman μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων και αποτελεσμάτων μάθησης στον τελεγκέφαλο (T), υποθάλαμο/υπόφυση (YY) και στο λοιπό τμήμα εγκεφάλου (ΛΕ) για τα άτομα που έμαθαν (M, n=12)

	Τελεγκέφαλος (T)		Υποθάλαμος- Υπόφυση (YY)		Λοιπός εγκέφαλος (ΛΕ)	
	egr-1	c-fos	egr-1	c-fos	egr-1	c-fos
Μέσος χρόνος (sec)						
όλων των επιτυχημένων εισόδων	-0.1455	-0.0727	0.1455	- 0.1909	- 0.3636	-0.0545
Ποσοστό επιτυχημένων δοκιμών (% συνολικού αριθμού δοκιμών)	-0.3007	-0.4328	-0.3007	- 0.3645	- 0.4282	-0.1868
Μέσος χρόνος (sec) των δοκιμών της τελευταίας ημέρας	- 0.7352*	-0.5388	0.0091	0.2197	- 0.5571	- 0.6530*
Μέσος χρόνος (sec) επιτυχημένων εισόδων της τελευταίας ημέρας	- 0.6333*	-0.6515*	-0.3508	- 0.4920	- 0.4920	-0.4237

4. Συζήτηση

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε χαρακτηρίστηκαν 3 ομάδες ιχθύων βάσει του βαθμού επιτυχούς ολοκλήρωσης του λαβυρίνθου. Αυτά που έμαθαν να ολοκληρώνουν τον σκοπό τους στο λαβύρινθο (M), αυτά που δεν κατάφεραν ποτέ να ολοκληρώσουν το σκοπό τους (ΔM) και αυτά που δεν τηρούσαν το κριτήριο επιτυχίας (M?). Χρησιμοποιήθηκε ως επιβράβευση η χορήγηση τροφής και η εύρεση του ομοειδούς ατόμου που βρισκόταν σε διαμέρισμα του κατάλληλα διαμορφωμένου λαβυρίνθου. Τα άτομα προς εξέταση είχαν τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσουν οπτικό ερέθισμα και οσφρητικό ερέθισμα για να ολοκληρώσουν επιτυχώς τον λαβύρινθο και στις 2 εκπαιδεύσεις (8ήμερη και 3ήμερη).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, τα άτομα M του 8ημέρου ήταν παρόμοιο ποσοστό με τα άτομα M του 3ημέρου, τα άτομα M? του 8ημέρου παρόμοιο ποσοστό με τα άτομα M? του 3ημέρου και τα άτομα ΔM του 8ημέρου παρόμοιο ποσοστό με τα άτομα ΔM του 3ημέρου (πίνακας 3, πίνακας 4). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το 10-15% των 92 ατόμων που εξετάστηκαν τηρούσαν το κριτήριο μάθησης και για τις 2 διάρκειες της εκπαίδευσης. Οι Wood *et al.* (2011), σε πείραμα χωρικής μάθησης που συνδυάστηκε με έκφραση σχετικών IEGs (*egr-1*, *c-fos*, *bdnf*), σε άτομα του είδους *Astatotilapia burtoni*, αναφέρουν στα αποτελέσματά τους ότι, από τα 73 άτομα που εξετάστηκαν, το 30% ήταν άτομα M, το 61% άτομα M? και το 8% άτομα ΔM. Συγκριτικά με την παρούσα μελέτη, παρατηρήθηκε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό ατόμων M, λίγο υψηλότερο για τα άτομα M? και κατά πολύ μικρότερο ατόμων ΔM. Επί προσθέτως και στην περίπτωση των Wood *et al.* (2011) παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση των γονιδίων, στον τελεγκέφαλο των ατόμων M συγκριτικά με τα ΔM και τα M?, ενώ παρατηρήθηκε θετική συσχέτιση μεταξύ όλων των γονιδίων. Συμπερασματικά η έκφραση των γονιδίων σχετίζεται με την μάθηση και την επιτυχή ολοκλήρωση ενός λαβυρίνθου αλλά φαίνεται ότι το είδος *Astatotilapia burtoni* έχει μεγαλύτερη ικανότητα μάθησης από το Ευρωπαϊκό λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*).

Είναι γεγονός ότι η διερεύνηση της ικανότητας μάθησης του Ευρωπαϊκού λαβρακιού χρειάστηκε πολύ περισσότερες δοκιμές με μεγαλύτερο χρόνο μάθησης συγκριτικά με άλλα είδη ιχθύων που έχουν μελετηθεί. Πιο συγκεκριμένα οι Agrillo *et al.* (2012), σε πείραμα συντελεστικής εξαρτημένης μάθησης (*operant conditioning*) με άτομα του είδους *Gambusia holbrooki*, για τη διερεύνηση της ικανότητας του είδους να επιλέγει μεταξύ 2 ομάδων με οπτικά ερεθίσματα, βρήκαν ότι σε συνολικά 12 δοκιμές, (4 δοκιμές/ημέρα για 3 διαδοχικές μέρες) το 27-36% των ατόμων δεν τηρούσε το κριτήριο μάθησης, το 68,8% το τηρούσε, ενώ ένα υπόλοιπο ~5% ήταν άτομα ΔM που παρέμειναν στη θέση καταφύγιο του λαβυρίνθου και θεωρήθηκαν φοβισμένα. Οι Williams *et al.* (2002) σε μια σειρά πειραμάτων με ζεβρόψαρο

(*Danio rerio*), που έπρεπε να μάθει να επιλέγει τη σωστή πλευρά σε λαβύρινθο σχήματος «T» για την εύρεση τροφής, βρήκαν ότι μέχρι και τη δοκιμή 13,9 (από συνολικά 28 με χρόνο 10sec/δοκιμή για 2 μέρες) τα άτομα είχαν επιτύχει τον σκοπό τους.

