

## ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΟΥ ΣΤΟ ΡΥΘΜΟ ΑΥΞΗΣΗΣ ΤΩΝ ΝΥΜΦΩΝ *DANIO RERIO* (HAMILTON, 1822)

**Λοϊζίδης Μ., Γεώργα Ι., Κουμουνδούρος Γ.**

Τμήμα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Πάτρας, koumound@upatras.gr

### Περίληψη

Μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και της φωτοπεριόδου στον ειδικό ρυθμό αύξησης (SGR) των νυμφών zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822). Εφαρμόστηκαν έξι συνδυασμοί θερμοκρασίας νερού (22, 28, 32° C) και φωτοπεριόδου (14:10, 8:16 L:D) από το εμβρυϊκό στάδιο (28° d) μέχρι τα 12-13 mm μέσο ολικό μήκος σώματος (TL). Τα αποτελέσματα υπέδειξαν σημαντική συνεπίδραση της θερμοκρασίας και της φωτοπεριόδου στο SGR ( $p < 0,05$ ). Συγκεκριμένα, στη φωτοπερίοδο 14:10 L:D το SGR αυξήθηκε γραμμικά με την αύξηση της θερμοκρασίας σε όλο το εξεταζόμενο εύρος (22-32° C), ενώ στη φωτοπερίοδο 8:16 L:D το SGR επηρεάστηκε σημαντικά από τη θερμοκρασία μόνο στο εύρος 22-28° C. Στους 32° C ο ρυθμός αύξησης του ολικού μήκους των νυμφών ήταν ανάλογος της διάρκειας του φωτός, ενώ στους 22 και 28° C ο ρυθμός αύξησης του ολικού μήκους ήταν ανεξάρτητος της φωτοπεριόδου. Τα αποτελέσματα συζητούνται ως προς τη χρήση του *D. rerio* ως οργανισμού μοντέλου για την κατανόηση των ενδογενών μηχανισμών μέσω των οποίων το περιβάλλον επηρεάζει την ontogenése των ψαριών.

**Λέξεις κλειδιά:** ειδικός ρυθμός αύξησης, αλληλεπίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων, zebrafish.

## THE EFFECT OF TEMPERATURE AND PHOTOPERIOD ON THE GROWTH RATE OF *DANIO RERIO* (HAMILTON, 1822) LARVAE

**Loizides M., Georga I., Koumoundouros G.**

Biology Department., University of Patras, koumound@upatras.gr

### Abstract

In the present study we examined the effect of developmental temperature and photoperiod on the specific growth rate (SGR) of zebrafish [*Danio rerio* (Hamilton, 1822)] larvae. Experimental populations were submitted to the combination of three temperature (22, 28 και 32° C) and two photoperiod (14:10, 8:16 L:D) regimes, from the embryonic stage (28° C dpf, days post-fertilization) to a mean total length (TL) of 12-13 mm. Results revealed a significant co-effect of temperature and photoperiod on larval SGR ( $p < 0.05$ ). At 14:10 L:D regime, larval SGR was linearly correlated with temperature, whereas at 8:16 L:D regime the thermal effect on SGR was evident only at the range of 22-28° C. Larval SGR was independent of photoperiod at the thermal range of 22-28° C, but at 32° C SGR was increased as photoperiod raised. Our results suggest that zebrafish could serve as a model species in the study of endogenous mechanisms which are involved in environmental effects on larval growth.

**Keywords:** specific growth rate, environmental co-effects, zebrafish.

### 1. Εισαγωγή

Οι εξωγενείς παράγοντες είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για την ανάπτυξη των Τελεόστεων ιχθύων, οι οποίοι βασίζονται στη θερμοκρασία, τη φωτοπερίοδο και τη διαθεσιμότητα τροφής για τις αναπτυξιακές τους διαδικασίες (Thorpe *et al.*, 1989; Boujard *et al.*, 1995). Στο φυσικό περιβάλλον, οι υψηλότερες θερμοκρασίες συμπίπτουν με τη φάση φωτός ενώ οι χαμηλότερες με τη φάση σκότους (Johnson *et al.*, 2004). Δικαιολογημένα λοιπόν, προτείνεται η υπόθεση της συνεπίδρασης θερμοκρασίας και φωτοπεριόδου σε όλες τις φυσιολογικές δραστηριότητες των ψαριών (αναπαραγωγή, διαφοροποίηση, αύξηση κ.λπ).

