

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ & ΥΔΑΤΙΝΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«Ιστολογική μελέτη της αναπαραγωγής εμπορικών ιχθύων»**

**Χαριτωνίδου Αικατερίνη**

**ΒΟΛΟΣ 2017**

**UNIVERSITY OF THESSALY  
SCHOOL OF AGRICULTURAL SCIENCES  
DEPARTMENT OF ICHTHYOLOGY AND AQUATIC  
ENVIRONMENT**

**MASTER THESIS**

**«Histological assessment of commercial fish reproductive potential»**

**Charitonidou Aikaterini**

**VOLOS 2017**

**«Ιστολογική μελέτη της αναπαραγωγής εμπορικών ιχθύων»**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

- 1) **Δημήτριος Βαφείδης**, Καθηγητής, Βιοποικιλότητα των θαλάσσιων βενθικών ασπονδύλων και άμεση- έμμεση χρησιμότητά τους, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Επιβλέπων*
- 2) **Κωνσταντίνος Γκάνιας**, Επίκουρος Καθηγητής Βιολογικής ωκεανογραφίας, Τμήμα Βιολογίας, Σχολή Θετικών Επιστημών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, *Μέλος*
- 3) **Μαριάνθη Χατζιωάννου**, Επίκουρη Καθηγήτρια (Δρ.), Εκτροφή σαλιγκαριών και βατράχων, Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, *Μέλος*

*Στην Οικογένειά μου,*

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κώστα Γκάνια για τις συμβουλές και την καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια της μελέτης και τα ινστιτούτα *AZTI* (*S. Sebastian*, Ισπανία), *Wageningen Marine Research (IJmuiden*, Ολλανδία) και *IEO* (Βίγκο, Ισπανία) για την αποστολή των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην κ. Χρυσούλα Αποστολογάμβρου για τη συνεργασία και για τη βοήθεια στο εργαστηριακό κομμάτι της εργασίας. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στους κ. Δημήτρη Βαφείδη και κ. Μαριάνθη Χατζηιωάννου για την ευκαιρία που μου δώσανε να πραγματοποιήσω αυτή τη μελέτη.

Επίσης, Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στους φίλους που ήταν δίπλα μου κατά την εκπόνηση της εργασίας και προπάντων στην οικογένειά μου που με στηρίζει σε κάθε μου βήμα.



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μέθοδος κενών ωοθυλακίων (*POF Method*) εφαρμόζεται ιδιαίτερα για τον υπολογισμό του **κλάσματος ωοτοκίας ( $S$ )**, που είναι μία πληθυσμιακή παράμετρος για την εκτίμηση της **συχνότητας ωοτοκίας ( $f$ )** στους πολλαπλούς αποθέτες. Στη συνέχεια, η τιμή της **συχνότητας ωοτοκίας ( $f$ )** χρησιμοποιείται για την περαιτέρω εφαρμογή της μεθόδου ημερήσιας παραγωγής αβγών (*DEPM*) με σκοπό τη διαχείριση των ιχθυοαποθεμάτων. Παρά τη δημοφιλή της χρήση η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει ανακριβής όταν τα κριτήριά της εφαρμόζονται σε είδη και πληθυσμούς που δεν έχουν πρώτα δοκιμαστεί και επικυρωθεί. Γενικά, η σαρδέλα του Ατλαντικού (*Sardina pilchardus*) είναι ένα πολύ καλά μελετημένο είδος και χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία ως μάρτυρας για να επιβεβαιωθεί η σωστή εφαρμογή της μεθόδου. Το σκουμπρί του Ατλαντικού (*Scomber scombrus*) από την άλλη είναι ένα όχι και τόσο καλά μελετημένο είδος με αρκετές αμφιβολίες τόσο για το πρότυπο γονιμότητάς του όσο και για τις μεθόδους που εφαρμόζονται για τη διαχείριση του πληθυσμού του. Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας ήταν η εκτίμηση της ποσότητας των *POF* με τη βοήθεια της ιστολογίας και της μεθόδου της στερεολογίας και στα δύο είδη. Βασικός σκοπός δεν ήταν οι εκτιμήσεις γονιμότητας, αλλά να δειχθεί αν μπορεί να εφαρμοστεί η **μέθοδος των *POF*** στο σκουμπρί. Στη σαρδέλα βρέθηκε ότι η μέθοδος εφαρμόζεται σωστά λόγω της ύπαρξης μίας ημερήσιας κοόρτης *POF*. Στο σκουμπρί όμως βρέθηκε να συνυπάρχουν 2 ή και 3 ημερήσιες κοόρτες κενών ωοθυλακίων, η συνύπαρξη αυτή φάνηκε να προκαλεί υπερεκτίμηση της **σχετικής γονιμότητας ομάδας** καθώς ο γοναδοσωματικός δείκτης έδειξε να μην επηρεάζει την τιμή της. Έτσι, η χρήση του **κλάσματος ωοτοκίας** όταν υπάρχουν περισσότερες από μία κοόρτες *POF* είναι δύσκολη. Ίσως αντί της πληθυσμιακής αυτής παραμέτρου να είναι καταλληλότερη



για αυτό το είδος η χρήση του **μεσοδιαστήματος ωοτοκίας** (*spawning interval, SI*) η οποία αποτελεί μία ατομική παράμετρο υπολογισμού της **συχνότητας ωοτοκίας**. Περαιτέρω μελέτη τόσο στο σκουμπρί του Ατλαντικού όσο και σε άλλα είδη είναι απαραίτητη για τη σωστή εφαρμογή των μεθόδων.

**Λέξεις κλειδιά:** μέθοδος κενών ωοθυλακίων (*POF Method*), κλάσμα ωοτοκίας (*S*), κενά ωοθυλάκια, *Scomber scombrus*

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
Πρότυπα γονιμότητας .....	1
Μέθοδοι παραγωγής αβγών ( <i>EPMs</i> ).....	2
Εκτίμηση της γονιμότητας.....	3
Εκτίμηση της συχνότητας ωοτοκίας.....	4
Μέθοδος των κενών ωοθυλακίων ( <i>POF Method</i> ) .....	6
Κενά ωοθυλάκια .....	7
Αναπαραγωγική Βιολογία.....	8
Το σκουμπρί του Ατλαντικού, <i>Scomber scombrus</i> (Linnaeus, 1758).....	8
Η σαρδέλα του Ατλαντικού, <i>Sardina pilchardus</i> (Walbaum, 1792).....	12
Σκοπός.....	15
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	17
Στάδιο Ιστοκινέτας.....	17
Διαδικασία σκλήνωσης.....	18
Μικροτόμος και χρώση.....	19
Δημιουργία φωτογραφίας- μωσαϊκού.....	20
Στερεολογική μέθοδος .....	22
Εκτίμηση της σχετικής γονιμότητας ομάδας .....	25
Στατιστικές αναλύσεις .....	26
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	27
Σχέση περιοχής κενών ωοθυλακίων και σταδίων ωοθήκης .....	27
Σχέση σχετικής γονιμότητας ομάδας και γοναδοσωματικού δείκτη .....	31
Σχέση σχετικής γονιμότητας ομάδας και μεγέθους κενών ωοθυλακίων .....	32
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	34
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	39
ABSTRACT .....	46
Π Α Ρ Α Ρ Τ Η Μ Α .....	47

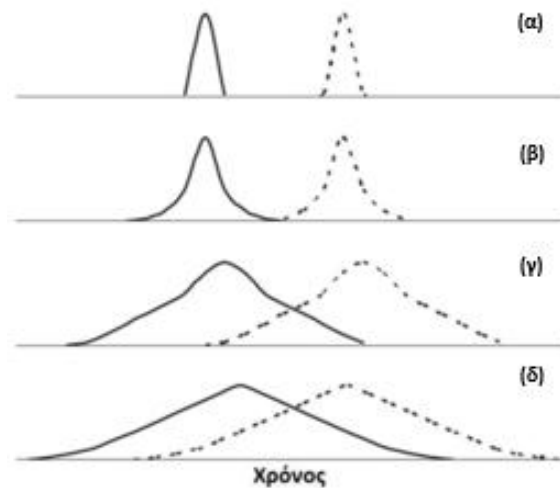
## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### Πρότυπα γονιμότητας

Τα ψάρια αναπτύσσουν διάφορες αναπαραγωγικές στρατηγικές έτσι ώστε να αυξήσουν την πιθανότητα επιβίωσης των απογόνων τους (Balon 1985, Winemiller 1989). Στην προσπάθεια αυτή περιλαμβάνεται η **συχνότητα ωοτοκίας**, ο **αριθμός των αυγών που αποτίθενται** καθώς και το **πρότυπο γονιμότητας** που ακολουθείται (Lowerre-Barbieri *et al.* 2011). Δύο αναπαραγωγικές στρατηγικές έχουν αναπτυχθεί όσον αναφορά το πρότυπο γονιμότητας, η **ακαθόριστη** και η **καθορισμένη** (Hunter *et al.* 1992, Murua & SaboridoRey 2003). Συγκεκριμένα, η διάκριση βασίζεται στο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μεταξύ της περιόδου παραγωγής των ωοκυττάρων που πρόκειται να αποτεθούν και της περιόδου ωοτοκίας (Ganias 2013) (**Εικ. 1**). Υπάρχουν πληθυσμοί οι οποίοι έχουν πλήρως διακριτές και διαχωρισμένες τις δύο περιόδους (**Εικ. 1α**), πληθυσμοί στους οποίους οι δύο αυτές περιόδοι επικαλύπτονται (**Εικ. 1β-γ**) και πληθυσμοί που έχουν την τάση του απόλυτα ακαθόριστου πρότυπου, όπου το ποσοστό των ωοκυττάρων εισδοχής αυξάνεται μετά την έναρξη της ωοτοκίας (**Εικ. 1δ**).

Τα κυριότερα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μεταξύ **ακαθόριστου** και **καθορισμένου τύπου γονιμότητας** είναι τα ακόλουθα (Hunter *et al.* 1989, Greer Walker *et al.* 1994, Murua & SaboridoRey 2003):

- 1) Εμφάνιση χάσματος μεγέθους στην κατανομή της συχνότητας μεγέθους των ωοκυττάρων.
- 2) εποχιακή μεταβολή της ολικής γονιμότητας.
- 3) εποχιακή μεταβολή της μέσης διαμέτρου των προηγμένων λεκιθικών ωοκυττάρων.
- 4) συχνότητα εμφάνισης ατρησίας κατά τη περίοδο ωοτοκίας.



**Εικόνα 1:** Πρότυπα γονιμότητας (α) Απόλυτα καθορισμένο, (β) Οριακά καθορισμένο, (γ) Οριακά ακαθόριστο, (δ) Απόλυτα ακαθόριστο. (Πηγή: Ganias 2013).

### Μέθοδοι παραγωγής αυγών (*EPMs*)

Για τη διαχείριση των αποθεμάτων των ιχθύων σημαντική είναι η εκτίμηση της **αναπαραγόμενης βιομάζας** (*spawning stock biomass, SSB*), δηλαδή της βιομάζας των ατόμων ενός πληθυσμού, που έχουν ηλικία ίση ή μεγαλύτερη από την ηλικία 1ης αναπαραγωγικής ωρίμανσης και άρα είναι σε θέση να αναπαραχθούν. Οι πιο αξιόπιστες μέθοδοι εκτίμησής της είναι οι **μέθοδοι παραγωγής αυγών** (*egg production methods, EPMs*). Οι μέθοδοι αυτοί είναι ανεξάρτητες από την αλιεία (Armstrong & Witthames 2012, Bernal *et al.* 2012, Kraus *et al.* 2012) και παρέχουν πληροφορίες για την αναπαραγωγική βιολογία και τα ενδιαίτηματα ωοτοκίας των εκάστοτε αλιευμένων ειδών, εμπορικών και μη (Fives *et al.* 2001, Goncalves *et al.* 2009). Έχουν αναπτυχθεί τρεις *EPMs* : (1) η μέθοδος ημερήσιας παραγωγής αυγών (*daily egg production*

*method, DEPM*), (2) μέθοδος ετήσιας παραγωγής αυγών (*annual egg production method, AEPM*), και (3) μέθοδος ημερήσιας μείωσης γονιμότητας (*daily fecundity reduction method, DFRM*). Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της *AEPM* και της *DFRM* είναι το είδος να ακολουθεί καθορισμένο πρότυπο γονιμότητας, ενώ η *DEPM* μπορεί να εφαρμοστεί σε είδη τόσο με καθορισμένο όσο και με ακαθόριστο πρότυπο. Η *DEPM* είναι η πιο συνήθης μέθοδος εκτίμησης ιχθυοαποθεμάτων και προτιμάται λόγω του χαμηλότερου κόστους και της γρηγορότερης συλλογής και ανάλυσης των δεδομένων σε αντίθεση με την *AEPM* που απαιτεί μεγαλύτερο αριθμό δειγματοληψιών.

### Εκτίμηση της γονιμότητας

Σημαντικό για τη χρήση των παραπάνω μεθόδων είναι η εκτίμηση της γονιμότητας (*fecundity, F*). Η γονιμότητα ορίζεται ως μία ποσοτική μεταβλητή που εκφράζει την ποσότητα των αυγών που παράγονται από τα θηλυκά (Ganias *et al.* 2015a).