Ο αριθμός των εργασιών που υπάρχει όσον αφορά την ικανότητα μάθησης του Ευρωπαϊκού λαβρακιού είναι περιορισμένος. Σύμφωνα με τους Benhaim *et al.* (2013a) σε πείραμα, που διερευνήθηκε η προτίμηση βάσει της σύστασης της τροφής, σε λαβύρινθο σχήματος «T» με Ευρωπαϊκό λαβράκι και χρήση ομοειδούς σαν οπτικό ερέθισμα, βρέθηκε ότι ένας μεγάλο ποσοστό ατόμων (60%) ανήκε στην κατηγορία των «αναποφάσιστων» ενώ οι επιτυχείς χρόνοι κυμαίνονταν από 3.8 έως 372 sec που είναι γενικά μικρότεροι από τους μέσους χρόνους επιτυχίας της παρούσας έρευνας. Σε άλλη έρευνα των Benhaim *et al.* (2013b), μεταξύ εκτρεφόμενων και ελεύθερα διαβιούντων ατόμων Ευρωπαϊκού λαβρακιού, διερευνήθηκε με λαβύρινθο σχήματος «T» η χρήση ομοειδούς ως οπτικό ερέθισμα παρακίνησης. Η πειραματική συνθήκη προέβλεπε μια δοκιμή των 20 λεπτών ανά άτομο με 5 λεπτά εξοικείωση να προηγείται. Βρέθηκε ότι όλα τα άτομα επέδειξαν κοινωνική διάθεση με το ομοειδές τους και θεωρήθηκε ότι είναι μια αντίδραση που πιθανότατα εκδηλώνεται σε κατάσταση απουσίας καταφυγίου για την «καταπολέμηση» του stress. Μια ακόμα έρευνα των Benhaim *et al.* (2013c) είχε ως σκοπό τη διερεύνηση της ικανότητας Ευρωπαϊκού λαβρακιού να διακρίνει ένα οπτικό ερέθισμα με τη χρήση ομοειδούς ως επιβράβευση σε λαβύρινθο σχήματος «T», με 3 δοκιμές/ημέρα για 3 συνεχόμενες ημέρες. Η κάθε δοκιμή είχε διάρκεια 10 λεπτών και προηγούνταν 5 λεπτά εξοικείωση στο θάλαμο εκκίνησης. Βρέθηκε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ατόμων τηρούσε το κριτήριο επιτυχίας πλησιάζοντας την περιοχή του ομοειδούς ενώ ο χρόνος επιτυχίας ήταν μικρότερος του 1 λεπτού. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκαν και άτομα που παρέμειναν στο θάλαμο εκκίνησης κατά τη διάρκεια και των 3 δοκιμών και θεωρήθηκε ότι βρίσκονταν σε κατάσταση stress ενώ υποστηρίχθηκε ότι στην περίπτωση αυτή δεν θα έπρεπε να γίνουν περισσότερες δοκιμές.

Το Ευρωπαϊκό λαβράκι φαίνεται ότι διαθέτει γνωστικές ικανότητες, που όμως λόγω απουσίας μιας σχετικής πειραματικής συνθήκης και κοινής μεθοδολογίας οι συγκρίσεις μεταξύ ειδών αλλά και ατόμων του ίδιου είδους πρέπει να γίνονται με επιφύλαξη.

Όσον αφορά την έκφραση των πρώιμων γονιδίων (IEGs), συμβαίνει κατά τον σχηματισμό της μάθησης. Κατά τις 3-4 ημέρες από το τέλος της 8ήμερης εκπαίδευσης δεν παρατηρήθηκε περαιτέρω βελτίωση του χρόνου επιτυχημένων εισόδων, αλλά σταθεροποίηση. Με βάσει το κριτήριο αυτό έγινε η 3ήμερη εκπαίδευση που θεωρήθηκε ότι θα είναι πιο κοντά στην ολοκλήρωση της μάθησης και συνεπώς θα δικαιολογούνται καλύτερα τα αποτελέσματα της γονιδιακής έκφρασης. Οι σημαντικές αρνητικές συσχετίσεις που βρέθηκαν για την 3ήμερη εκπαίδευση και ενισχύουν ότι τα γονίδια *egr-1* και *c-fos* εκφράζονται κατά τη μάθηση των

Μ ατόμων αφού αφορούν χρόνους της τελευταίας ημέρας, δηλαδή της ημέρας δειγματοληψίας.

Κατά την δήμερη εκπαίδευση, μετά την 5^η ημέρα δοκιμών, η επίδοση των ατόμων Μ σταθεροποιήθηκε (Εικόνα 10). Πιθανότατα, η επίδοση αυτή των ατόμων Μ του δημέρου, αποδίδεται στην περίπτωση της εξοικείωσης (habituation) και στο γεγονός ότι η ένταση της εξερευνητικής δραστηριότητας μειώνεται με τον αυξανόμενο αριθμό δοκιμών (Herrera *et al.*, 2014). Η εξοικείωση, θεωρείται μια αυτοματοποιημένη διεργασία του εγκεφάλου. Αφορά την σταδιακή μείωση της αντίδρασης σε ένα ερέθισμα που επαναλαμβάνεται τακτικά (Lieberman 2000). Αποτέλεσμα της εξοικείωσης είναι, το άτομο που εκτίθεται σε κάποιο ερέθισμα τελικά να μην αντιδρά καθόλου σε αυτό. Σε πείραμα με κυπρίνο που δέχτηκε επαναλαμβανόμενα ψυχρά σοκ, παρατηρήθηκε ότι τα επίπεδα κορτιζόλης στο αίμα του ήταν χαμηλότερα από εκείνα ατόμων του ίδιου είδους που δέχτηκαν μια μόνο φορά το ψυχρό σοκ, που υποδηλώνει την εξοικείωση του είδους στο φυσικό αυτό ερέθισμα (Tanck *et al.*, 2000). Επί προσθέτως οι ιχθύες κατά την τοποθέτηση τους σε ένα νέο περιβάλλον βρίσκονται άμεσα σε μια κατάσταση stress. Η ύπαρξη ομοειδούς ατόμου θα παρέχει μια θετική επίδραση στην κατάσταση αυτή ενώ έχει αποδειχτεί ότι η αίσθηση της ομάδας αυξάνει και τους ρυθμούς ανάπτυξης και την αυτοπεποίθηση απέναντι σε θηρευτές (Benhaim *et al.*, 2013). Οι Al-Imari *et al.*, το 2008 παρατήρησαν φαινόμενα εξοικείωσης σε ζεβρόψαρο (*Danio rerio*), που σχετίζονταν με τον χρόνο που παρέμενε ένα άτομο κοντά σε ένα ομοειδές του. Στις αρχικές δοκιμές το άτομο προς εξέταση παρέμενε περισσότερο χρόνο κοντά στο ομοειδές του. Στη συνέχεια όμως, καθώς εξοικειώθηκε με τον λαβύρινθο και με τους ανθρωπογενείς χειρισμούς η ανάγκη για εύρεση ομοειδούς μειώθηκε. Άρα στην παρούσα μελέτη, η μείωση του ποσοστού επιτυχιών των ατόμων που τηρούσαν το κριτήριο μάθησης (Μ) κατά την δήμερη εκπαίδευση θα οφείλεται στο φαινόμενο της εξοικείωσης.