Στον κύκλο ζωής των ψαριών, η εμβρυϊκή και η νυμφική φάση χαρακτηρίζονται ως οι πλέον κρίσιμες για το μέγεθος και τη δυναμική των φυσικών πληθυσμών. Το γεγονός ότι ο ρυθμός θνησι-

μότητας είναι μεγαλύτερος κατά τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, φτάνοντας ακόμα και στο 60-85% (Bailey & Houde, 1989), τονίζει το ρόλο του μεγέθους και του ρυθμού ανάπτυξης για την επιβίωση των ψαριών (Miller *et al.*, 1988; Fuiman, 1997). Ειδικότερα στους Τελεόστεους με πλαγκτονικά πρώιμα οντογενετικά στάδια, η θνησιμότητα λόγω των θηρευτών και της μη διαθεσιμότητας τροφής είναι πολύ μεγάλη και παράγοντες όπως ο ρυθμός αύξησης είναι καθοριστικοί για την επιβίωση. Παρά το ότι στο φυσικό περιβάλλον η μεταβολή της φωτοπερίοδου και της θερμοκρασίας συμπιέζουν, μέχρι σήμερα έχει εξεταστεί μόνο η μεμονωμένη επίδρασή τους στην ανάπτυξη των νυμφών (Koumoundouros *et al.*, 2001; Fielder *et al.*, 2002; Moustakas *et al.*, 2004).

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι να εκτιμηθεί η συνεπίδραση της θερμοκρασίας και της φωτοπερίοδου στο ρυθμό αύξησης των νυμφών *Danio rerio* (Hamilton, 1822), το οποίο παρουσιάζει ίδιο πρότυπο ανάπτυξης με την πλειονότητα των ειδών ψαριών. Η εκκόλαση των αυγών πραγματοποιείται σε σχετικά αδιαφοροποίητο στάδιο ανάπτυξης, ακολουθείται από ένα εκτενές νυμφικό στάδιο, τη φάση της μεταμόρφωσης των νυμφών σε ιχθύδια και τη μετάβαση από το πλαγκτονικό στο βενθοπελαγικό τρόπο διαβίωσης (Spence *et al.*, 2008; Westerfield, 1995). Επιπρόσθετα, το ανεπτυγμένο γνωστικό υπόβαθρο σε θέματα μοριακής και αναπτυξιακής βιολογίας το καθιστούν ιδανικό μοντέλο για τη μελέτη της περιβαλλοντικής βιολογίας των πρώιμων οντογενετικών σταδίων.

## 2. Μεθοδολογία

Τα έμβρυα αφέθηκαν για είκοσι τέσσερις ώρες στους 28°C και στη συνέχεια διαχωρίστηκαν σε έξι πληθυσμούς οι οποίοι υποβλήθηκαν σε συνδυασμό τριών θερμοκρασιακών συνθηκών (22, 28, 32° C ± 1° C) με δύο συνθήκες φωτοπερίοδου (14:10, 8:16 ώρες L:D) μέχρι τα 12-13 mm μέσο ολικό μήκος σώματος (TL). Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Η διατήρηση και η εκτροφή των νυμφών και των ενήλικων ψαριών πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον Westerfield (1995). Η αρχική πυκνότητα πληθυσμών ήταν 40-45 άτομα ανά λίτρο.