Ανάλογα με τη στρατηγική εισδοχής που ακολουθεί το κάθε υπό μελέτη είδος υπάρχουν αρκετοί τρόποι μέτρησης της γονιμότητας. Αρχικά, η απλούστερη μέθοδος είναι η γονιμότητα ομάδας (*Batch fecundity, Fb*), δηλαδή η ποσότητα των αυγών που απελευθερώνονται ανά αναπαραγωγικό γεγονός και η σχετική γονιμότητα ομάδας (*Relative batch fecundity, RFb*), όπου είναι η γονιμότητα ομάδας διαιρεμένη με το εκάστοτε βάρος του θηλυκού. Άλλη μέτρηση της γονιμότητας είναι η ημερήσια γονιμότητα, η οποία είναι η ποσότητα των γεννημένων αυγών ανά θηλυκό (ή ανά μονάδα βάρους του θηλυκού) ανά ημέρα (Ganias *et al.* 2015a). Στους απλούς αποθέτες

(*single spawners*, π.χ. σολομοί, χέλια) η **γονιμότητα** ταυτίζεται με τη **γονιμότητα ομάδας**, καθώς το σύνολο των αβγών της αναπαραγωγικής τους περιόδου αποβάλλεται σε ένα μόνο αναπαραγωγικό γεγονός. Αντίθετα, στους **πολλαπλούς αποθέτες** (*multiple spawners*) η παραγωγή κι αποβολή των αβγών είναι τμηματική και πραγματοποιείται ανά ομάδες (*batches*), οι οποίες απελευθερώνονται σε μια συνήθως εκτεταμένη αναπαραγωγική περίοδο, σε αυτή την περίπτωση η **ημερήσια γονιμότητα** είναι ίση με τη **γονιμότητα ομάδας** πολλαπλασιασμένη με τη **συχνότητα ωοτοκίας** ( $f$ ) (Ganias *et al.* 2015a).

### Εκτίμηση της συχνότητας ωοτοκίας

Η **συχνότητα ωοτοκίας** (*spawning frequency, f*) στους πολλαπλούς αποθέτες εκφράζει τον αριθμό των γεγονότων ωοτοκίας ανά μονάδα χρόνου, συνήθως ανά ημέρα. Η συχνότητα ωοτοκίας μπορεί να υπολογιστεί είτε ως μία **ατομική παράμετρος** μέσω **μεσοδιαστήματος ωοτοκίας** (*spawning interval, SI*) δηλαδή ο χρόνος που μεσολαβεί μεταξύ επακόλουθων γεγονότων ωοτοκίας, ή ως **πληθυσμιακή παράμετρος** μέσω του **κλάσματος ωοτοκίας**, (*spawning fraction, S*), δηλαδή του ποσοστού των ωοτοκούντων θηλυκών ανά ημέρα. Το **κλάσμα ωοτοκίας** συνήθως εκτιμάται από το ποσοστό ανά δείγμα ώριμων θηλυκών που περιέχουν στην ωοθήκη τους **κενά ωοθυλάκια** που σχετίζονται με μία αναγνωρίσιμη ημερήσια κοόρτη ωοτοκίας (Ganias 2012). Γενικά, το ζητούμενο για την εκτίμηση της  $S$  είναι η ικανότητα προσδιορισμού των ημερησίων κλάσεων ωοτοκίας από ιστολογικούς δείκτες των γονάδων που μαρτυρούν επικείμενες ή πρόσφατες δραστηριότητες ωοτοκίας (Ganias *et al.* 2015a). Ειδικότερα, στους γεννήτορες με **ακαθόριστο πρότυπο γονιμότητας** η εκτίμηση της  $S$

γίνεται κυρίως με τη **μέθοδο των κενών ωοθυλακίων (POF Method)**, η οποία εξηγείται παρακάτω. Επιπλέον, υπάρχουν και άλλες μέθοδοι όπως, η **μέθοδος για αποθέματα με υψηλές τιμές S**, **μέθοδοι βασισμένοι στην εκτίμηση της θέσης αναπαραγωγής**, μέσω των **ενυδατωμένων ωοκυττάρων, του ποσοστού των επικείμενων πριν την ωοτοκία θηλυκών (oocyte maturation, OM)**, της **συνύπαρξης διαφορετικών σταδίων ωοτοκίας**, με τη **μέθοδο χρήσης του γοναδοσωματικού δείκτη (GSI)** και τέλος με τη **μέθοδο της ανάπτυξης των ωοκυττάρων** (Ganias 2012).

Συγκεκριμένα, η **S** υπολογίζεται ως το κλάσμα της ημερήσιας κλάσης γεννητόρων  $Day_i$  ( $i=0,1,2,\dots$ ) προς τον συνολικό αριθμό των αναπαραγωγικά ώριμων θηλυκών. Στην τάξη της πρώτης ημέρας,  $Day_0$ , οι γεννήτορες είναι συνήθως ιχθύες που είχαν ή θα μπορούσαν να έχουν ωοτοκήσει τη νύχτα της δειγματοληψίας, παρουσιάζουν ενυδατωμένα ωοκύτταρα και ίσως έχουν ή όχι νέα κενά ωοθυλάκια. Στη δεύτερη ημέρα,  $Day_1$ , οι γεννήτορες είναι ιχθύες που είχαν ωοτοκήσει το προηγούμενο βράδυ. Στην τρίτη ημέρα,  $Day_2$ , συμπεριλαμβάνονται γεννήτορες που είχαν ωοτοκήσει δύο βράδια πριν και συνεχίζεται με το ίδιο μοτίβο (Ganias *et al.* 2015a).

Οι εκτιμήσεις της **συχνότητας ωοτοκίας** είναι βασικού ενδιαφέροντος επειδή χρησιμοποιούνται για την διερεύνηση χρονικών μοτίβων στη δυναμική της αναπαραγωγής των ιχθύων (Lowerre-Barbieri *et al.* 2011), στην εκτίμηση της βιομάζας αναπαραγωγής μέσω της **μεθόδου ημερήσιας παραγωγής αβγών** (Parker 1980, Hunter and Goldberg 1980, Picquelle & Stauffer 1985) και στην εκτίμηση της **ετήσιας παραγωγής αβγών** στους γεννήτορες με ακαθόριστο πρότυπο γονιμότητας (Claramunt *et al.* 1994, LaPlante & Schultz 2007).

### Μέθοδος των κενών ωοθυλακίων (*POF Method*)

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την εκτίμηση του **κλάσματος ωοτοκίας** στους **πολλαπλούς αποθέτες** είναι η **μέθοδος των κενών ωοθυλακίων (*postovulatory follicle method, POF Method*)** για πρώτη φορά παρουσιάστηκε πριν από περίπου 30 χρόνια από το John Hunter και τους συνεργάτες του (Hunter & Goldberg 1980, Hunter & Macewicz 1980, Hunter & Macewicz 1985). Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε κάτω από το πλαίσιο εκτίμησης της βιομάζας ωοτοκίας μέσω της **DEPM** στο γαύρο της Καλιφόρνιας *Engraulis mordax* (Parker 1980). Αν και η μέθοδος αυτή σχεδιάστηκε για τα αποθέματα του συγκεκριμένου ιχθυοποθέματος έχει εφαρμοστεί όχι μόνο σε άλλους πολλαπλούς αποθέτες Κλουπεοειδών, αλλά επίσης και σε έναν μεγάλο αριθμό άλλων τάξεων ιχθύων (Ganias 2012).

Η πιο ακριβής διαδικασία για τον υπολογισμό των κενών ωοθυλακίων είναι η ιστολογία. Η **ιστολογία** αποτελεί την πιο αμερόληπτη μέθοδο για τον προσδιορισμό των δομών αλλά έχει μερικούς περιορισμούς στην ακριβή ποσοτικοποίηση της συχνότητας εμφάνισης και της πυκνότητας των δομών αυτών (Murua *et al.* 2003). Έτσι, πολλές μελέτες γονιμότητας ιχθύων για να αποφύγουν αυτούς τους περιορισμούς ακολουθούν τις αρχές της **στερεολογίας**. Με τη χρήση της στερεολογίας μπορεί να γίνει η ερμηνεία των τριών διαστάσεων από φωτογραφίες δύο διαστάσεων. Κατά την εφαρμογή της αυξάνεται η ακρίβεια στις εκτίμησης των ωοκυττάρων. Παλιότερα οι μετρήσεις γίνονταν από το μικροσκόπιο και οδηγούσαν σε αρκετά λάθη και ανακρίβειες και χρειαζόταν αρκετές ώρες εργασίας. Η ιστολογία σε συνδυασμό με τη στερεολογία έχουν βελτιώσει αυτές τις συνθήκες (Kjesbu *et al.* 2010).

Η διαδικασία εκτίμησης της **S** με βάση τη μέθοδο κενών ωοθυλακίων ακολουθεί 4 στάδια. 1) Αναγνώριση και προσδιορισμό του σταδίου των **POF** στην ιστολογική τομή,

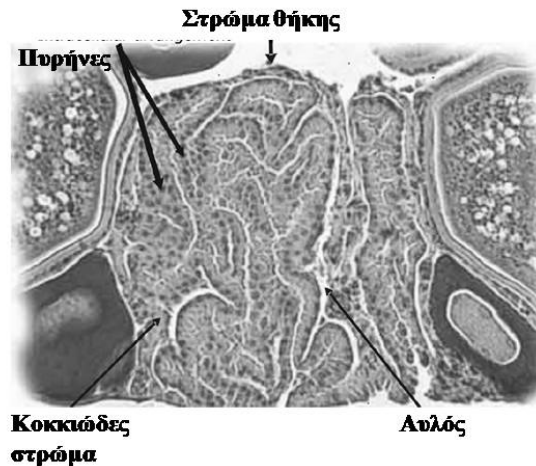


2) προσδιορισμό της ηλικιακής τάξης **POF** μέσω της χρήσης κλείδας, 3) κατανομή θηλυκών σε ημερήσιες τάξεις γεννητόρων,  $Day_i$ , 4) Διαίρεση του αριθμού των θηλυκών κάθε τάξης,  $Day_i$ , με τον αριθμό των ιχθύων που αναλύθηκαν (Ganias *et al.* 2015a).

Παρόλο τη δημοφιλή χρήση της, η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει ανακριβής όταν τα κριτήριά της εφαρμόζονται σε άλλα είδη και πληθυσμούς που δεν έχουν πρώτα δοκιμαστεί και επικυρωθεί, κι έτσι μπορεί να οδηγήσουν σε λανθασμένα αποτελέσματα εξαιτίας λανθασμένων προσεγγίσεων (Ganias 2012).

### **Κενά ωοθυλάκια**

Τα κενά ωοθυλάκια είναι παροδικά υπολείμματα από θυλάκια που έχουν υποστεί ωορρηξία τα οποία παραμένουν μέσα στην ωοθήκη μετά την ωοτοκία μέχρι να απορροφηθούν πλήρως (Saidapur 1982). Αυτές οι δομές απαρτίζονται από κύτταρα θυλακίου (κοκκιώδη) περιτριγυρισμένα από συνδετικό ιστό θήκης (**Εικ. 2**). Οι Hunter & Goldberg (1980) βασισμένοι στην περιγραφή της αποδιοργάνωσης των κενών ωοθυλακίων στα αποθέματα του *E. mordax* καθιέρωσαν ένα σύστημα ταξινόμησης αυτών των δομών. Παρατήρησαν ότι η ωοτοκία κυρίως λαμβάνει χώρα σε μία διακριτή περίοδο της ημέρας, το οποίο επέτρεψε τον προσδιορισμό των ημερήσιων κοόρτων κενών ωοθυλακίων στις ωοθήκες. Συγκεκριμένα, πρότειναν δύο κύρια στάδια σύμφωνα με το χρόνο που έχει περάσει από την ωοτοκία: 1)  $Day_0$  (<24 ώρες μετά την ωοτοκία), και 2)  $Day_1$  (μεταξύ 24 και 48 ωρών μετά την ωοτοκία). Σε 48 ώρες μετά την ωοτοκία, η διαδικασία αποδιοργάνωσης προχωράει περισσότερο και τα κενά ωοθυλάκια είναι πιθανόν να μοιάζουν και να μπερδεύονται με ενδιάμεσα ατρητικά ωοκύτταρα (Ganias *et al.* 2015a).



**Εικόνα 2** : Σημαντικά ιστολογικά χαρακτηριστικά ενός κενού ωοθυλακίου. (τροποποιημένη: Ganias 2012).

## Αναπαραγωγική Βιολογία

### Το σκουμπρί του Ατλαντικού, *Scomber scombrus* (Linnaeus, 1758)

Το σκουμπρί του Ατλαντικού είναι ένα κοινό και τοπικά άφθονο είδος με διακυμάνσεις στις εκφορτώσεις (ICES 2016). Υπάρχουν δύο πληθυσμοί, ανατολικά και δυτικά (**Εικ. 3**).

Το ιχθυοαπόθεμα των δυτικών ακτών του Β. Ατλαντικού χωρίζεται σε δύο επιμέρους πληθυσμούς με καθόλου ή ελάχιστο μεταξύ τους υβριδισμό (Jansen & Gislason 2013), ενώ το Ανατολικό χωρίζεται σε 3 επιμέρους πληθυσμούς: το Δυτικό, το Νότιο και αυτό της Βόρειας θάλασσας που αντιστοιχούν στο 75, 22 και 3% αντίστοιχα του συνολικού ιχθυοαποθέματος (ICES 2016). Τα ιχθυοαποθέματα του σκουμπριού του Β. Ατλαντικού, τόσο των ανατολικών όσο και των δυτικών ακτών, εμφανίζουν

εποχιακές μεταβολές λόγω της επίδρασης αβιοτικών παραγόντων όπως η θερμοκρασία και η υδροδυναμική σε διαφορετικές περιοχές (Jansen & Gislason 2013).



**Εικόνα 3:** Γεωγραφική εξάπλωση του *Scomber scombrus* (Linnaeus, 1758) (Πηγή: IUCN 2011).

Γενικά, πρόκειται για ένα πελαγικό, ωκεανόδρομο είδος. Είναι άφθονο σε κρύες και εύκρατες περιοχές υφαλοκρηπίδων, και σχηματίζει μεγάλα κοπάδια κοντά στην επιφάνεια. Εντοπίζεται σε μεγάλο εύρος βάθους από 15 m ως και 200 m (Bartsch & Coombs 2004). Διαχειμάζει σε βαθύτερα νερά, αλλά μεταβαίνει πιο κοντά στην ακτή την άνοιξη όταν οι θερμοκρασίες του νερού κυμαίνονται μεταξύ 11°C και 14°C. Τρέφεται με ζωοπλαγκτόν και μικρά ψάρια. Τα αυγά και οι προνύμφες του είναι πελαγικά. (IUCN 2011).