Από όλα τα ΔΜ του δημέρου και του 3ημέρου υπήρξαν άτομα ΔΜ που έκαναν κάποιες λανθασμένες εισόδους (Εικόνα 9). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει μια διαφοροποίηση της συμπεριφοράς μεταξύ των ατόμων ΔΜ. Αυτή η διαφοροποίηση αφορά τον χαρακτήρα του κάθε ατόμου και σχετίζεται με μια έννοια που χρησιμοποιείται στην έρευνα για τους ιχθύς αρκετά συχνά, την τόλμη. Η τόλμη εξετάζεται με ένα εύρος πειραμάτων που σκοπό έχουν να μπορέσουν οι ιχθύς να εκδηλώσουν μια συμπεριφορά υπό κατάσταση που φυσιολογικά θα προκαλούσε stress. Αφορά ένα χαρακτηριστικό που κάποια άτομα μπορεί να το έχουν και κάποια άλλα όχι και χρησιμοποιείται για την αναγνώριση προτύπων συμπεριφοράς σε εκτρεφόμενα είδη όπως ο κυπρίνος (*Cyprinus carpio*) και το Ευρωπαϊκό λαβράκι

(*Dicentrarchus labrax*). Ο χαρακτήρας με την έννοια του τολμηρού ή όχι ατόμου επηρεάζει την ικανότητα μάθησης (Sneddon, 2003). Τα πιο τολμηρά άτομα είναι και πιο επιθετικά και εμφανίζουν πιο έντονη κολυμβητική δραστηριότητα από εκείνα που είναι λιγότερο τολμηρά, διακινδυνεύουν λιγότερο και εμφανίζουν μικρότερη κολυμβητική δραστηριότητα (Herrera *et al.*, 2014). Τα άτομα ΔΜ της παρούσας μελέτης διέφεραν ως προς τον χαρακτήρα τους, καθώς παρατηρήθηκαν κάποια που ήταν τολμηρά με έντονη κολυμβητική δραστηριότητα και λανθασμένες εισόδους ενώ άλλα παρουσίασαν ελάχιστη κολυμβητική δραστηριότητα χωρίς καμία είσοδο σε κανένα από τα διαμερίσματα του λαβυρίνθου.

Όμοια εικόνα παρουσίασαν και τα άτομα Μ που τα οποία πριν τις επιτυχημένες εισόδους παρουσίασαν ένα αριθμό λανθασμένων εισόδων. Αυτά τα άτομα θα συμπεριληφθούν ως άτομα με έντονη εξερευνητική συμπεριφορά και επομένως «τολμηρού» χαρακτήρα (Εικόνα 9). Έχει παρατηρηθεί στο Ευρωπαϊκό λαβράκι η έννοια του τολμηρού ή όχι χαρακτήρα σε παρόμοιο πείραμα (Benhaim *et al.* 2013c) με αυτό της παρούσας μελέτης όπου κάποια άτομα ενώ ανακάλυψαν το ομοειδές τους, που αποτελούσε μορφή επιβράβευσης, προτίμησαν να κρατήσουν μια «απόσταση ασφαλείας» σε αντίθεση με άτομα που θεωρήθηκαν ως πιο τολμηρά καθώς παρέμειναν κοντά στο ομοειδές τους. Σε άλλη έρευνα (Millot *et al.*, 2009) που έγινε για να διερευνηθεί ο χαρακτήρας του Ευρωπαϊκού λαβρακιού υπό την εναλλαγή σκότους-φωτός, βρέθηκε ότι τα άτομα γίνονταν τολμηρότερα με το πέρασμα των δοκιμών, διαμένοντας για περισσότερο χρόνο στη «διακινδυνευμένη» περιοχή. Επί προσθέτως βρέθηκε ότι τα άτομα που κατά την πρώτη δοκιμή, εισήλθαν στην ριψοκίνδυνη περιοχή ήταν και τελικά αυτά με τον μεγαλύτερο αριθμό εισόδων καθ όλη τη διάρκεια του πειράματος. Δείχθηκε ότι η κοινωνική μάθηση έπαιξε σημαντικό ρόλο, για τα άτομα που ήταν απόγονοι ελεύθερα διαβιούντων ιχθύων. Τα άτομα αυτά αύξησαν σημαντικά τον αριθμό εισόδων τους στη «ριψοκίνδυνη» περιοχή, από τη δεύτερη δοκιμή (από 23 στο 80%). Προτάθηκε ότι πιθανή αιτία για τα άτομα που δεν ακολούθησαν την κοινωνική μάθηση σχετίζεται με το γεγονός ότι προέρχονται από γενιά ατόμων υπό αιχμαλωσία. Τα αποτελέσματά υποδεικνύουν την ύπαρξη ικανότητας μάθησης που ενισχύεται ανά δοκιμή και προτείνουν ότι τα άτομα που προέρχονται από απόγονους που διαβιούν ελεύθερα στο φυσικό περιβάλλον έχουν την ικανότητα να μάθουν βάσει ηγετικού ατόμου (κοινωνική μορφή μάθησης).

Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι υπήρχε διαφοροποίηση της έκφρασης των γονιδίων στον τελεγκέφαλο μεταξύ Μ και ΔΜ ατόμων (Πίνακας 7), ενισχύοντας σαφώς την εμπλοκή του τελεγκεφάλου στην ικανότητα μάθησης στους ιχθύς. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από ένα αριθμό εργασιών των οποίων τα αποτελέσματα έρχονται σε συμφωνία τα ευρήματα αυτής της μελέτης. Σε παρόμοια έρευνα με άτομα του είδους *Astatotilapia burtoni* παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση μεταξύ άλλων, των γονιδίων *egr-1* και *c-fos* στον

τελεγκέφαλο ατόμων που ολοκλήρωσαν με επιτυχία τον λαβύρινθο (Wood et al., 2011). Σε έρευνα με χρυσόψαρα (*Carassius auratus*) παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του *egr-1* στον τελεγκέφαλο ύστερα από έντονη εξερευνητική δραστηριότητα σε πείραμα χωροταξική μάθησης (Emmanuel Rajan et al., 2011).

Έκφραση του *c-fos* σε υψηλά επίπεδα παρατηρήθηκε στον τελεγκέφαλο και στον υποθάλαμο ατόμων του είδους *Periophthalmus cantonensis*. Τα επίπεδα αυτά παρατηρήθηκαν αφού είχε προκληθεί στα άτομα κατάσταση ταραχής, με ανάδευση των υδάτων της δεξαμενής, από ανθρωπογενή επίδραση και θεωρήθηκε ότι το γονίδιο *c-fos* εμπλέκεται στην προσπάθεια αποφυγής αρνητικών ερεθισμάτων και στην χωροταξική μνήμη (Wai et al., 2006).