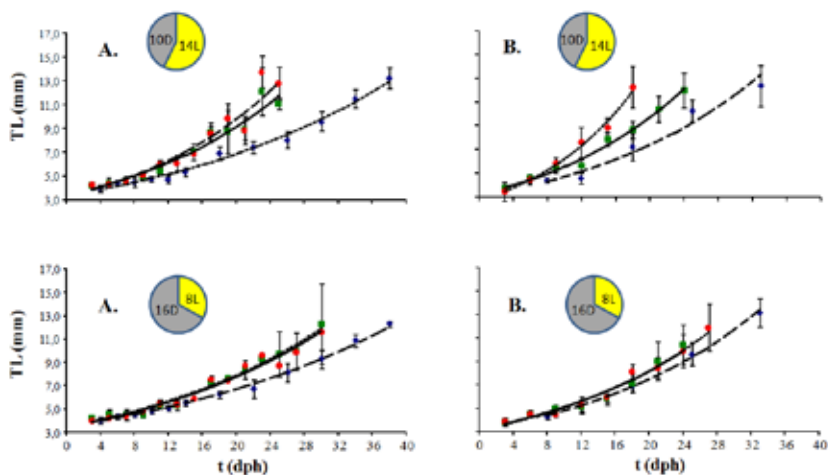
Για την εκτίμηση του ρυθμού αύξησης κάθε πληθυσμού, τυχαίο δείγμα 5-10 ατόμων λαμβανόταν κάθε 2-8 ημέρες. Τα άτομα αναισθητοποιούνταν, φωτογραφίζονταν ατομικά και συντηρούνταν στους -70° C. Το ολικό μήκος κάθε ατόμου μετρήθηκε με το λογισμικό tpsDig (έκδοση 1.37). Ο ρυθμός αύξησης κάθε πληθυσμού εκτιμήθηκε μετά από προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στο μοντέλο αύξησης  $TL = a e^{SGR \cdot t}$  (όπου  $t$  η ηλικία, και  $a$  το TL για  $t=0$ ) (Ricker, 1978), με λογαριθμοποίηση των τιμών TL. Ο στατιστικός έλεγχος των διαφορών του SGR μεταξύ των πληθυσμών έγινε με χρήση ANCOVA (Statgraphics Plus v.5).

## 3. Αποτελέσματα

Τα πειραματικά δεδομένα είχαν καλή προσαρμογή στο θεωρητικό μοντέλο αύξησης που εφαρμόστηκε. Ανάλογα με τις πειραματικές συνθήκες, ο ρυθμός αύξησης του ολικού μήκους (SGR) του *D. rerio* κατά το νυμφικό στάδιο κυμάνθηκε μεταξύ 0,033 και 0,083 d<sup>-1</sup> (Εικ. 1, Πίνακας 1).

Γενικά, όσον αφορά στην επίδραση της θερμοκρασίας στο SGR σε συνθήκες κοινής φωτοπερίοδου, στη συνθήκη 14:10 L:D παρατηρήθηκε γραμμική αύξηση του SGR με τη θερμοκρασία του νερού. Αντίθετα στη φωτοπερίοδο 8:16 L:D, το SGR παρέμεινε αμετάβλητο στο θερμοκρασιακό εύρος 28-32° C (Πίνακας 2, Εικ. 1). Ωστόσο, ο στατιστικός έλεγχος δεν επιβεβαίωσε τη σημαντικότητα των διαφορών του SGR και στις δύο πειραματικές επαναλήψεις (Πίνακας 1).

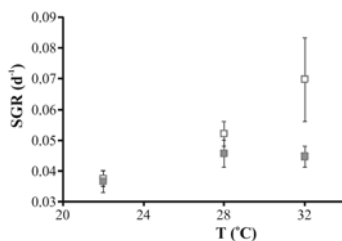
Ο ρυθμός αύξησης του ολικού μήκους αποδείχθηκε ανεξάρτητος της φωτοπερίοδου στις χαμηλές θερμοκρασιακές συνθήκες (22, 28° C,  $p > 0,05$ ), ενώ στους 32° C η αύξηση της φωτοπερίοδου προκάλεσε σημαντική αύξηση του SGR ( $p < 0,05$ ). Οι παρατηρήσεις επιβεβαιώθηκαν και στις δύο πειραματικές επαναλήψεις.



**Εικ. 1:** Καμπύλες αύξησης του μέσου ολικού μήκους ( $TL \pm 1SD$ ) των νυμφών στις διαφορετικές συνθήκες φωτοπεριόδου (14:10 και 8:16 L:D) και θερμοκρασίας (22, 28, 32 °C). ♦, 22° C. ■, 28° C. ●, 32° C. dph, ημέρες μετά την εκκόλαψη. A και B, πρώτη και δεύτερη πειραματική επανάληψη αντίστοιχα.