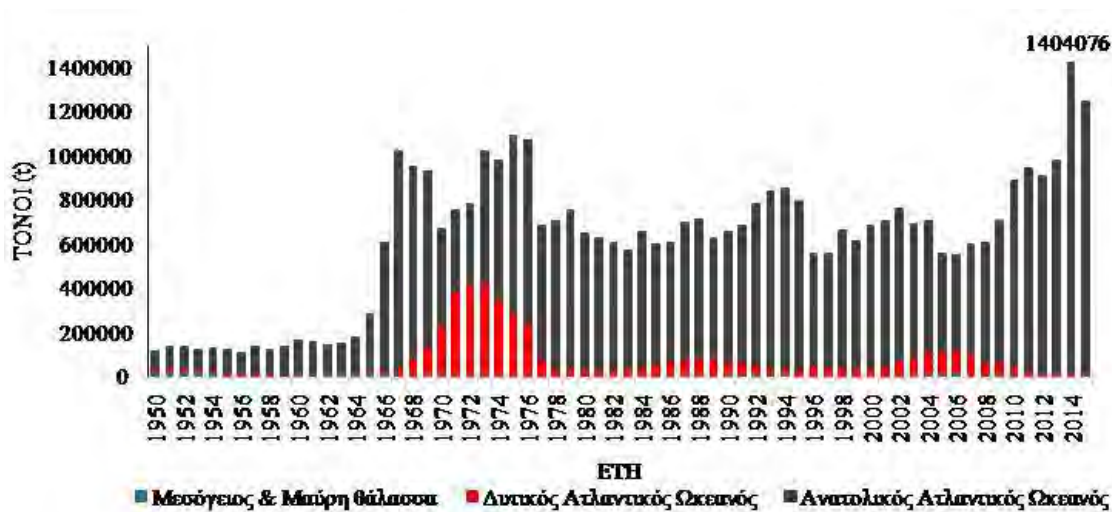
Λόγω της μορφολογίας του σώματός του έχει την ικανότητα να αναπτύσσει υψηλές ταχύτητες (Wardle & He 1988) που το βοηθούν να πραγματοποιεί μεγάλης

κλίμακας μετακινήσεις (Sette 1943). Το μέσο μήκος σώματός του (*TL*) είναι 30 cm, ενώ το μέγιστο είναι 66 cm, αν και είναι σπάνια τα ψάρια μεγαλύτερα από 50 cm. Ωριμάζει σεξουαλικά σε ηλικία περίπου 2 ετών (O'Brien *et al.* 1993), με 100% ωριμότητα σε ηλικία 7 ετών σε μερικούς πληθυσμούς του ανατολικού αποθέματος (Skagen 1989). Η μακροβιότητα του δυτικού αποθέματος εκτιμάται ότι είναι περίπου 12 έτη (Gregoire 1993), και του ανατολικού εκτιμάται ότι είναι 18 έτη (Villamor *et al.* 2001). Συνεπώς η διάρκεια γενιάς είναι περίπου 3,5 χρόνια στο δυτικό και 6,5 χρόνια στο ανατολικό απόθεμα (Collette *et al.* 2011). Οι διαφορές στη μακροβιότητα μεταξύ των αποθεμάτων μπορεί να ισχύουν ή να οφείλονται σε διαφορές στις μεθόδους προσδιορισμού της ηλικίας, στους περιβαλλοντικούς παράγοντες ή / και στην ανταπόκριση στην αλιευτική πίεση με την πάροδο του χρόνου (IUCN 2011). Η γονιμότητα από ένα μεσαίου μεγέθους θηλυκό κυμαίνεται μεταξύ 200000 και 450000 αυγά ανά εποχή και αυξάνεται με το μέγεθος.

Η αναπαραγωγική περίοδος διαφέρει ανάλογα με τον πληθυσμό του είδους. Στο Βόρειο Ατλαντικό η κορύφωση λαμβάνει χώρα μεταξύ Μαΐου ως και αρχές Ιουνίου (Priede *et al.* 1995) ενώ για το απόθεμα των δυτικών ακτών του Ατλαντικού είναι περίπου κατά την πρώτη εβδομάδα του Ιουλίου (Ware 1977). Μεταβολές σε αυτό το πρότυπο εμφανίζονται όχι μόνο στα διάφορα γεωγραφικά μήκη αλλά και κατά την πάροδο των ετών (Priede *et al.* 1995). Το σκουμπρί του Ατλαντικού παρουσιάζει έντονα μεταναστευτικά πρότυπα, με τα πεδία ωοτοκίας να ποικίλουν με την πάροδο του χρόνου, ωστόσο τα κύρια εντοπίζονται κεντρικά στη Βόρεια Θάλασσα και στις ακτές της νότιας Ισλανδίας (Lockwood 1978, Jansen & Gislason 2013).

Το σκουμπρί αποτελεί ένα από τα υψηλότερα σε αφθονία ιχθυοαποθέματα του Β. Ατλαντικού (ICES 2016). Μεγαλύτερη συμβολή στις συνολικές εκφορτώσεις του

είδους έχουν οι πληθυσμοί στις ανατολικές ακτές του Ατλαντικού με αύξηση των εκφορτώσεων από το 2009 και μέγιστη τιμή πάνω από 1,4 Mt το 2014. Παρόλο αυτά, τα τελευταία έτη, οι εκτιμήσεις που αφορούν την αναπαραγωγική του βιομάζα παρουσιάζουν φθίνουσα τάση (ICES 2016). Οι πληθυσμοί των δυτικών ακτών του Ατλαντικού έχουν μικρότερη συμβολή στις συνολικές εκφορτώσεις που τα τελευταία έτη δεν ξεπερνούν τους 20.000 t ενώ για την περιοχή της Μεσογείου και της Μαύρης θάλασσας δεν ξεπερνούν τους 10.000 t (Σχ. 1).



Σχήμα 1: Εκφορτώσεις του σκουμπριού του Ατλαντικού από το 1950 ως και το 2015 (Πηγή: www.fao.org).

Όσο αναφορά το πρότυπο γονιμότητας που ακολουθεί το σκουμπρί, οι Greer-Walker *et al.* (1994) έδειξαν ότι σύμφωνα με τα κριτήρια των Hunter *et al.* (1989,1992) ήτανε κάπως αναμειγμένο με μισές από τις ενδείξεις να επιδεικνύουν ακαθόριστο πρότυπο, ενώ οι άλλες μισές ενδείξεις οδηγούσαν σε καθορισμένο πρότυπο. Το πιο σημαντικό που μελέτησαν ήταν η ανάπτυξη των ωοκυττάρων σε σχέση με τη διάρκεια

της περιόδου ωοτοκίας και βρήκαν ότι τα λεκιθικά ωοκύτταρα αναπτύσσονται περίπου σε μία περίοδο 140-154 ημερών. Επομένως, δεν είναι πιθανό για ένα ωοκύτταρο να αναπτυχθεί κατά τη διάρκεια της περιόδου ωοτοκίας μεταξύ 60 και 90 ημερών. Χρησιμοποιώντας όλες αυτές τις ενδείξεις οι συγγραφείς κατέληξαν ότι παρόλο που δεν είναι ένα τυπικό είδος ιχθύ με καθορισμένο πρότυπο, η πλειοψηφία των παρατηρήσεων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο πληθυσμός μπορεί να θεωρηθεί ότι έχει καθορισμένο πρότυπο.

Γενικά, το σκουμπρί του Ατλαντικού είναι **πολλαπλός αποθέτης** και επίσης εφαρμόζονται και οι δύο μέθοδοι εκτίμησης της αναπαραγόμενης βιομάζας. Συγκεκριμένα, η **AEPM** είχε αρχίσει να εφαρμόζεται από το 1968 για τον πληθυσμό της Βόρειας Θάλασσας ενώ από το 1977 εφαρμόζεται σε όλο το ιχθυοαπόθεμα του Β. Ατλαντικού (ICES 2016). Η **DEPM** άρχισε να χρησιμοποιείται από το 1989 καθώς άρχισε να αμφισβητείται ο καθορισμός του προτύπου γονιμότητας του σκουμπριού ως καθορισμένο (Priede & Watson 1993, Greer Walker *et al.* 1994).

Τέλος, σύμφωνα με τη μελέτη των Priede & Watson (1993), που μελέτησαν τους ανατολικούς πληθυσμούς του *S. scombrus*, το μέσο διάστημα ωοτοκίας (**D**) βρέθηκε ίσο με 1.61 μέρες για τον πληθυσμό στην ανατολή, 2.99 στις κεντρικές περιοχές και 5.49 στο βορρά.

### **Η σαρδέλα του Ατλαντικού, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792)**

Η σαρδέλα εντοπίζεται στο βορειοανατολικό Ατλαντικό από την Ισλανδία (σπάνια) και τη Βόρεια Θάλασσα, νότια προς το κόλπο της Κόρτε, στη Σενεγάλη

(Whitehead 1985). Πρόκειται για ένα πολύ κοινό και ευρέως διαδεδομένο είδος στη Μεσόγειο Θάλασσα. Τα κενά στην κατανομή του πιθανόν οφείλονται στην έλλειψη δεδομένων και όχι στην απουσία του από τις περιοχές αυτές (IUCN 2015). Το είδος αυτό κατοικεί σε βάθη μεταξύ 10m και 100m (Whitehead 1990) (Εικ. 4).



**Εικόνα 4:** Γεωγραφική εξάπλωση της *S. pilchardus* (Walbaum 1792) (Πηγή: IUCN 2015).

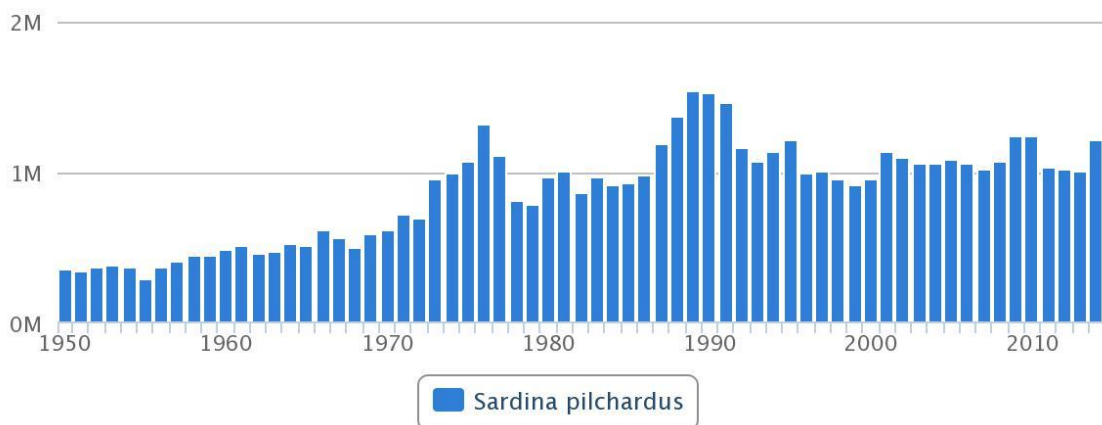
Η σαρδέλα είναι ένα σημαντικό αλιευτικό είδος. Από το 1950, τα αλιεύματα αυξάνονταν σταθερά, φτάνοντας δύο κορυφές το 1976 (1 315 685 t) και το 1990 (1 525 184 t). Το σύνολο των αλιευμάτων που αναφέρθηκαν για το είδος αυτό στον FAO για το 1999 ήταν 901 427 τόνοι. Οι χώρες με τα μεγαλύτερα αλιεύματα ήταν το Μαρόκο (429.732 τόνοι) και η Ισπανία (128.231 τόνοι)

(<http://www.fao.org/fishery/species/2910/en>) (Σχ.2). Έτσι είναι σημαντική η παρακολούθηση της αλιευτικής δραστηριότητας για τον απότερο έλεγχο της.

Το μέγιστο καταγεγραμμένο μέγεθος είναι 27,5 cm (Macer 1974) αλλά το πιο συνηθισμένο είναι 20 cm (Whitehead 1985). Το *S. pilchardus* είναι μεταναστευτικό και είναι συνήθως ένα είδος "κρύου νερού". Η διάρκεια ζωής του είναι περίπου 15 έτη (Muus & Nielsen 1999). Η σεξουαλική ωριμότητα εμφανίζεται στα 2 και 3 χρόνια (Conseil Général des Pêches pour la Méditerranée 1982) και το μήκος στην πρώτη ωριμότητα εκτιμάται ότι είναι 14,8 cm (Figueiredo & Santos 1989).

### Global Capture Production for species (tonnes)

Source: FAO FishStat



**Σχήμα 2:** Παγκόσμια επίπεδα αλίευσης για το είδος *S. pilchardus* (Walbaum, 1792) (Πηγή: [www.fao.org](http://www.fao.org)).

Η διάρκεια γενιάς μπορεί να είναι περίπου 5 έως 6 χρόνια. Η εποχή αναπαραγωγής διαφέρει στους υποπληθυσμούς της Μεσογείου και της Μαύρης Θάλασσας. Στη Μεσόγειο θάλασσα, το είδος γεννάει από τον Σεπτέμβριο έως τον Ιούνιο, με κορυφή το φθινόπωρο. Ενώ στη Μαύρη Θάλασσα, από τον Ιούνιο έως τον Αύγουστο. Η



αναπαραγωγή συμβαίνει στην ανοικτή θάλασσα ή κοντά στην ακτή, παράγοντας 50.000-60.000 αυγά ανά θηλυκό, κάθε αυγό με διάμετρο 1.5 mm (Muus & Nielsen 1999).