Στον υποθάλαμο-υπόφυση δεν διαπιστώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των Μ και ΔΜ σε καμία από 2 διάρκειες εκπαίδευσης (Εικόνα 11). Παρόλα αυτά έκφραση των γονιδίων *egr-1* και *c-fos* όπως και άλλων γονιδίων πρώιμης έκφρασης γίνεται στην περιοχή αυτή του εγκεφάλου των ιχθύων. Οι Wai et al. (2006) σε πείραμα με άτομα ιχθύων του είδους *Periophthalmus cantonensis*, συνέδεσαν την αυξημένη έκφραση του *c-fos* σε περιοχές του τελεγκεφάλου, του υποθαλάμου και της υπόφυσης με την εκδήλωση συμπεριφοράς που σχετίζεται με ταραχή, επιθετικότητα και χορήγηση τροφής καταλήγοντας ότι κάθε συμπεριφορά έχει ως επακόλουθο ενεργοποίηση ορισμένων περιοχών του εγκεφάλου. Σε ενήλικα άτομα του είδους *Oryzias latipes* παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση του *c-fos* στον υποθάλαμο και στην αμυγδαλή, όταν βρέθηκαν σε συνθήκες που ευνοούσαν την αναπαραγωγή (Okuyama et al., 2011). Επί προσθέτως σε έρευνα για τον τρόπο που εναλλάσσονται οι βαθμοί ιεραρχίας σε αρσενικά *Astatotilapia burtoni*, παρατηρήθηκε αυξημένη έκφραση *egr-1* και *c-fos* στον υποθάλαμο, για τα άτομα που κατέβηκαν «σκαλί» στην ιεραρχία σε σχέση με αυτά που έμειναν σταθερά και με τους μάρτυρες (Maruska et al., 2013). Όλα τα παραδείγματα που σχετίζονταν με την έκφραση των πρώιμων γονιδίων μάθησης στον υποθάλαμο έρχονται σε συμφωνία με την παραδοχή του Newman (1999), ότι η περιοχή αυτή του εγκεφάλου εμπλέκεται έντονα στην εκδήλωση συναισθηματικά φορτισμένων καταστάσεων και κοινωνικών συμπεριφορών. Στην παρούσα μελέτη υψηλή έκφραση του *c-fos* στις περιοχές του τελεγκεφάλου μπορεί να σχετίζεται και με την επιβράβευση του ομοειδούς ατόμου.

Στην παρούσα μελέτη, σημαντική συσχέτιση βρέθηκε και στην περιοχή του λοιπού εγκεφάλου (Πίνακας 7). Καθώς στο λοιπό εγκέφαλο συμπεριλήφθηκε η παρεγκεφαλίδα είναι πιθανό η περιοχή αυτή να εμπλέκεται στη έκφραση του *c-fos*. Είναι γεγονός ότι έχει

παρατηρηθεί έκφραση του γονιδίου c-fos στη παρεγκεφαλίδα χρυσόψαρων (*Carassius auratus*), ιριδιζουσας πέστροφας (*Oncorhynchus mykiss*) και ατόμων του είδους *Oryzias latipes* σε περιπτώσεις τραυματισμού πτερυγίων, κατάστασης stress και αντίδραση σε ερεθίσματα που σχετίζονταν με την αναπαραγωγική διάθεση αντίστοιχα (Hu *et al.*, 2012; Johansen *et al.*, 2012; Okuyama *et al.*, 2011).

Η έκφραση του γονιδίου egr-1 είναι εντονότερη κατά την περίοδο σχηματισμού και απόκτησης μιας μαθησιακής ικανότητας (Boyer *et al.*, 2013).

Η διαδικασία της μάθησης έχει αποδειχθεί ότι αντιμετωπίζει ως σημαντικό περιοριστικό παράγοντα την κατάσταση stress που υπόκεινται τα άτομα προς εξέταση από τους ανθρωπογενείς χειρισμούς (Benhaim *et al.*, 2013a)

Παρόλα αυτά οι διαδικασίες μάθησης μπορούν να αποβούν χρήσιμες κατά την εκτροφή σε ένα σύνολο ατόμων. Συγκεκριμένα για το ευρωπαϊκό λαβράκι που απασχόλησε την έρευνα αυτή, μπορεί το περιβάλλον διαβίωσης του είδους να διαφέρει σημαντικά από το φυσικό περιβάλλον αλλά η χωρική μάθηση δεν σημαίνει ότι είναι ανέφικτη. Όπως τα άτομα που διαβιούν ελεύθερα βλέπουν μαθαίνουν, επεξεργάζονται και αντιδρούν σε ερεθίσματα, έτσι και τα εκτρεφόμενα άτομα μπορούν να χρησιμοποιούν οπτικά ερεθίσματα του περιβάλλοντος μιας δεξαμενής για να προσανατολίζονται στο χώρο και να γνωρίζουν που βρίσκεται η τροφή, τότε και με ποιο τρόπο θα την προσλάβουν (Benhaim *et al.*, 2013c). Απαραίτητη προϋπόθεση στο περιβάλλον εκτροφής είναι να συμβεί εξοικείωση στα εκτρεφόμενα είδη όσον αφορά ανθρωπογενείς χειρισμούς που προκαλούν καταστάσεις stress (Ferno *et al.*, 2006).

Είναι γεγονός ότι όσο περισσότερη έρευνα γίνεται για τον εγκέφαλο των ιχθύων τόσο περισσότερο ανακαλύπτουμε ομοιότητες με τον εγκέφαλο άλλων σπονδυλωτών (Demski 2013).

5. Βιβλιογραφία

5.1 Ελληνόφωνη

Σαράντης, Κ. 2010. Αντίδραση υποδοχέων ντοπαμίνης με ιοντοτρόπους γλουταμινικού οξέος και γ-αμινοβουτυρικού οξέος στον προμετωπιαίο φλοιό και ιππόκαμπο επιμύος. Διδακτορική μελέτη. Πανεπιστήμιο Πατρών.

5.2 Αγγλόφωνη

Agrillo, C., Piffer, L., Bisazza, A. 2010. Large number discrimination by mosquitofish. *PLoS ONE* 2010 5(12):e15232.