**Πίνακας 1:** Παράμετροι της σχέσης  $TL = a e^{SGR^t}$  για κάθε θερμοκρασία ανάπτυξης (T), φωτοπερίοδο (L:D, ώρες) και πειραματική επανάληψη (Rep). a, σημείο τομής με τον άξονα του TL (ολικό μήκος σώματος). SGR, ρυθμός αύξησης του ολικού μήκους. r, συντελεστής συσχέτισης. n, αριθμός δειγματοληψιών.  $p_{L:D}$  επίπεδο σημαντικότητας της διαφοράς του SGR μεταξύ των δύο συνθηκών φωτοπεριόδου, για κάθε επανάληψη και θερμοκρασία. Οι κοινοί εκθέτες των τιμών SGR υποδεικνύουν ομοιογενείς ρυθμούς αύξησης εντός κάθε επανάληψης και συνθήκης φωτοπεριόδου.

Rep	L:D	T (°C)	ln a	SGR	r	n	$P_{L:D}$
A	14:10	22	1,233	0,035 <sup>1</sup>	0,993	12	-
		28	1,216	0,048 <sup>2</sup>	0,978	10	-
		32	1,166	0,056 <sup>2</sup>	0,976	12	*
	8:16	22	1,249	0,033 <sup>1</sup>	0,998	12	
		28	1,232	0,041 <sup>2</sup>	0,985	13	
		32	1,239	0,041 <sup>2</sup>	0,985	14	
B	14:10	22	1,251	0,040 <sup>1</sup>	0,990	5	-
		28	1,159	0,056 <sup>2</sup>	0,993	8	-
		32	1,000	0,083 <sup>3</sup>	0,997	6	*
	8:16	22	1,250	0,040 <sup>1</sup>	0,999	5	
		28	1,156	0,050 <sup>1</sup>	0,982	8	
		32	1,143	0,048 <sup>1</sup>	0,987	9	



**Εικ. 2:** Μέσος ρυθμός αύξησης του TL ( $SGR \pm 1SE$ ) των νυμφών στις διαφορετικές συνθήκες φωτοπεριόδου και θερμοκρασίας (T). ■, φωτοπερίοδος 8:16 D:L. □, φωτοπερίοδος 14:10 D:L.

#### 4. Συμπεράσματα - Συζήτηση

Απ' όσο γνωρίζουμε, δεν υπάρχουν άλλες δημοσιεύσεις για τη συνεπίδραση της θερμοκρασίας και της φωτοπεριόδου στο ρυθμό αύξησης του ολικού μήκους των νυμφών. Είναι γνωστό όμως ότι και οι δύο παράγοντες είναι εξαιρετικά σημαντικοί σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των ψαριών. Στο στάδιο του αυγού, προηγούμενες μελέτες έχουν δείξει άμεση επίδραση της θερμοκρασίας (Klimogianni *et al.*, 2004) και της φωτοπεριόδου (Downing, 2002) στο χρόνο εκκόλαψης και στη θνησιμότητα. Όσον αφορά στο στάδιο των νυμφών, προηγούμενες μελέτες αναφέρουν ότι για τα είδη *Salmo trutta* (Brown, 1946, 1957), *Palalychthis olivaceus* (Seikai *et al.*, 1987) και *Solea solea* (Amara *et al.*, 1994) η αύξηση της θερμοκρασίας (εντός των ορίων ανοχής) αυξάνει το ρυθμό αύξησης. Επίσης για τα είδη *Pagrus auratus* (Fielder *et al.*, 2002) και *Palalichthis lethostigma* (Moustakas *et al.*, 2004) έχει βρεθεί ότι, σε σταθερή θερμοκρασία, η μεγάλη διάρκεια φωτός οδηγεί σε αύξηση του SGR.

Στη παρούσα εργασία, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας και της φωτοπεριόδου στο ρυθμό αύξησης του ολικού μήκους των νυμφών του *D. rerio*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι δύο παράγοντες συνεπιδρούν στο ρυθμό αύξησης του ολικού μήκους, με τον καθένα από αυτούς να ελέγχει τη δράση του άλλου. Υποδεικνύεται έτσι η αναγκαιότητα πειραματικού ελέγχου της συνεπίδρασης αυτών των παραγόντων και σε άλλα είδη ψαριών. Επιπρόσθετα, το *D. rerio* προτείνεται πλέον ως πρότυπος οργανισμός για την εις βάθος μελέτη των περιβαλλοντικών επιπτώσεων στην ανάπτυξη των νυμφών των ψαριών.