Σε όλα τα είδη σαρδέλας και υποείδη που έχουν μελετηθεί έως τώρα *Sardina pilchardus pilchardus* (Andreu & Pinto 1957, Quintanilla & Pérez 2000), *Sardinops sagax* (Claramunt & Herrera 1994, Macewicz *et al.* 1996), *Sardinops melanostictus* (Matsuura *et al.* 1991, Murayama *et al.* 1994), *Sardinops ocellata* (Le Clus 1979), *Sardinella brasiliensis* (Isaac-Nahum *et al.* 1988) τα θηλυκά είναι **πολλαπλή αποθέτες με ακαθόριστο πρότυπο ωοτοκίας**.

Το μέσο διάστημα μεταξύ της κάθε ωοτοκίας για τη σαρδέλα βρέθηκε να είναι 11 με 12 ημέρες στις ακτές της κεντρικής Ελλάδας (Ganias *et al.* 2003) και περίπου 6 ημέρες κατά μήκος των ανατολικών ακτών στην Κανταβρία (Quintanilla & Perez 2000).

## Σκοπός

Σκοπός της συγκεκριμένης εργασίας είναι η εκτίμηση της ποσότητας των **POF** με τη μέθοδο της στερεολογίας και στα δύο είδη.

Βασικός σκοπός δεν είναι οι εκτιμήσεις γονιμότητας, καθώς αυτές γίνονται με ελάχιστο κόστος και ελάχιστο κόπο. Ο κύριος στόχος είναι να δειχθεί αν μπορεί να εφαρμοστεί η **μέθοδος των POF** στο σκουμπρί.

Απώτερος στόχος, είναι να δειχθεί αν στο σκουμπρί συνυπάρχουν περισσότερες από μία ημερήσιες κοόρτες **POF** και να τις συγκρίνουμε με τη σαρδέλα όπου σίγουρα υπάρχει μόνο μία κοόρτη. Η συνύπαρξη από 2 κοόρτες και πάνω θα έχει άμεσες

επιπτώσεις στην εκτίμηση της **συχνότητας ωτοκίας** του αποθέματος με τη **μέθοδο των POF**.

Όπως προαναφέρθηκε, στο σκουμπρί δεν είναι ξεκάθαρο το πρότυπο γονιμότητας αλλά ούτε ελεγμένες οι εφαρμογές των διάφορων μεθόδων για τη σωστή χρήση τους. Αντίθετα, η σαρδέλα φαίνεται να είναι καλά μελετημένο είδος, γι' αυτό επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί ως ένα είδος μάρτυρα για να δειχθεί αν η **μέθοδος των κενών ωοθυλακίων** έχει εφαρμοστεί σωστά στη συγκεκριμένη μελέτη.

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Δείγματα ενός λοβού ήδη μονιμοποιημένης ωοθήκης των ειδών *S. Scombrus* και *S. pilchardus*, του Βόρειου Ατλαντικού και συγκεκριμένα του Βισκαϊκού κόλπου και της Βόρειας θάλασσας, στάλθηκαν σε φορμολή 10% από τα Ινστιτούτα AZTI (S. Sebastian, Ισπανία), Wageningen Marine Research (IJmuiden, Ολλανδία) και IEO (Βίγκο, Ισπανία). Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν 310 δείγματα ωοθηκών (Πιν. 1) και ακολουθήθηκε ιστολογική διαδικασία.

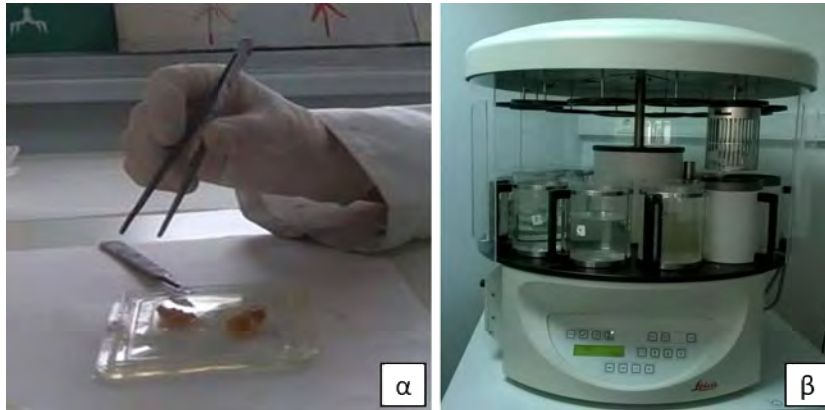
**Πίνακας 1.** Αριθμός δειγμάτων ανά είδος και προέλευσή τους.

Ινστιτούτο	Είδος	Σύνολο δειγμάτων
AZTI	<i>S. pilchardus</i>	79
IEO	<i>S. pilchardus</i>	73
IMARES	<i>S. scombrus</i>	76
AZTI	<i>S. scombrus</i>	10
IEO	<i>S. scombrus</i>	72
	<b>Total</b>	310

### Στάδιο Ιστοκινέτας

Αρχικά, πάρθηκε τμήμα από την κάθε ωοθήκη και τοποθετήθηκε σε κασετίνες (Εικ. 5α). Έπειτα, οι κασετίνες με τους ιστούς τοποθετήθηκαν στην ιστοκινέτα (*LeicaTP 1020*) μέχρι το στάδιο της παραφίνωσης (βλέπε πρωτόκολλο, Παράρτημα 1). Αναλυτικά πραγματοποιήθηκε αφυδάτωση με τη χρήση βαθμιαίων σειρών από υδατικά διαλύματα αιθανόλης με αύξουσα συγκέντρωση (70%, 95%, 100%), διαύγαση, με τον εμποτισμό του ιστού σε ξυλόλη (διαλυτικό μέσο, διαλύει το λίπος)

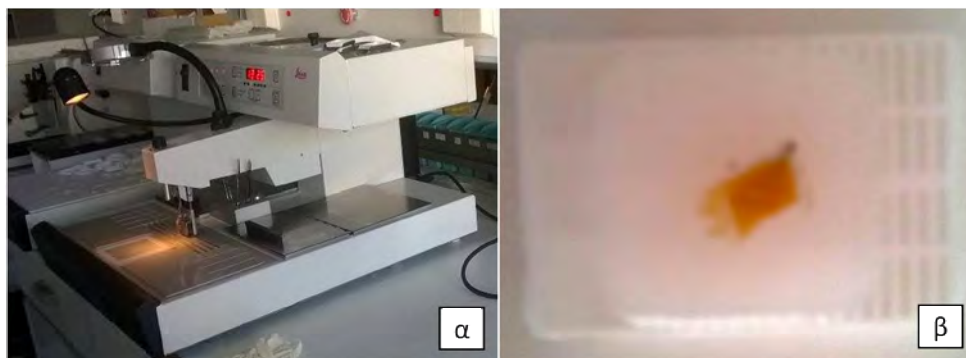
και **παραφίνωση**, εμποτισμός του ιστού σε λιωμένη παραφίνη, όπου προκαλείται εξάτμιση του διαλυτικού μέσου εξαιτίας της θερμότητας και οι χώροι που αδειάζουν γεμίζουν με παραφίνη (Χατζηιωάννου & Βαφείδης 2015) (**Εικ. 5β**).



**Εικόνα 5:** α) Αφαίρεση τμήματος του ιστού με νυστέρι, β) Ιστοκινέτα.

### **Διαδικασία σκλήνωσης**

Κατά τη διαδικασία σκλήνωσης πραγματοποιήθηκε η έγκλιση του ιστού σε παραφίνη με τη χρήση της συσκευής σκλήνωσης, *LeicaEG 1150H*. Ο αφυδατωμένος ιστός από τις κασετίνες τοποθετήθηκε σε ειδικό καλούπι με υγρή παραφίνη και μεταφέρθηκε σε ψυχρή πλάκα για τη στερεοποίησή του. Η διαδικασία της έγκλισης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 65°C. Στη συνέχεια, το καλούπι απομακρύνθηκε και τα μπλοκάκια ήταν έτοιμα για τη διαδικασία της κοπής ιστολογικών τομών (Χατζηιωάννου & Βαφείδης 2015) (**Εικ. 6α,β**).

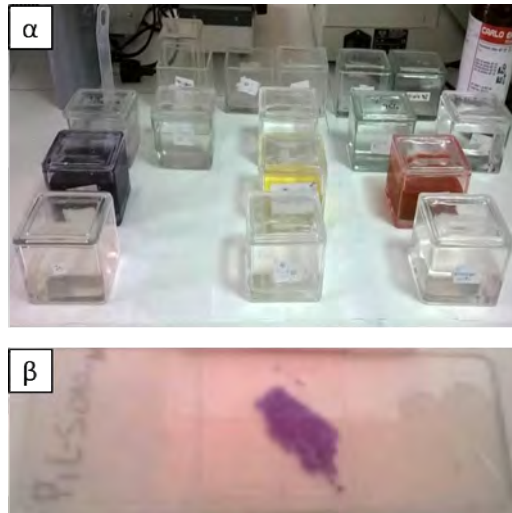


Εικόνα 6: α) Συσκευή σκίρωσης, β) καλούπι με ιστό μετά τη σκίρωση.

### Μικροτόμος και χρώση

Κατά τη διαδικασία κοπής, τα μπλοκάκια παραφίνης με τον εγκλεισμένο ιστό τοποθετήθηκαν στον ειδικό υποδοχέα της μικροτόμου (*SLEEMAINZCUT 5062*) και πάρθηκαν τομές πάχους 5μm. Οι τομές μεταφέρθηκαν αρχικά σε υδατόλουτρο, θερμοκρασίας 40°C, για να απλώσουν και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρο πλάκα και αφέθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα για να στεγνώσουν. Επακολούθησε χρώση Αιματοξυλίνης -Ηωσίνης (βλέπε πρωτόκολλο, Παράρτημα 1). Η χρώση είχε τα εξής στάδια: **αποπαραφίνωση** με τη χρήση ξυλόλης, **απομάκρυνση ξυλόλης** και **ενυδάτωση** με τη χρήση αλκοολών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. **Χρώση** με αιματοξυλίνη, όπου σε όξινο περιβάλλον εμφανίζει χρώμα ερυθρό και σε αλκαλικό μπλε και με ηωσίνη, όπου είναι μια κυτταροπλασματική χρωστική, όξινη, η οποία αντιδρά με τις κυτταρικές πρωτεΐνες που είναι πλούσιες σε βασικά αμινοξέα με αποτέλεσμα να σχηματίζεται ένα σύμπλοκο χρωστικής- πρωτεΐνης με χαρακτηριστική έντονη ροζ κυτταροπλασματική χρώση. Ακολούθησε η **αφυδάτωση** με τη χρήση αλκοολών σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και η **διαύγαση**, με τη χρήση ξυλόλης.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε επικάλυψη των ιστολογικών τομών με καλυπτρίδες χρησιμοποιώντας κατάλληλο διάφανο υλικό (Χατζηγιάννου & Βαφείδης 2015) (**Εικ. 7 α, β**).