Agrillo, C., Petrazzini, M.E. M., Piffer, L., Dadda, M., Bisazza, A. 2012. A new training procedure for studying discrimination learning in fish. *Behavioural Brain Research* 230, 343–348.

Al-Imari, L., Gerlai, R. 2008. Sight of conspecifics as reward in associative learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Brain Research* 189, 216-219.

Anthouard, M. 1987. A study of social transmission in juvenile *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Serranidae), in an operant conditioning situation. *Behaviour* 103, 266-275.

Aronson, L.R. 1971. Further studies on orientation and jumping behaviour in the gobiid fish *Bathygobius sporator*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 188, 378-392.

Beckmann, A.M. and Wilce, P.A. 1997. Egr transcription factors in the nervous system. *Neurochemistry International* 31(4), 477–510, doi:10. 1016/S0197-0186(96)00136-2. PMID:9307998.

Benhaïm, D., Bégout, M. L., Lucas, G., Chatain, B, 2013a. First Insight into Exploration and Cognition in Wild Caught and Domesticated Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) in a Maze. *PLoS ONE* 8(6), e65872.

Benhaïm, D., Bégout, M.L., Péan, S., Manca, M., Prunet, P. and Chatain, B. 2013b. Impact of a plant-based diet on behavioural and physiological traits in sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources* 26, 121-131.

Benhaïm, D., Bégout, M.L., Chatain, B. 2013c. Unfamiliar Congener used as a Visual Attractor in Wild Caught and Domesticated Sea Bass (*Dicentrarchus labrax*) Placed in a T-Maze. *Aquaculture Research & Development* 4, 1-6.

- Black, A.H., Nadel, L., O'Keefe, J. 1977. Hippocampal function in avoidance learning and punishment. *Psychological Bulletin* 84, 1107-1129.
- Bosch, T. J., Maslam, S., Roberts, B. L. 2001. Fos-Like Immunohistochemical Identification of Neurons Active During the Startle Response of the Rainbow Trout. *The journal of comparative neurology* 439, 306-314.
- Boyer, B., Emest, S., Rosa, F. 2013. Egr-1 induction provides a genetic response to food aversion in zebrafish. *Frontiers in behavioural neuroscience* 7, 1-12
- Bozon, B., Davis, S., Laroche, S. 2003. A requirement for the immediate early gene zif268 in reconsolidation of recognition memory after retrieval. *Neuron* 40(4), 695–701.
- Bozon, B., Kelly, A., Josselyn, S.A., Silva, A.J., Davis, S., Laroche, S. 2003. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. *Philosophical transactions of the royal society b:biological sciences* 358, 805– 814.
- Braithwaite, V.A., Salvanes, A.G.V. 2008. Fish cognition. In *Fish Behaviour*. Ed. Magnhagen, C, Braithwaite, V. A., Forsgren, E. & Kapoor, B. G. Science Publishers Inc., USA pp.33-60.
- Breuning, S.E., Ferguson, D.G., Poling, A.D. 1981. Second-order schedule effects with goldfish: a comparison of brief-stimulus, chained, and tandem schedules. *Psychological Record* 31, 437–445.
- Broglio, C., Gomez, A., Duran, E., Ocana, F.M., Jimenez-Moya F., Rodriguez, F., Salas, C. 2005. Hallmarks of a common forebrain vertebrate plan: specialized pallial areas for spatial, temporal, and emotional memory in actinopterygian fish. *Brain Research Bulletin* 66, 277–281.
- Broglio, C., Rodriguez, F., Salas, C. 2003. Spatial cognition and its neural basis in teleost fishes. *Fish Fisheries* 4, 247–255.
- Brown, C. 2001. Familiarity with the test environment improves escape responses in the crimson spotted rainbowfish, *Melanotaenia duboulayi*. *Animal Cognition* 4, 109–113.
- Brown, C. 2014. Fish intelligence, sentience and ethics, review. *Animal Cognition* Brown, C and Laland, K.N. 2003. Social learning in fishes: A review. *Fish and Fisheries* 4, 280- 288.
- Brown, C., Laland, K. and Krause, J. (eds). 2011. *Fish Cognition and Behavior*, Wiley Online Library, Pondicherry, India, 240 450 pp.

- Brown, C., Braithwaite, V.A. 2005. Effects of predation pressure on the cognitive ability of the poeciliid *Brachyraphis episcopi*. *Behavioral Ecology* 16, 482–497.
- Bshary, R., Schäffer, D. 2002. Choosy reef fish select cleaner fish that provide high-quality service, *Animal Behaviour* 63, 557-564
- Bshary, R. 2002. Biting cleaner fish use altruism to deceive image-scoring client reef fish *Proceedings of the Royal Society of London B* 269, 2087-2093.
- Bshary, R. 2011. Machiavellian intelligence in fishes. In: Brown C, Krause J, Laland K (eds) *Fish cognition and behavior*. Wiley, Cambridge, pp 277–297
- Bshary, R., Gings, S., Vail, A.L. 2014. Social cognition in fish. *Trends in Cognitive Science*.
- Bullitt, E. 1990. Expression of c-fos-like protein as a marker for neuronal activity following noxious stimulation in the rat. *The Journal of comparative Neurology*, 296, 517-530.
- Burgess, N., Jeffery, K.J. and O’Keefe, J. 1999. *The Hippocampal and Parietal Foundations of Spatial Cognition*. Oxford University Press, London
- Burmeister, S.S., Fernald, R.D. 2005. Evolutionary conservation of the Egr-1 immediate-early gene response in a teleost. *Journal of Comparative Neurology* 481, 220–232.
- Chung, S. 2008. Appropriate maze methodology to study learning in fish. *Journal of Undergraduate Life Sciences*, review, 52-55.
- Cottee, Y.S. 2012. Are fish the victims of ‘speciesism’? A discussion about fear, pain and animal consciousness. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38, 5-15.
- Davis, M. 1992. The role of the amygdala in conditioned fear and anxiety. *Annual Review of Neuroscience* 15, 353–375.
- Davis, S., Bozon, B., Laroche, S. 2003. How necessary is the activation of the immediate early gene zif 268 in synaptic plasticity and learning? *Behavioural Brain Research* 142, 17-30.
- Demski, L.S. 2013. The pallium and mind/behavior relationships in Teleost fishes. *Brain Behavior and Evolution* 82, 31–44.
- Desjardins, J.K., Fernald, R.D. 2010. What do fish make of mirror images ? *Biology letters* 6, 744-747.