#### 5. Ευχαριστίες

Εκφράζουμε τις ευχαριστίες μας στις κ. Γλυνάτση Ν., Νικούλη Σ., και Βαγιάννη Γ., καθώς στον κ. Κοκκινιά Π., για τη συμμετοχή τους στη διατήρηση των πειραματικών πληθυσμών.

#### 6. Βιβλιογραφικές Αναφορές

- Amara, R., Desaunay, Y. & Lagardere, F., 1994. Seasonal variation in growth of larval sole *Solea solea* (L.) and consequences on the success of larval immigration. *The Netherlands Journal of Sea Research*, 32 (3-4): 287-298.
- Bailey, K.M. & Houde, E.D., 1989. Predation on eggs and larvae of marine fish and the recruitment problem. *Advances in Marine Biology*, 25: 1-83.
- Boujard, T., Gelineau, A. & Corraze, G., 1995. Time of a single daily meal influences growth performance in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture Research*, 26 (5): 341-349.
- Brown, M.E., 1946. The growth of brown trout *Salmo trutta* (L.). *Journal of Experimental Biology*, 22 (3-4): 118-155.
- Downing, G. & Litvak, M.K., 2002. Effects of light intensity, spectral composition and photoperiod on development and hatching of haddock *Melanogrammus aeglefinus* embryos. *Aquaculture*, 213 (1-4): 265-278.
- Fielder, D.S., Bardsley, W.J., Allan, G.L. & Pankhurs, P.M., 2002. Effect of photoperiod on growth and survival of snapper *Pagrus auratus* larvae. *Aquaculture*, 211 (1-4): 135-150.
- Fuiman, L.A., 1997. What can flatfish ontogenies tell us about pelagic and benthic lifestyles? *Journal of Sea Research*, 37 (3-4): 257-267.
- Koumoundouros, G., Divanach, P., Anezaki, L. & Kentouri, M., 2001. Temperature-induced ontogenetic plasticity in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Marine Biology*, 139 (5): 817-830.
- Klimogianni, A., Koumoundouros, G., Kaspiris & P., Kentouri, M., 2004. Effect of temperature on the egg and yolk-sac larval development of common pandora, *Pagellus erythrinus*. *Marine Biology*, 145 (5): 1015-1022.
- Miller, T.J., Crowder L.B., Rice, J.A. & Marschall, E.A., 1988. Larval size and recruitment mechanisms in fishes: toward a conceptual framework. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45 (9): 1657-1670.
- Moustakas, C.T., Watanabe, W.O. & Copeland, K.A., 2004. Combined effects of photoperiod and salinity on growth, survival, and osmoregulatory ability of larval southern flounder *Paralichthys lethostigma*. *Aquaculture*, 229 (1-4): 159-179.
- Seikai, T., Matsumoto, J., Shimozaki, M., Oikawa, A. & Akiyama, T., 1987. An association of melanophores appearing at metamorphosis as vehicles of asymmetric skin color formation with pigment anomalies developed under hatchery conditions in the Japanese flounder, (*Paralichthys olivaceus*). *Pigment cell research*, 1 (3): 143-151.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. & Smith, C., 2008. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological*

*Reviews*, 83 (1): 13–34.

- Thorpe, J.E., Adams, C.E., Miles, M.S. & Keay, D.S., 1989. Some influences of photoperiod and temperature on opportunity for growth in Juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* (L.). *Aquaculture*, 82 (1-4): 119–126.
- Ricker, W.E., 1979. *Growth rates and models*. In *Fish physiology Vol. VIII*. Academic Press, New York, 678-743 pp.
- Westerfield, M., 1995. *The Zebrafish Book. A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (Danio rerio), 3rd edition!*. University of Oregon Press, Eugene, Oregon, 385 pp.
- Brown, M.E., 1957. Experimental studies on growth. In: *The Physiology of Fishes*, vol. 1, M.E. Brown (Ed), Academic Press, New York and London.
- Johnson, C.H., Elliott, J., Foster, R., Honma, K. & Kronauer, R., 2004. Fundamental properties of circadian rhythms. p.67–105. In: *Chronobiology. Biological timekeeping*, J.C. Dunlap, J.J. Loros & P.J. DeCoursey (Eds), Sunderland, MA, Sinauer Associates.