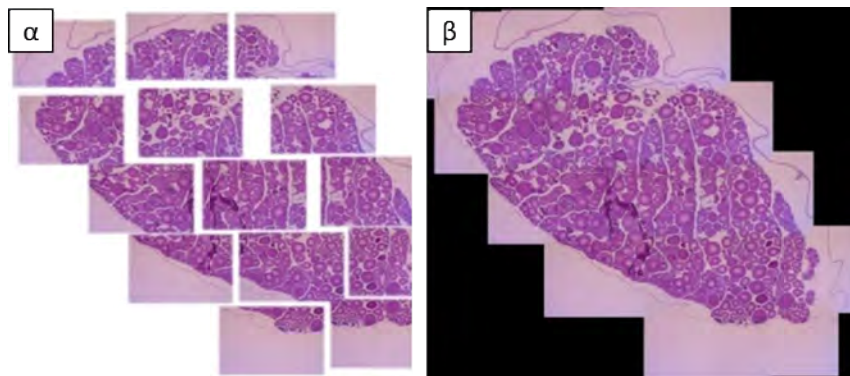


**Εικόνα 7:** α) Διαδικασία χρώσης, β) έτοιμο πλακάκι με ιστό για ανάλυση στο μικροσκόπιο.

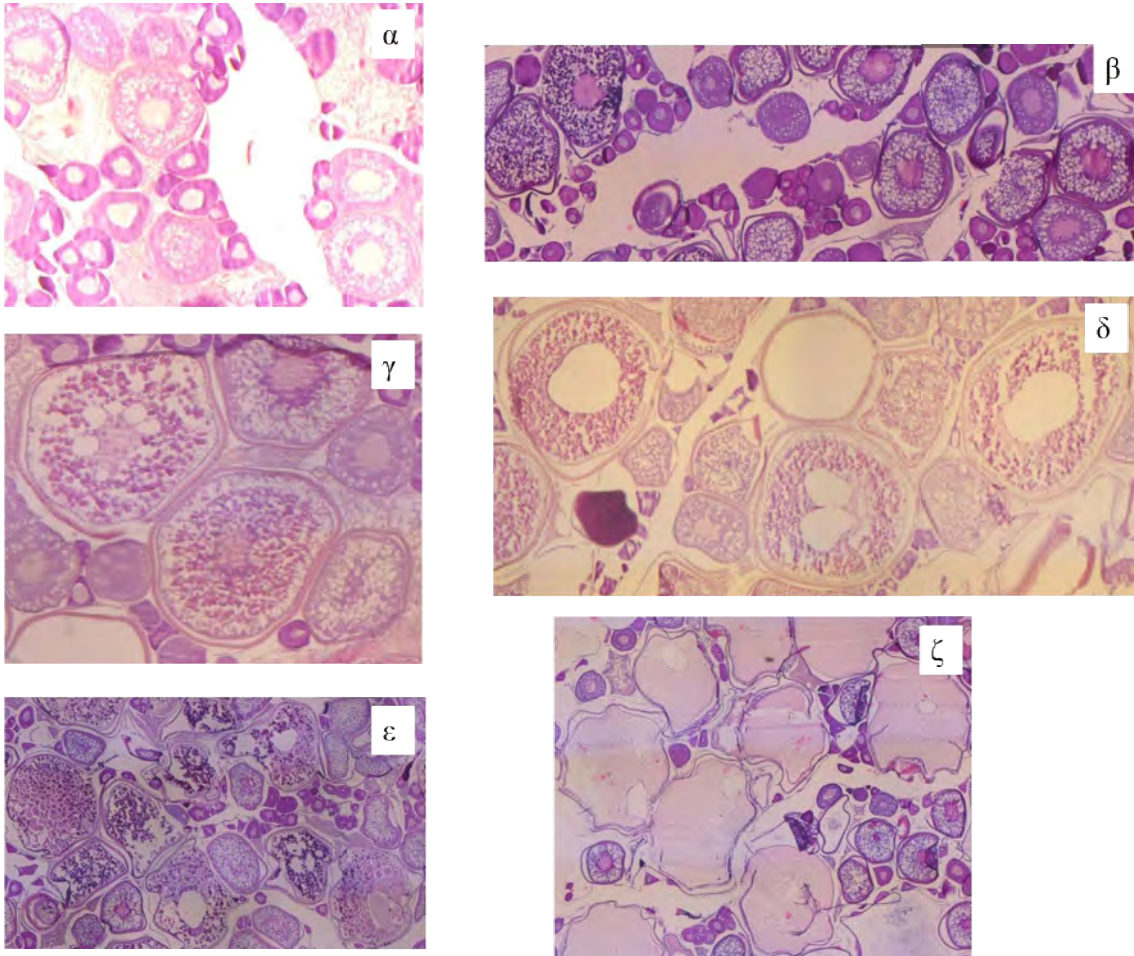
### Δημιουργία φωτογραφίας- μωσαϊκού

Οι ιστολογικές τομές και των 310 ατόμων φωτογραφήθηκαν τμηματικά (**Εικ. 8α**) σε μεγέθυνση x50 με ψηφιακή κάμερα συνδεδεμένη με οπτικό μικροσκόπιο. Κατόπιν με τη χρήση της επέκτασης (plugin) *MosaicJ* του λογισμικού προγράμματος *ImageJ 1.51p* πραγματοποιήθηκε η σύνθεση των επιμέρους φωτογραφιών κάθε ιστολογικής τομής, για να προκύψουν οι φωτογραφίες μωσαϊκά ολόκληρων των τομών (**Εικ. 8β**). Η υψηλή ανάλυση των φωτο-μωσαϊκών επέτρεψε τον προσδιορισμό του αναπτυξιακού

σταδίου της ωοθήκης με βάση τον προσδιορισμό της ομάδας των ωοκυττάρων που βρίσκονταν στο πιο προχωρημένο στάδιο. Τα αναπτυξιακά στάδια που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη βασίστηκαν στους Brown-Peterson *et al.* (2011) και ήταν τα στάδια λεκιθογένεσης 1-3, *Vtg1-3*, μετανάστευσης του πυρήνα, *GVM*, στάδιο πριν την ενυδάτωση, *GVBD*, στάδιο ενυδάτωσης, *HYD* (Εικ. 9). Επίσης προσδιορίστηκαν οι τομές που περιείχαν *POFs* και ήταν εκείνες που χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια της μελέτης.



**Εικόνα 8:** α) τμηματικές φωτογραφίες της ιστολογικής τομής στο μικροσκόπιο σε μεγέθυνση x50, β) μωσαϊκό της ιστολογικής τομής.



**Εικόνα 9:** Διάφορα στάδια ωοθήκης. α) *Vtg1*, β) *Vtg2*, γ) *Vtg3*, δ) *GVM*, ε) *GVBD*, ζ) *HYD*.

### Στερεολογική μέθοδος

Γενικά στη στερεολογική μέθοδο είναι δυνατόν να πραγματοποιηθούν ποσοτικές εκτιμήσεις από ιστολογικές τομές. Η στερεολογική μέθοδος του Weibel (1966) βασίζεται στην αρχή του Delesse (Delesse 1847) σύμφωνα με την οποία ο κλασματικός όγκος ( $V_i$ ) μιας δομής ( $i$ ) είναι ανάλογος της κλασματικής διατομής της ( $A_i$ ). Μια βασική υπόθεση αυτής της αρχής είναι ότι η δομή αυτή διανέμεται τυχαία και ομοιόμορφα διαμέσου του ιστού.



Η μέθοδος εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό του αριθμού των κενών ωοθυλάκιων στην κάθε τομή σε συνολικά 210 ιστολογικές τομές που περιείχαν κενά ωοθυλάκια. Η τιμή  $N_v$  και  $N_a$  εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας την επέκταση *ObjectJ* του λογισμικού *ImageJ 1.51p*. Συγκεκριμένα, σε κάθε φωτογραφία-μωσαϊκό δημιουργήθηκε ένα πρότυπο δίκτυο 256 σημείων εντός 4 πλαισίων καταμέτρησης για το είδος *S. pilchardus* και 3 πλαισίων καταμέτρησης για το σκουμπρί με εμβαδόν  $5\text{mm}^2$  το καθένα (βλέπε Παράρτημα 2), κάθε πλαίσιο είναι απαραίτητο να περιέχει περίπου 5000 σημεία-σταυρούς ανά  $\text{cm}^2$  (Emerson *et al.* 1990). Ο αριθμός των πλεγμάτων επιλέγεται έτσι ώστε να καλύπτουν όλη την έκταση της τομής.

Συγκεκριμένα, ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα για την πραγματοποίηση της μεθόδου: (1) ορισμός θετικών (πράσινη γραμμή) και αρνητικών πλευρών (κόκκινη γραμμή) για κάθε πλαίσιο, προκειμένου να καθοριστούν τα κενά ωοθυλάκια που θα καταμετρηθούν, εκείνα που εφάπτονται στις αρνητικές πλευρές δεν καταμετρούνται, (2) τοποθέτηση πλέγματος σημείων εμβαδού  $0.02\text{mm}^2$  επί της φωτογραφίας-μωσαϊκού, (3) καταμέτρηση του αριθμού των σταυρών που εφάπτονται επί των κενών ωοθυλακίων, (4) καταμέτρηση των σταυρών που δεν εφάπτονται επί καμίας ιστολογικής δομής (Εικ. 10).

Η χρήση της στερεολογικής μεθόδου στη συγκεκριμένη μελέτη είχε ως σκοπό την εκτίμηση της κατά όγκο πυκνότητας των κενών ωοθυλακίων κάθε αναπτυξιακού σταδίου ( $Nv_i$ ), εντός της εκάστοτε ωοθήκης, η οποία και υπολογίζεται από την εξίσωση των Weibel *et al.* (1966):

$$Nv_i = \frac{K}{\beta} \times \frac{Na_i^{\frac{3}{1}}}{V_i^{\frac{3}{1}}} \quad (1)$$

Όπου:

$N_a$  = αριθμός σταυρών που εφάπτονται σε **POF** στο κάθε πλαίσιο/μέγεθος πλαισίου ( $\text{cm}^2$ )

$N_i$  = συνολικός αριθμός σταυρών πάνω στα **POF** του κάθε πλαισίου/ (συνολικός αριθμός σταυρών του κάθε πλαισίου) –(σταυρούς που δεν εφάπτονται σε κανένα σημείο του ιστού)

Η παράμετρος  $\beta$  αντιστοιχεί στην αναλογία μεγέθους της μεγαλύτερης προς τη μικρότερη διάμετρο ενός υποδείγματος ωοκυττάρων (Weibel & Gomez 1962), ενώ το  $K$  υπολογίζεται μέσω την εξίσωσης του Williams (1977), και συγκεκριμένα, θεωρώντας την διάμετρο κάθε ωοκυττάρου ίση με το μέσο όρο της μεγαλύτερης και της μικρότερης «διαμέτρου» του:

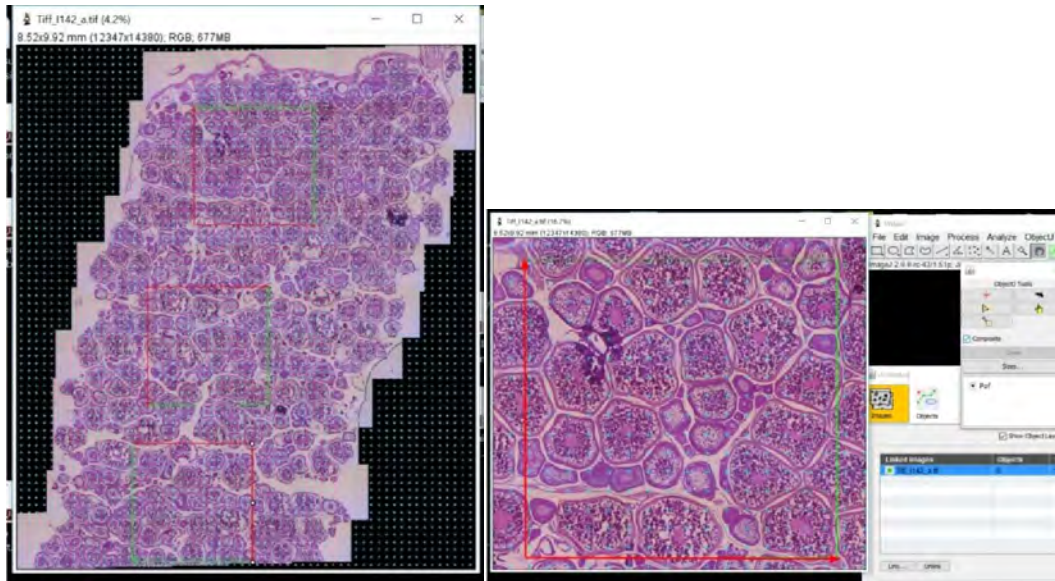
$$K = \left(\frac{M_3}{M_1}\right)^{\frac{3}{2}} \quad (2)$$

όπου:

$$M_1 = \left(\frac{D_1 + D_2 + D_n}{n}\right) \quad (3)$$

$$M_3 = \left(\frac{D_1^3 + D_2^3 + D_n^3}{n}\right)^{\frac{1}{3}} \quad (4)$$

Οι Emerson *et al.* (1990) θεωρούν ότι η τιμή του  $K$  μπορεί να εκτιμηθεί υπολογίζοντας τις διαμέτρους ( $D_i$ ) από ένα υπόδειγμα 50 ωοκυττάρων. Με βάση τα δείγματά μας οι παράμετροι  $\beta$  και  $K$  που χρησιμοποιήθηκαν υπολογίστηκαν μέσω των κενών ωοθυλακίων, για τη σαρδέλα  $\beta=1.25$  και  $K=1.41$  και για το σκουμπρί  $\beta=1.25$  και  $K=1.25$  (βλέπε Παράρτημα 3).



**Εικόνα 10:** Εφαρμογή της στερεολογικής μεθόδου βάση της μελέτης του Emerson *et al.* (1990).

### Εκτίμηση της σχετικής γονιμότητας ομάδας

Για τις περαιτέρω αναλύσεις εκτιμήθηκε η **γονιμότητα ομάδας** (*Batch fecundity, F<sub>b</sub>*) και στη συνέχεια η **σχετική γονιμότητα ομάδας** (*Relative batch fecundity, RF<sub>b</sub>*). Οι εκτιμήσεις γονιμότητας βασίστηκαν στις τιμές της πυκνότητας των κενών ωοθυλακίων (*N<sub>vi</sub>*) όπως αυτές προέκυψαν από τη στερεολογική μέθοδο. Βάση της εξίσωσης 5, η γονιμότητα ομάδας είναι ίση με το γινόμενο της κατά όγκο πυκνότητας των κενών ωοθυλακίων (*N<sub>vi</sub>*) επί του όγκου της ωοθήκης (*O<sub>v</sub>*):

$$F_i = N_{vi} \times O_v \quad (5)$$

Όπου:

$$O_v = \frac{W_g}{\rho} \quad (6)$$

Όπου: *W<sub>g</sub>* = βάρος της ωοθήκης, και *ρ* = πυκνότητα της ωοθήκης.

Η εκτίμηση τη πυκνότητας της ωοθήκης ( $\rho$ ) από τα δείγματά μας δεν ήτανε εφικτή λόγω της ελάχιστης ποσότητας δείγματος που οδηγούσε σε λανθασμένες εκτιμήσεις (βλέπε παράρτημα 4). Για το σκουμπρί δεν υπήρχε εκτίμηση της πυκνότητας των ωοθηκών του στη βιβλιογραφία, οπότε χρησιμοποιήθηκε και για τα δύο είδη η τιμή πυκνότητας ( $\rho$ ) όπως έχει υπολογιστεί για τη σαρδέλα βάση βιβλιογραφίας,  $\rho=1.026\text{g/ml}$  (Ganias *et al.* 2015b).