- Dodson, J.J. 1988. The nature and role of learning in the orientation and migratory behaviour of fishes. *Environmental Biology of Fish* 23, 161–182.
- Dugatkin, L.A. 1992. Sexual selection and imitation: Females copy the mate choice of others. *American Naturalist* 139, 1384-1389.
- EFSA (European Food Safety Authority) 2009. General approach to fish welfare and to the concept of sentience in fish-Scientific opinion of the panel on animal health and welfare. *The EFSA Journal* 954, 1-27.
- Eichenbaum, H., Dudchenko, P., Wood, E., Shapiro, M., Tanila, H. 1999. The hippocampus, memory, and place cells: Is it spatial memory or a memory space? *Neuron*, 23, 209–226.
- Emmanuvel Rajan, K., Ganesh, A., Dharaneedharan, S., Radhakrishnan, K. 2011. Spatial learning-induced egr-1 expression in telencephalon of gold fish *Carassius auratus*. *Fish Physiology and Biochemistry* 37, 153-159.
- Ferno, A., Huse, G., Jakobsen, P.J., Kristiansen, T.S. 2006. The role of fish learning skills in fisheries and aquaculture. In: Brown C, Laland K, Krause J (eds) *Fish cognition and behaviour*. Blackwell Publishing, Oxford
- Frankland, P.W., Bontempi, B., Talton, L.E., Kaczmarek, L., Silva, A.J. 2004. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. *Science* 304, 881–883.
- Fitzpatrick, J.L., Desjardins, J.K., Stiver, K.A., Montgomerie, R. and Balshine, S. 2006. Male reproductive suppression in the cooperatively breeding fish *Neolamprologus pulcher*. *Behavioral Ecology* 17, 25–33.
- Gallagher, M., Chiba, A. 1996. The amygdala and emotion. *Current Opinion in Neurobiology* 6, 221–227.
- Gentner, T.Q., Hulse, S.H., Duffy, D., Ball, G.F. 2001. Response biases in auditory forebrain regions of female songbirds following exposure to sexually relevant variation in male song. *Journal of Neurobiology* 46, 48 –58.
- Girvan, J.R., Braithwaite, V.A. 1998. Population differences in spatial learning and memory in three-spined sticklebacks. *Proceedings of the Royal Society of London B* 265, 913-918.

- Goodey, W., Liley, N.R., 1986. The influence of early experience on escape behaviour in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Canadian Journal of Zoology* 64, 885-888.
- Griffiths, S. 2003. Learned recognition of conspecifics by fishes. *Fish Fisheries* 4, 256–268.
- Grutter, A.S., Rumney, J.G., Sinclair-Taylor, T., Waldie, P., Franklin, C.E. 2011. Fish mucous cocoons: the ‘mosquito nets’ of the sea. *Biology Letters* 7, 292–294.
- Hansen, A., Anderson, K.T., Finger, T.E., 2004. Differential distribution of olfactory receptor neurons in goldfish: structural and molecular correlates. *Journal of Comparative Neurology* 477 (4), 347–359.
- Hansen, A., Rolen, S.H., Anderson, K., Morita, Y., Caprio, J., Finger, T.E., 2003. Correlation between olfactory receptor cell type and function in the channel catfish. *Journal of Neuroscience* 23 (28), 9328–9339.
- Hart, P.B., Gill, A., 1994. Evolution of foraging behaviour in threespine stickleback. In : *Evolutionary Biology of the Three-spine Stickleback (book)*. Bell M.A, Foster S.A. (edited). Oxford University Press , Oxford, pp. 207 -236.
- Harvey-Girard, E., Tweedle, J., Ironstone, J., Cuddy, M., Ellis, W., Maler, L., 2010. Long-term recognition memory of individual conspecifics is associated with telencephalic expression of Egr-1 in the electric fish *Apteronotus leptorhynchus*. *The Journal of Comparative Neurology* 518, 2666-2692.
- Healy, S.D. 1998. Spatial representation in animals. Oxford university press, Oxford
- Herdegen, T., Zimmermann, M. 1994. Expression of c-Jun and JunD transcription factors represent specific changes in neuronal gene expression following axotomy. *Progress in Brain Research*, 103 153–171.
- Herrera, M., Castanheira, M. F., Conceicao, L. E. C., Martins, C. I. 2014. Linking risk taking and the behavioral and metabolic responses to confinement stress in gilthead seabream *Sparus aurata*. *Applied animal behaviour*, 1-8.
- Heynen, A.J., Bear, M.F. 2001. Long-term potentiation of thalamocortical transmission in the adult visual cortex in vivo. *The journal of neuroscience* 15, 9801–13.
- Hoare, D.J., Krause, J. 2003. Social organisation, shoal structure and information transfer. *Fish and Fisheries* 4, 269–279.

- Hoke, K.L., Burmeister, S.S., Fernald, R.D., Rand, A.S., Ryan, M.J., Wilczynski, W. 2004. Functional mapping of the auditory midbrain during mate call reception. *The journal of Neuroscience* 24, 11264–11272.
- Hollis, K.L., Overmier, J.B., 1982. Effect of telencephalon ablation on the reinforcing and eliciting properties of species specific events in *Betta splendens*. *Journal of Comparative Physiology* 96, 574–590.
- Hollis, K.L. 1999. The role of learning in the aggressive and reproductive behaviour of blue gouramis (*Trihogaster trichoptemus*). *Environmental Biology of Fishes* 54, 355-369.
- Hu, X., Li, Y., Hu, Z., Rudd, J. A., Ling, S., Jiang, F., Davies, H., Fang, M. 2012. The alteration of 5-HT_{2A} and 5-HT_{2C} receptors is involved in neuronal apoptosis of goldfish cerebellum following traumatic experience. *Neurochemistry international* 61, 207-218.
- Huntingford, F.A. 2004. Implications of domestication and rearing conditions for the behaviour of cultivated fishes. *Journal of Fish Biology* 65, 122–142.
- Jeffery, K.J., Anderson, M.I., Hayman, R., Chakraborty, S. 2004. A proposed architecture for the neural representation of spatial context. *Neuroscience and Biobehavioural reviews* 28, 201–218.
- Jobling, M., D. COvt~s, 8. Damsg~ d, H. Kristiansen. J. Koskela. T.E. Petur-donir. . Kadri and O. Gudmunson. 2 \. Techniques for measuring feed intake. In: Food Intake in Fish , D. Houlihan, T. Boujard and M. Jobling (eds.). Blackwell scieoce , Oxford, pp. 49- 7.
- Johansen, I. B., Sorensen, C., Sandvik, G. K., Nilsson, G. E., Hoglund, E., Bakken, M., Overli, O. 2012. Neural plasticity is affected by stress and heritable variation in stress coping style. *Comparative biochemistry and physiology Part D* 7, 161-171.
- Johnstone, R.A., Bshary, R. 2004. Evolution of spite through indirect reciprocity. *Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences* 271, 1917–1922.
- Jones, A.M., Brown, C., Gardner, S. 2011. Tool use in the tuskfish *Choerodon schoenleinii*? *Coral Reefs* 30, 865