Η σχετική γονιμότητα ομάδας ( $RF_b$ ) υπολογίστηκε διαιρώντας τη γονιμότητα ομάδας ( $Fb$ ) με το βάρος σώματος ( $Wb$ ):

$$RF_b = Fb/Wb \quad (7)$$

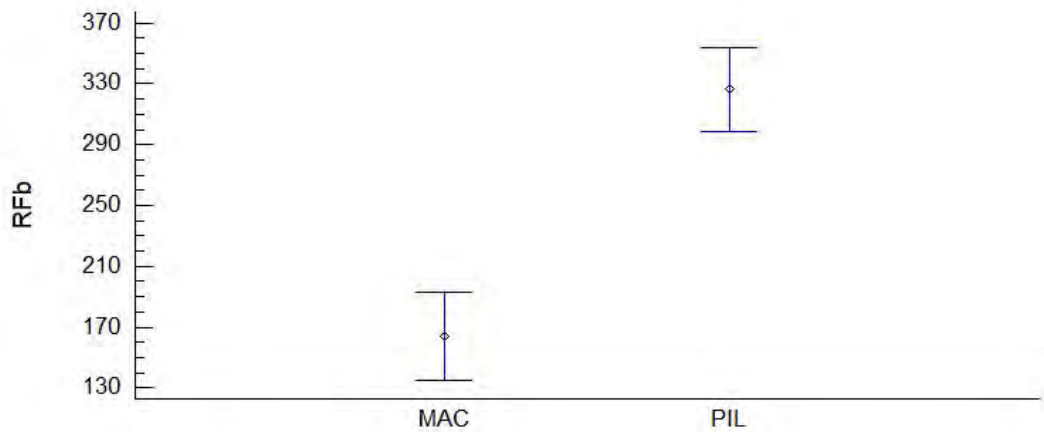
### Στατιστικές αναλύσεις

Για τις στατιστικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα *STATGRAPHICS Centurion XV, Version 15.2.11*. Οι αναλύσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η ανάλυση διακύμανσης ενός παράγοντα (one-way ANOVA) και ανάλυση απλής γραμμικής παλινδρόμησης (*Regression analysis*).

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### Σχέση μεγέθους κενών ωοθυλακίων και σταδίων ωοθήκης

Η μέση τιμή της σχετικής γονιμότητας βρέθηκε για τη σαρδέλα ίση με 322.684 (61.2214%) ενώ για το σκουμπρί 171.292 (61.2214%) (Σχ. 3).



**Σχήμα 3:** Μέση τιμή της σχετικής γονιμότητας ομάδας (*RFb*) των εξεταζόμενων ατόμων των *S. scombrus* (*MAC*) και *S. pilchardus* (*PIL*).

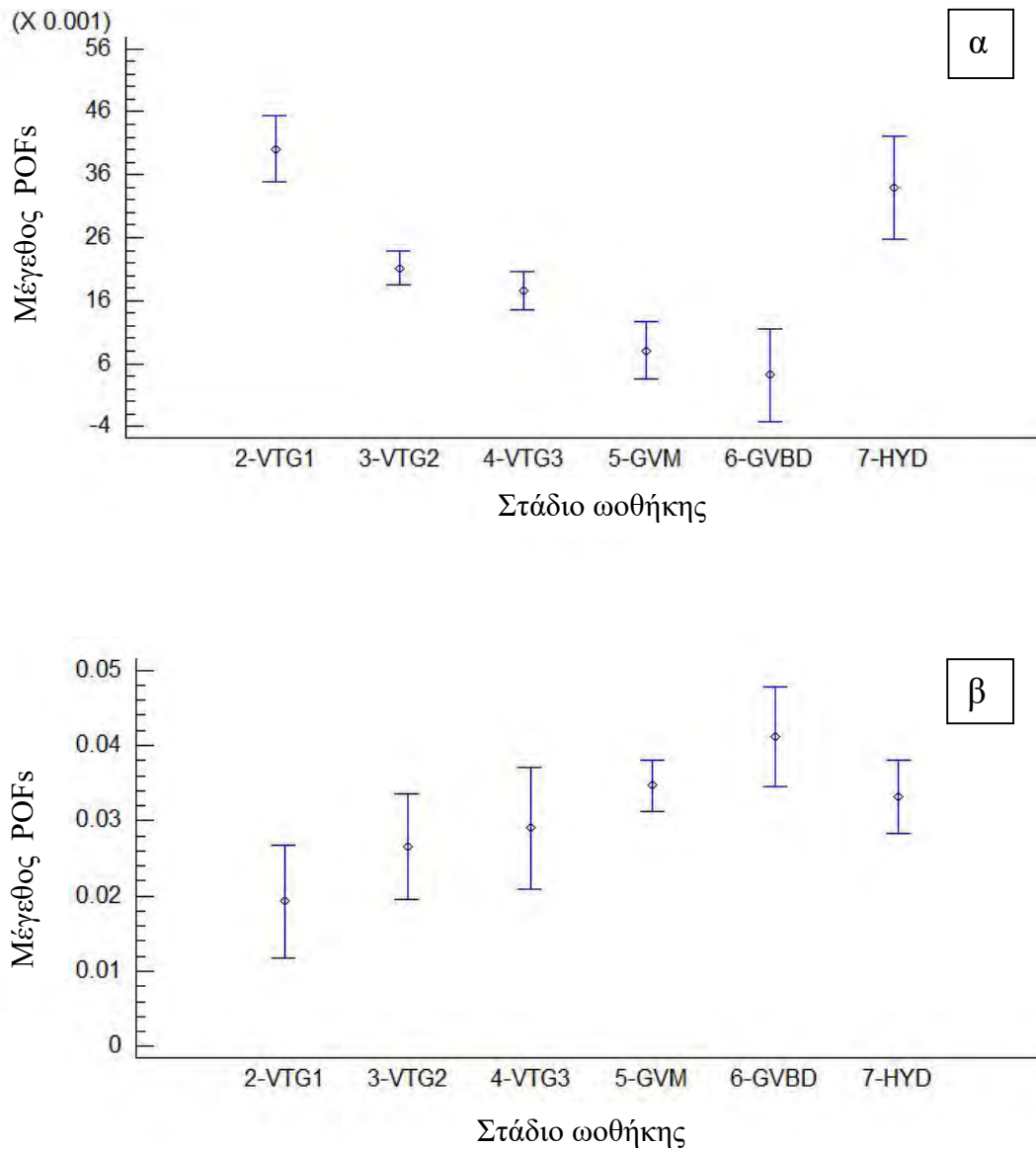
Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 4**, τα στάδια της ωοθήκης στα δύο είδη βρέθηκε να ακολουθούν διαφορετικό πρότυπο όσον αφορά το μέγεθος των κενών ωοθυλακίων που περιέχουν. Στη σαρδέλα φαίνεται ότι το μέγεθος των κενών ωοθυλακίων μειώνεται σταδιακά μέχρι το στάδιο ολοκλήρωσης της μετανάστευσης του πυρήνα (*GVBD*), ενώ παρουσιάζεται ξανά αυξημένο στο στάδιο ενυδάτωσης (*HYD*), τα στατιστικά αποτελέσματα αναγράφονται στον **Πίνακα 2**. Συνεπώς, η απορρόφηση των κενών

ωοθυλακίων ολοκληρώνεται αρκετά πριν ολοκληρωθεί ο κύκλος της ωοτοκίας και η ωοθήκη μπει στη φάση μίας νέας ωοτοκίας και ως συνέπεια στην εμφάνιση νέων κενών ωοθυλακίων (Σχ. 4α).

Αντίθετα, στο σκουμπρί από το στάδιο μετανάστευσης των πυρήνων (*GVM*) μέχρι και το στάδιο ενυδάτωσης (*HYD*) παρουσιάζεται αυξημένο μέγεθος κενών ωοθυλακίων κάτι που υποδηλώνει ότι νέα κενά ωοθυλάκια (μεγάλο μέγεθος) εμφανίζονται προτού προλάβουν να απορροφηθούν εκείνα της προηγούμενης ωοτοκίας (Πιν. 2 και Σχ. 4β). Αυτό αποκαλύπτει την συνύπαρξη περισσότερων από μία ημερήσιας κοόρτης κενών ωοθυλακίων σε αυτά τα στάδια της ωοθήκης στο σκουμπρί (Εικ. 11).

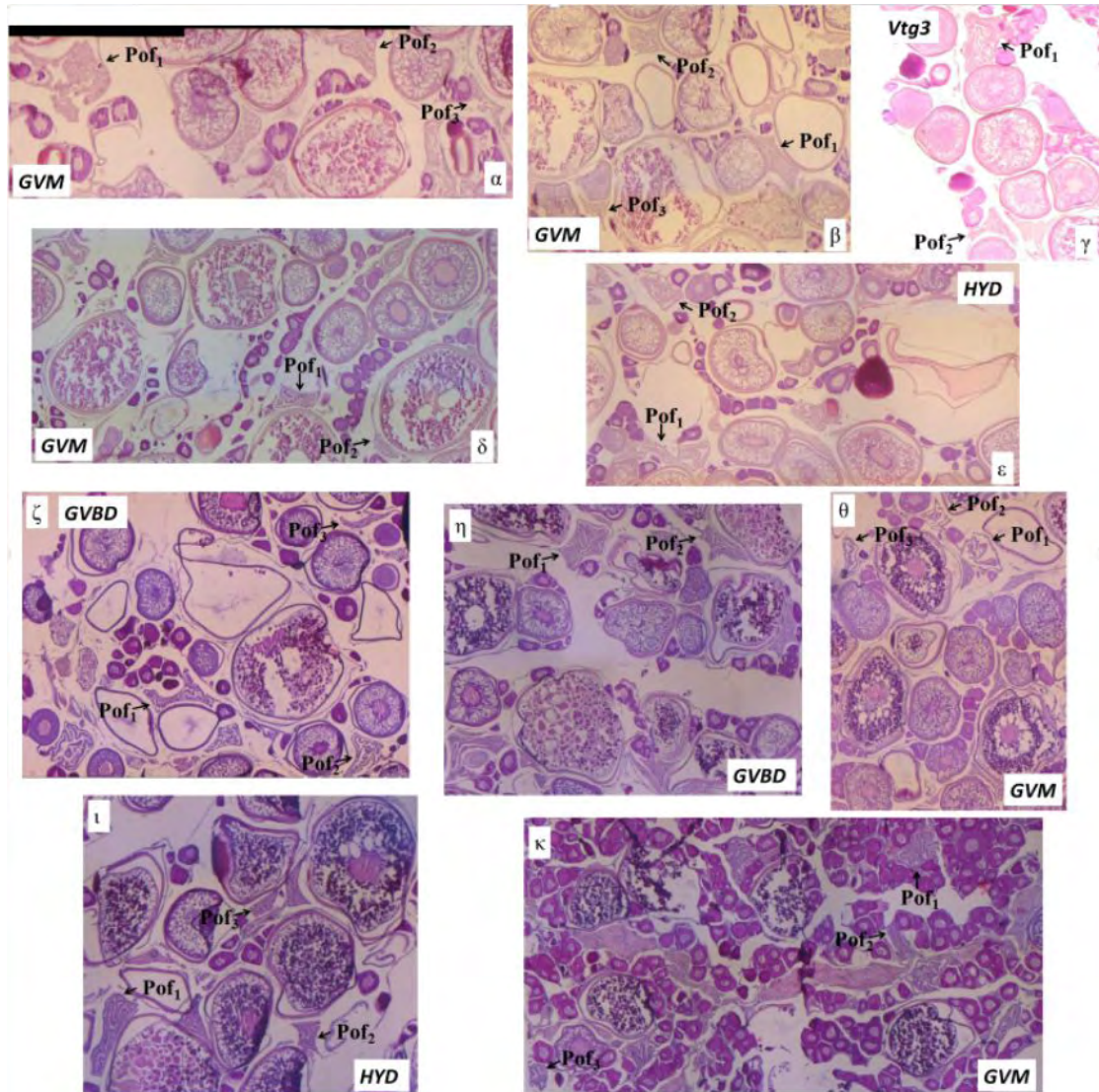
**Πίνακας 2.** Στατιστικά αποτελέσματα μεγέθους κενών ωοθυλακίων ανά στάδιο ωοθήκης στη σαρδέλα και στο σκουμπρί.

Είδος	Στάδιο ωοθήκης	Μέση τιμή μεγέθους <i>POFs</i>	Συντελεστής διακύμανσης
Σαρδέλα	VTG1	0.0401	36.7721%
	VTG2	0.0211944	53.8765%
	VTG3	0.0176129	73.4838%
	GVM	0.00807692	75.8953%
	GVBD	0.0042	54.2941%
	HYD	0.034	48.3285%
Σκουμπρί	VTG1	0.0192857	54.5238%
	VTG2	0.0265	48.5355%
	VTG3	0.0296	74.8827%
	GVM	0.0346471	40.2252%
	GVBD	0.0411111	37.3369%
	HYD	0.0331765	39.0135%



**Σχήμα 4:** Σχέση μεταξύ μεγέθους κενών ωοθυλακίων και σταδίων ωοθήκης στα είδη α) *S. pilchardus* και β) *S. scombrus*.