- Jones, M.W., Errington, M.L., French, P.J., Fine, A., Bliss, T.V., Garel, S., Charnay, P., Bozon, B., Laroche, S., Davis, S. 2001. A requirement for the immediate early gene Zif268 in the expression of late LTP and long-term memories. *Nature Neuroscience* 4, 289–296.
- Kling, A.S. & Brothers, L.A. (1992) The amygdala and social behavior. In Aggleton, J.P. (ed.), *The Amygdala: Neurobiological Aspects of Emotion, Memory, and Mental Dysfunction*. Wiley-Liss, New York, pp. 353–377
- Knapska, E., Kaczmarek, L. 2004. A gene for neuronal plasticity in the mammalian brain: Zif268/Egr-1/NGFI-A/Krox-24/TIS8/ZENK? *Progress in Neurobiology* 74, 183–211.
- Krebs, J.R. 1989. Hippocampal Specialization of food-storing birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86(4), 1388–1392.
- Kress, S., Wullmann, M. F. 2012. Correlated basal expression of immediate early gene egr1 and tyrosine hydroxylase in zebrafish brain and downregulation in olfactory bulb after transitory olfactory deprivation. *Journal of Chemical Neuroanatomy* 46, 51-56.
- Laland, N. K., Brown, C., Krausse, J. 2003. Learning in fishes: from three-second memory to culture. *FISH and FISHERIES* 4, 199-202.
- Laland, K., Williams, K., 1997. Shoaling generates social learning of foraging information in guppies. *Animal Behaviour* 53, 1161–1169.
- Lanahan, A., Worley, P. 1998. Immediate-early genes and synaptic function. *Neurobiology of learning and memory* 70(1-2), 37-43
- LeDoux, J.E. 1995. Emotions: clues from the brain. *Annual Review of Psychology* 46, 209–235
- Lieberman, D.A., 1990 *Learning: Behavior and Cognition*, 500 p. Wadsworth, Belmont, CA.
- Liu, W.C., Nottebohm, F. 2005. Variable rate of singing and variable song duration are associated with high immediate early gene expression in two anterior forebrain song nuclei. *Proceeding of the National Academy of Science*, 102, 10724–10729.
- Loebrich, S., Nedivi, E. 2009. The function of activity-regulated genes in the nervous system. *Physiological Reviews* 89(4), 1079–1103. doi:10.1152/physrev.00013.2009. PMID:19789377.

- Lopez, J.C., Gomez, Y., Rodriguez, F., Broglio, C., Vargas, J.P., Salas, C. 2001. Spatial learning in turtles. *Animal Cognition* 4, 49–59.
- Maguire, E.A., Vargha-Khadem, F., Mishkin, M. 2001. The effects of bilateral hippocampal damage on fMRI regional activations and interactions during memory retrieval. *Brain* 124, 1156–1170.
- Markel, R.W. 1994. An adaptive value of spatial learning and memory in the blackeye goby. *Coryphopterus nicholsi*. *Animal Behaviour* 47, 1462- 1464.
- Maruska, K. P., Becker, L., Neboori, A., Fernald, R. D. 2013. Social descent with territory loss causes rapid behavioral, endocrine and transcriptional changes in the brain. *The Journal of Experimental Biology* 216, 3656-3666.
- Malkani, S., Wallace, K.J., Donley, M.P., Rosen, J.B. 2004. An egr-1 (zif268) antisense oligodeoxynucleotide infused into the amygdala disrupts fear conditioning. *Learning and Memory* 11, 617–624.
- McGregor, P.K. 1993. Signaling in territorial systems – a context for individual identification, ranging and eavesdropping. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B – Biological Sciences* 340, 237–244.
- Mello, C.V., Vicario, D.S., Clayton, D.F., 1992. Song presentation induces gene expression in the songbird forebrain. *Proceeding of the national academy of sciences* 89, 6818 – 6822.
- Midling, K.Ø., Kristiansen T.S., Ona, E. & Øiestad, V. 1987. Fjord ranching with conditioned cod (*Gadus morhua* L). ICES CM 1987/F:10.
- Milinski, M., Bakker, T.C.M. 1990. Female sticklebacks use male coloration in mate choice and hence avoid parasitized males. *Nature (London)* 344, 330-333.
- Millot, S., Begout, M. L., Chatain, B. 2009. Risk-taking behaviour variation over time in sea bass *Dicentrarchus labrax*: effects of day–night alternation, fish phenotypic characteristics and selection for growth. *Journal of fish biology* 75, 1733-1749.
- Morris, R.G., Frey, U. 1997. Hippocampal synaptic plasticity: role in spatial learning or the automatic recording of attended experience? *Philosophical Transaction of the royal society of London B: Biological Sciences* 352, 1489-1503.

- Nadel, L. 1991. The hippocampus and space revisited. *Hippocampus* 3, 221-229.
- Newman S.W. 1999. The medial extended amygdala in male reproductive behavior: A node in the mammalian social behavior network. *Annals of the New York Academy of Science* 877, 242–257.
- Nieuwenhuys, R., Donkelaar, H.J., Nicholson, C. 1998. The Central Nervous System of Vertebrates. Springer, Berlin
- Noda, M., Gushima, K., Kakuda, S. 1994. Local prey search based on spatial memory and expectation in the planktivorous reef fish, *Chromis chrysurus* (Pomacentridae). *Animal Behaviour*, 47, 1413–1422.
- Northcutt, R.G., 1981. Evolution of the telencephalon in non-mammals. *Annual Reviews of Neuroscience* 4, 301–350.
- Northcutt, K.V., Lonstein, J.S. 2009. Social contact elicits immediate-early gene expression in dopaminergic cells of the male prairie vole extended olfactory amygdala. *Neuroscience* 163 (1), 9–22.
- Odling-Smee, Simpson, S. D., Braithwaite, V.A. 2006. Orientation and spatial behaviour in fish. In: *Fish Cognition and Behaviour*, C. Brown, J. Krause and K. Laland (ed.). Blackwell Publishing, London. pp. 119-138.
- O’Keefe, J., Nadel, L, 1978. *The Hippocampus as a Cognitive Map*. Oxford UP, London.
- Okuyama, T., Suehiro, Y., Imada, H., Shimada, A., Naruse, K., Takeda, H., Kubo, T., Takeuchi, H. 2011. Induction of c-fos transcription in the medaka brain (*Oryzias latipes*) in response to mating stimuli. *Biochemical and biophysical research communications* 404, 453-457.
- Olton, D.S., Walker, J.A., Gage, F.H. 1978. Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Research* 139, 295-308.
- Overmier, J.B., Hollis, K.L. 1983. The teleostean telencephalon in learning. In: *Fish Neurobiology*. Northcut RG, Davis RE, (eds), pp. 265–284, The University of Michigan Press, Ann Arbor,.