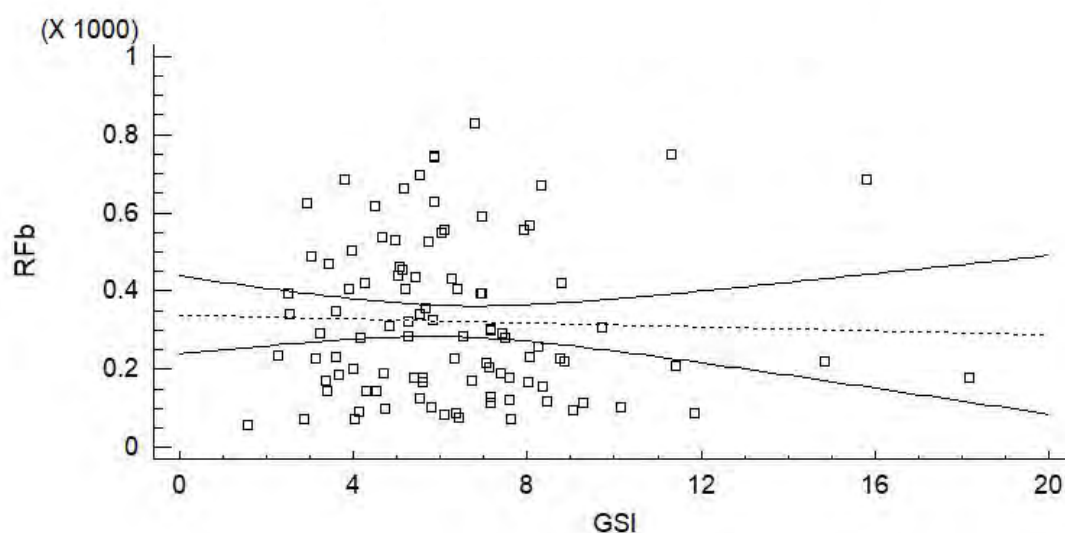
**Εικόνα 11:** *Scomber scombrus*. Διαφορετικά μεγέθη κενών ωοθυλακίων στην ωοθήκη κάθε ατόμου, απόδειξη ύπαρξης περισσότερων από μία ημερήσιας κοόρτης κενών ωοθυλακίων σε μία ωοθήκη. Ενδεικτικά ωοθήκες 10 διαφορετικών ατόμων (α-κ). **α)** Εμβαδόν κενών ωοθυλακίων,  $Pof_1=0.048\text{mm}^2$ ,  $Pof_2=0.015\text{mm}^2$ ,  $Pof_3=0.006\text{mm}^2$ , στάδιο ωοθήκης *GVM*, **β)** Εμβαδόν κενών ωοθυλακίων,  $Pof_1=0.024\text{mm}^2$ ,  $Pof_2=0.017\text{mm}^2$ ,  $Pof_3=0.010\text{mm}^2$ , στάδιο ωοθήκης *GVM*, **γ)** Εμβαδόν κενών ωοθυλακίων,  $Pof_1=0.062\text{mm}^2$ ,  $Pof_2=0.021\text{mm}^2$ , στάδιο ωοθήκης *Vtg3*, **δ)**  $Pof_1=0.020\text{mm}^2$ ,  $Pof_2=0.007\text{mm}^2$ , στάδιο ωοθήκης *GVM*, **ε)**  $Pof_1=0.054\text{mm}^2$ ,  $Pof_2=0.031\text{mm}^2$ , στάδιο ωοθήκης *HYD*, **ζ)**  $Pof_1=0.044\text{mm}^2$ ,  $Pof_2=0.026\text{mm}^2$ ,  $Pof_3=0.011\text{mm}^2$ , στάδιο ωοθήκης *GVBD*, **η)**  $Pof_1=0.043\text{mm}^2$ ,  $Pof_2=0.023\text{mm}^2$ , στάδιο ωοθήκης *GVBD*, **θ)**  $Pof_1=0.039\text{mm}^2$ ,  $Pof_2=0.011\text{mm}^2$ ,  $Pof_3=0.015\text{mm}^2$ , στάδιο ωοθήκης *GVM*, **ι)**  $Pof_1=0.027\text{mm}^2$ ,  $Pof_2=0.010\text{mm}^2$ ,  $Pof_3=0.006\text{mm}^2$ , στάδιο ωοθήκης *HYD*, **κ)**  $Pof_1=0.031\text{mm}^2$ ,  $Pof_2=0.016\text{mm}^2$ ,  $Pof_3=0.010\text{mm}^2$ , στάδιο ωοθήκης *GVM*.



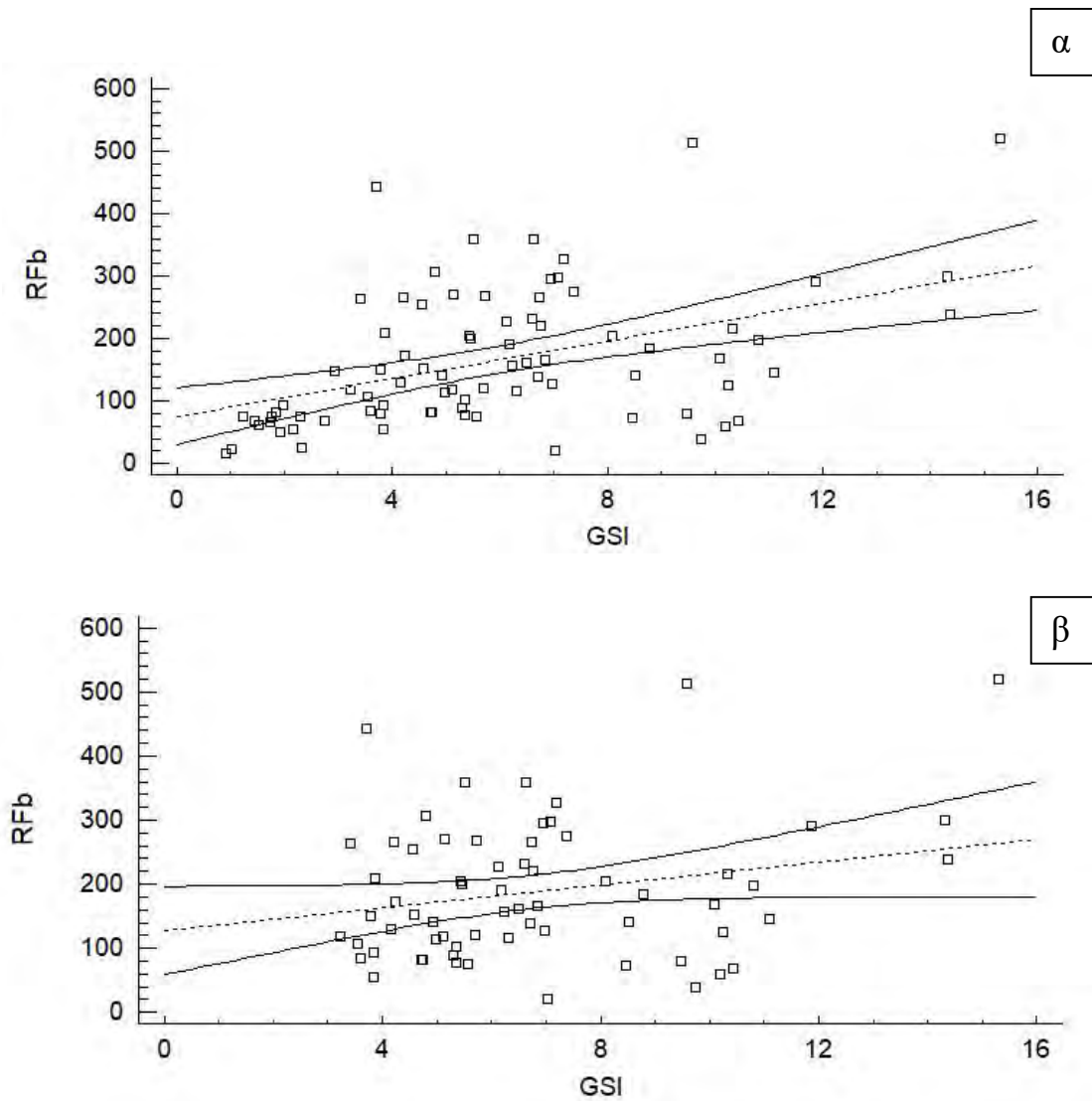
### Σχέση σχετικής γονιμότητας ομάδας και γοναδοσωματικού δείκτη

Η σχετική γονιμότητα ομάδας (*RFb*) φαίνεται να μην σχετίζεται με το γοναδοσωματικό δείκτη (*GSI*) ( $p>0.05$ ,  $R^2=0.12\%$ ) στη σαρδέλα (Σχ. 5).

Όσον αφορά το σκουμπρί, η σχετική γονιμότητα ομάδας (*RFb*) φαίνεται να αυξάνεται στατιστικά σημαντικά όσο αυξάνεται και ο γοναδοσωματικός δείκτης (*GSI*) ( $p<0.001$ ,  $R^2=19.7\%$ ) (Σχ. 6α). Παρόλα αυτά όμως, όταν δεν λαμβάνονται υπόψη τα άτομα με γοναδοσωματικό δείκτη μικρότερο από 3, η σχετική γονιμότητα ομάδας (*RFb*) δεν επηρεάζεται ( $p>0.05$ ,  $R^2=5.45\%$ ) (Σχ. 6β). Τα άτομα αυτά φαίνεται να επηρεάζουν την παραπάνω σχέση, καθώς έχουν αρκετά μειωμένο βάρος ωοθήκης σε σύγκριση με τα υπόλοιπα.



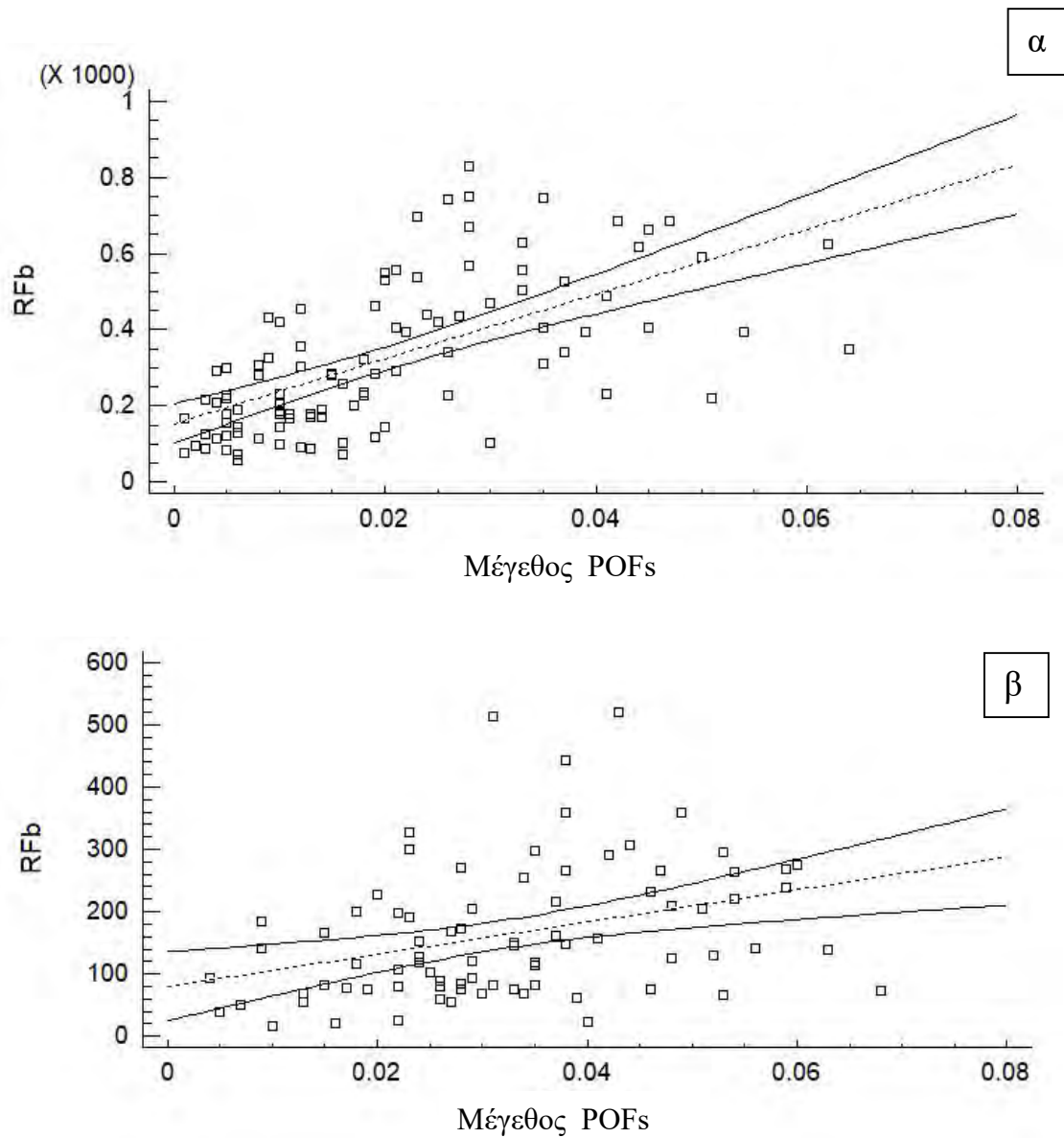
**Σχήμα 5:** *Sardina pilchardus*. Σχέση μεταξύ σχετικής γονιμότητας ομάδας (*RFb*) και γοναδοσωματικού δείκτη (*GSI*).



**Σχήμα 6:** *Scomber scombrus*. Σχέση μεταξύ σχετικής γονιμότητας ομάδας (*RFb*) και γοναδοσωματικού δείκτη (*GSI*). α) Συμπεριλαμβάνονται στο διάγραμμα όλα τα εξεταζόμενα άτομα, β) Συμπεριλαμβάνονται τα άτομα με γοναδοσωματικό δείκτη μεγαλύτερο από 3.

### Σχέση σχετικής γονιμότητας ομάδας και μεγέθους κενών ωοθυλακίων

Όπως δείχνεται στο **Σχήμα 7α** για τη σαρδέλα η σχετική γονιμότητα ομάδας αυξάνεται στατιστικά σημαντικά με την αύξηση του μεγέθους των κενών ωοθυλακίων, με ισχυρή σχέση ( $p < 0.001$ ,  $R^2 = 39.7\%$ ). Το αντίστοιχο συμβαίνει για το σκουμπρί αλλά η σχέση είναι ασθενέστερη ( $p < 0.01$ ,  $R^2 = 12.2\%$ ) (**Σχ. 7β**).



**Σχήμα 7:** Σχέση μεταξύ σχετικής γονιμότητας ομάδας ( $RFb$ ) και μεγέθους κενών ωοθυλακίων στα εξεταζόμενα άτομα των ειδών α) *S. pilchardus* και β) *S. scombrus*.