- Pagel, J.I., Deindl, E., 2011. Early-growth response 1 – A transcription factor in the crossfire of signal transduction cascades. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 48, 226-235.
- Perez-Cadahia, B., Drobic, B., Davie, J.R. 2011. Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochemistry and cell biology* 89, 61-73.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29, 2002-2007.
- Pfaus, J.G., Heeb, M.M. 1997. Implications of immediate-early gene induction in the brain following sexual stimulation of female and male rodents. *Brain Research Bulletin* 44, 397-407.
- Poirier, R., Cheval, H., Mailhes, C., Garel, S., Charnay, P., Davis, S., Laroche, S., 2008. Distinct functions of egr gene family members in cognitive processes. *Frontiers in Neuroscience* 2, 47-55.
- Portavella, M., Torres, B., Salas, C. 2004. Avoidance response in goldfish: Emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. *The Journal of Neuroscience* 24(9), 2335-2342.
- Quinn, T.P. 1980. Evidence for celestial and magnetic compass orientation in lake migrating sockeye salmon fry. *Journal of Comparative Physiology* 137,243-248.
- Rimoldi, S., Terova, G., Brambilla, F., Bernardini, G., Gornati, R., Saroglia, M. 2009. Molecular characterization and expression analysis of Na⁺/H⁺ exchanger (NHE)-1 and c-Fos genes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L) exposed to acute and chronic hypercapnia. *Journal of experimental marine biology and ecology* 375, 32-40
- Rink, E., Wullimann, M.F. 2004. Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (*Danio rerio*). *Brain Research* 1011, 206-220.
- Rodriguez, F., Lopez, J. C., Vargas, J. P., Broglio, C., Gomez, Y. & Salas, C. 2002. Spatial memory and hippocampal pallium through vertebrate evolution: insights from reptiles and fish. *Brain Research Bulletin* 57, 499-503.
- Rusak, B., Robertson, H.A., Wisden, W., Hunt, S.P. 1990. Light pulses that shift rhythms induce gene expression in the suprachiasmatic nucleus. *Science* 248, 1237-1240.

- Saito, K., Watanabe, S. 2004. Spatial learning deficits after the development of dorsomedial telencephalon lesions in goldfish. *NeuroReport* 15(8), 2695–2699.
- Saito, K., Watanabe, S. 2006. Deficits in acquisition of spatial learning after dorsomedial telencephalon lesions in goldfish. *Behavioural Brain Research* 172(2), 187–194.
- Salas, C., Broglio, C., Durán, E., Gómez, A., Ocaña, F.O., Jiménez-Moya, F., Rodríguez, F., 2006. Neuropsychology of learning and memory in Teleost fish, *Zebrafish* 3, 157-171.
- Salierno, J.D., Snyder, N.S., Murphy, A.Z., Poli, M., Hall, S., Baden, D., Kane, A.S. 2006 Harmful algal bloom toxins alter c-Fos protein expression in the brain of killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic toxicology* 78, 350-357.
- Schacter, D.L., Tulving, E. 1994. *Memory System*. MIT Press, Cambridge, MA, USA.
- Segner, H., 2012. Fish nociception and pain a biological perspective. *Contributions to Ethics and Biotechnology*.
- Shapiro, S.M., Schuckman, H., Sussman, D., Tucker, A.M. 1974. Effects of telencephalic lesions on the gill cover response of Siamese fighting fish. *Physiology & Behavior* 13, 749–755.
- Sherry, D.F., Duff, S.J. 1996. Behavioral and neural bases of orientation in food storing birds. *The journal of experimental biology* 199, 165–172.
- Shettleworth, S.J. 2010. Cognition, evolution, and behaviour, 2nd edn. Kindle Edition. Oxford University Press, Oxford
- Sneddon, L. U. 2003. The bold and the shy: individual differences in rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 62, 971–975.
- Sovrano, V.A., Bisazza, A., Vallortigara, G. 2002. Modularity and spatial reorientation in a simple mind: encoding of geometric and nongeometric properties of a spatial environment by fish. *Cognition* 85, B51–9.
- Ulinski, P.S. 1990. The cerebral cortex of reptiles. In Jones, E.G. & Peters, A. (eds), Comparative Structure and Evolution of the Cerebral Cortex. *Cerebral Cortex* 8A, 139–215.

- Tanck, M.W.T., Booms, G.H.R., Eding, E.H., Wendelaar Bonga, S.E., Komen, J. 2000. Cold shocks: a stressor for common carp. *Journal of Fish Biology* 57, 881-894.
- Tokuyama, W., Okuno, H., Hashimoto, T., Li, Y.X., Miyashita, Y. 2002. Selective zif268 mRNA induction in the perirhinal cortex of macaque monkeys during formation of visual pair association memory. *Journal of Neurochemistry* 81, 60-70.
- Vargas, J. P., López, J. C., Portavella, M. 2009. What are the functions of fish brain pallium? *Brain Research Bulletin* 79, 436-440.
- Wai, M.S.M., Lorke, D. E., Webb, S.E., Yew, D.T. 2006. The pattern of c-fos activation in the CNS is related to behavior in the mudskipper, *Periophthalmus cantonensis*. *Behavioural Brain Research* 167, 318-327.
- Warburton, K. 1990. The use of local landmarks by foraging goldfish. *Animal Behavior* 40, 500-505.
- Williams, F. E, White, D., Messer Jr., W. S. 2002. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. *Behavioural processes* 58, 125-132.
- Wood, L.S., Desjardins, J.K., Fernald, R.D. 2011. Effects of stress and motivation on performing a spatial task. *Neurobiology of Learning and Memory* 95, 277-285.
- Zerbolio, D.J., Wickstra, L.L. 1980. Instrumental avoidance acquisition by goldfish in a Y-maze using explicit and response-contingent cues. *Animal Learning & Behavior* 8, 304-310.