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η δυναμική της αναπαραγωγής στη σαρδέλα του Ατλαντικού έχει μελετηθεί αρκετά και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε στη συγκεκριμένη εργασία ως ένα είδος αναφοράς έτσι ώστε να επιβεβαιωθεί η σωστή εφαρμογή της μεθόδου της στερεολογίας. Η μέση τιμή **σχετικής γονιμότητας ομάδας** του είδους, που βρέθηκε ίση με 322.684 (61.2214%) ωοκύτταρα/g, επιβεβαιώνει τη σωστή εφαρμογή της μεθόδου καθώς είναι αρκετά κοντά με τις τιμές 360 ωοκύτταρα/g (Δεκέμβριο 2000) και 339 ωοκύτταρα/g (Φεβρουάριος 2001) που βρέθηκαν στη μελέτη Ganias *et al.* (2003) όπως επίσης και σε εκείνες που αναφέρονται στον **Πίνακα 3**. Στο σκουμπρί του Ατλαντικού, η μέση τιμή **σχετικής γονιμότητας ομάδας** εκτιμήθηκε να είναι 171.292 (61.2214%) ωοκύτταρα/g, περίπου τριπλάσια από εκτιμήσεις που έγιναν σε άλλες εργασίες, όπου κυμαινόταν από 55 έως 41 ωοκύτταρα/g (Priede & Watson 1993) (**Πιν. 4**). Εφόσον επιβεβαιώθηκε η σωστή εφαρμογή της μεθόδου, η προηγούμενη απόκλιση επιβεβαιώνει την αρχική υπόθεση της μελέτης μας για την συνύπαρξη περισσότερων από μία ημερήσιων κοόρτων κενών ωοθυλακίων στις ωοθήκες ατόμων του *S. scombrus*. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από το διαφορετικό πρότυπο εμφάνισης των κενών ωοθυλακίων στις ωοθήκες των δύο ειδών. Συγκεκριμένα, τα άτομα της σαρδέλας περιέχουν στις ωοθήκες τους μία ημερήσια κοόρτη κενών ωοθυλακίων (Ganias *et al.* 2007), ενώ όπως παρατηρείται στο **Σχήμα 4** και **Εικόνα 11** στα άτομα του σκουμπριού που είναι σε αναπαραγωγική φάση δείχνεται η συνύπαρξη τουλάχιστον δύο ίσως και τριών ημερήσιων κοόρτων κενών ωοθυλακίων. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες όπως αναφέρονται στον **Πίνακα 3** και **Πίνακα 4** βρέθηκε το **μεσοδιάστημα ωοτοκίας (D)** να είναι μεγαλύτερο για τη σαρδέλα συγκριτικά με το σκουμπρί. Στον **Πίνακα 3** οι αποκλίσεις μεταξύ των διαφορετικών περιοχών οφείλονται στη διαφορετική ηλικιακή

κατανομή (Quintanilla & Perez 2000). Ενώ στον **Πίνακα 4**, η ωοτοκία στο σκουμπρί αρχίζει από τα ανατολικά με την απελευθέρωση κατά μέσω όρο μίας ομάδας ωοκυττάρων ανά 1.6 ημέρες (Priede & Watson 1993). Φαίνεται λοιπόν, στη σαρδέλα να προλαβαίνει να επέλθει η απορρόφηση των κενών ωοθυλάκιων πριν την ωρίμανση της επόμενης ομάδας ωοκυττάρων και κατά συνέπεια την εμφάνιση και των νέων κενών ωοθυλακίων. Αντίθετα, στο σκουμπρί είναι σαφές ότι δεν προλαβαίνουν να απορροφηθούν τα κενά ωοθυλάκια της προηγούμενης ωοτοκίας πριν την έναρξη της επόμενης καθώς αυτό το διάστημα φαίνεται να είναι μικρότερο. Αυτό είναι λογικό καθώς, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως στη σαρδέλα μεσολαβούν περίπου 11 ημέρες ανά ωοτοκία ενώ στο σκουμπρί 1-2 ημέρες.

Για την εκτίμηση της **σχετικής γονιμότητας ομάδας** λήφθηκαν υπόψη τόσο το βάρος της ωοθήκης και το βάρος των ατόμων (γοναδοσωματικός δείκτης, **GSI**), όσο και η πυκνότητα των κενών ωοθυλακίων ( $Nv_i$ ).

Η **σχετική γονιμότητα ομάδας** φαίνεται να μην επηρεάζεται από το γοναδοσωματικό δείκτη. Για τη σαρδέλα επιβεβαιώνεται από τη μελέτη των Ganias *et al.* (2004) (**Σχ. 5**). Για το σκουμπρί βρέθηκε να μην επηρεάζεται όταν εξαιρέθηκαν τα άτομα με γοναδοσωματικό δείκτη κάτω από 3 (**Σχ. 6**). Τα άτομα αυτά ήταν ελάχιστα και παρατηρήθηκε ότι είχαν σημαντικά μικρότερο βάρος ωοθήκης σε σύγκριση με τα υπόλοιπα του είδους. Σύμφωνα με τη μελέτη Jons & Miranda (1997), η γονιμότητα και το μέγεθος των ωοκυττάρων (βάρος) είναι οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν το βάρος της ωοθήκης. Στην προκειμένη περίπτωση κάποια από τα άτομα αυτά ήταν σε φάση ωοτοκίας και το μέγεθος των ωοκυττάρων τους ήταν αρκετά μεγάλο έτσι ώστε δεν δικαιολογούσε το μικρό καταγεγραμμένο βάρος της ωοθήκης τους. Είναι πιθανόν να είναι άτομα προς το τέλος της αναπαραγωγικής περιόδου κατά το οποίο η ωοθήκη

σχεδόν «αδειάζει» από ωοκύτταρα με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν πολύ μικρές τιμές ολικής γονιμότητας (και κατ' επέκταση χαμηλό *GSI*). Συνεπώς, οι μετρήσεις αυτές αποφασίστηκε να μείνουν εκτός των εκτιμήσεων.

Εφόσον αποκλείστηκε το ενδεχόμενο το βάρος της ωοθήκης (μέσω του *GSI*) να επηρεάζει τις εκτιμήσεις της σχετικής γονιμότητας ομάδας στην παρούσα μελέτη, ο μοναδικός άλλος παράγοντας που θα μπορούσε να επηρεάσει τις εκτιμήσεις αυτές είναι η πυκνότητα των κενών ωοθυλακίων. Η πυκνότητα εξαρτάται από τον αριθμό και τον όγκο των κενών ωοθυλακίων, άρα από το μέγεθός τους. Στη σαρδέλα επειδή υπάρχει μόνο μία ημερήσια κοόρτη κενών ωοθυλακίων στην καταμέτρησή τους λαμβάνεται υπόψη όλο το εύρος των μεγεθών *POF*. Ως αποτέλεσμα, η μέση τιμή της **σχετικής γονιμότητας ομάδας** μέσω της στερεολογικής ανάλυσης *POF* βρέθηκε πολύ κοντά στη μέση καταγεγραμμένη τιμή άλλων μελετών (**Πιν. 3**), παρόλα τα σφάλματα υποεκτίμησης και υπερεκτίμησης της **σχετικής γονιμότητας ομάδας** εξαιτίας του μικρού ή μεγάλου μεγέθους των *POF* αντίστοιχα (Ganias 2012). Αυτή η υπερεκτίμηση και υποεκτίμηση δείχνεται και στο **Σχήμα 7α** όπου η σχετική γονιμότητα ομάδας αυξάνεται στατιστικά σημαντικά με την αύξηση του μεγέθους των κενών ωοθυλακίων, με ισχυρή σχέση ( $p < 0.001$ ,  $R^2 = 39.7\%$ ).

Όπως δείχνεται στο **Σχήμα 7β** για το σκουμπρί, η σχετική γονιμότητα ομάδας αυξάνεται στατιστικά σημαντικά με την αύξηση του μεγέθους των κενών ωοθυλακίων, αλλά η σχέση είναι ασθενέστερη από ότι στη σαρδέλα ( $p < 0.01$ ,  $R^2 = 12.2\%$ ). Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του μικρού καταγεγραμμένου εύρους των μεγεθών των κενών ωοθυλακίων λόγω της συνύπαρξης διαφορετικών ημερησίων σειρών στην ωοθήκη. Επιπλέον, η ύπαρξη περισσότερων από μία ημερησίων κοόρτων κενών ωοθυλακίων έχει ως συνέπεια την υπερεκτίμηση της μέσης τιμής της **σχετικής γονιμότητας ομάδας**

τρεις φορές περισσότερο από τις έως τώρα καταγεγραμμένες τιμές. Το αποτέλεσμα αυτό δείχνει ότι η μέθοδος *POF* δεν μπορεί να εφαρμοστεί στο σκουμπρί του Ατλαντικού σε εκτίμηση της συχνότητας ωτοκίας ως πληθυσμιακής παραμέτρου. Αντίθετα, σε αυτήν την περίπτωση, η εκτίμηση της συχνότητας ωτοκίας ως ατομικής παραμέτρου μέσω του μεσοδιαστήματος ωτοκίας θα ήταν κατάλληλη. Φαίνεται λοιπόν, ότι υπάρχει πρόβλημα κατά την εφαρμογή της μεθόδου *DEPM* και είναι αναγκαία η βελτίωση της (Ganias 2012).

Σκοπός της συγκεκριμένης μελέτης όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως δεν ήταν ο υπολογισμός της γονιμότητας ομάδας, παρόλο που η στερεολογική ανάλυση των *POF* έδωσε ακριβείς εκτιμήσεις της γονιμότητας ομάδας για τη σαρδέλα του Ατλαντικού. Αντίθετα, οι εκτιμήσεις της γονιμότητας χρησιμοποιήθηκαν για να καταλήξουμε στο ότι η μέθοδος των *POF* δεν μπορεί να λειτουργήσει σωστά στο σκουμπρί λόγω των περισσότερων από μία ημερησίων κοόρτων κενών ωοθυλακίων. Περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη τόσο στο συγκεκριμένο είδος, όσο και σε άλλα είδη έτσι ώστε να εξασφαλιστεί ο σωστός τρόπος εφαρμογής των μεθόδων για την περαιτέρω ορθή διαχείριση των αποθεμάτων τους.

**Πίνακας 3.** Συγκεντρωτικός πίνακας παραμέτρων σχετική γονιμότητα ομάδας ( $RF_b$ ), κλάσμα ωοτοκίας ( $S$ ) (υπολογίστηκε με  $DEPM$ ) και μεσοδιάστημα ωοτοκίας ( $D=1/S$ ) για είδη/ υποείδη της σαρδέλας από διάφορες περιοχές και έτη (Somarakis *et al.* 2006).

	Είδη/Υποείδη	Έτος	Περιοχή	Σχετική Γονιμότητα ομάδας ( $RF_b$ )	Κλάσμα ωοτοκίας ( $S$ )	μέσο διάστημα ωοτοκίας ( $D=1/S$ )
Ιβηρική σαρδέλα*	<i>Sardina pilchardus pilchardus</i>	1988	Πορτογαλία	351.35	0.14	7.14
			Γαλικία	420.65	0.08	12.5
			Δυτική Κανταβρία	426.23	0.13	7.69
			Ανατολική Κανταβρία	392.82	0.21	4.7
		1990	Γαλικία	395.01	0.10	10
	Δυτική Κανταβρία	394.27	0.11	9		
	Ανατολική Κανταβρία	394.74	0.20	5		
	1997	Πορτογαλία	372.59	0.03	33.3	
	Ανατολική Κανταβρία	379.46	0.18	5.5		
	1999	Πορτογαλία	414.41	0.10	10	
	Ανατολική Κανταβρία	328.81	0.14	7.14		
	2002	Πορτογαλία	322.80	0.03	33.3	
	Γαλικία	349.11	0.24	4.16		
	Δυτική Κανταβρία	352.42	0.08	12.5		
	Ανατολική Κανταβρία	346.20	0.13	7.7		
Μεσογειακή ή σαρδέλα**	<i>Sardina pilchardus sardina</i>	1994	Δυτικοανατολική Ανδριατική	437.50	0.13	7.7

\*Cunha *et al.* (1992), Garcia *et al.* (1992), Lago de Lanzos *et al.* (1998), ICES (2003).

\*\*Casavola *et al.* (1998).

**Πίνακας 4.** Γονιμότητα ομάδας ( $F$ ), Κλάσμα ωοτοκίας ( $S$ ) και μεσοδιάστημα ωοτοκίας ( $D=1/S$ ) του δυτικού αποθέματος *S. scombrus* (Priede & Watson 1993).

Περιοχή	Γονιμότητα ομάδας ( $F$ )	Κλάσμα ωοτοκίας ( $S$ )	Μέσο διάστημα ωοτοκίας ( $D=1/S$ )
Βόρεια	41.33 (5.52)	0.1820 (0.0523)	5.5
Κεντρικά	45.72 (3.41)	0.3348 (0.0787)	2.9
Ανατολικά	55.49 (2.04)	0.6205 (0.0545)	1.6



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andreu B., Pinto S. (1957) Características histológicas y biométricas del ovario de sardina (*Sardina pilchardus*) en maduration, puesta y recuperacion. Origen del los ovocitos. Invest. Pes. VI, 3–38
- Armstrong M.J., Witthames P.R. (2012). Developments in understanding of fecundity of fish stocks in relation to egg production methods for estimating spawning stock biomass. Fisheries Research, 117–118: 35–47
- Balon E.K. (1985) Early Life Histories of Fishes: New Developmental Ecological and Evolutionary Perspectives. Junk, Dordrecht, 280
- Bartsch J., Coombs S.H. (2004) An individual-based model of the early life history of mackerel (*Scomber scombrus*) in the eastern North Atlantic, simulating transport, growth and mortality. Fish Oceanography, 13 (6): 365-379
- Bernal M., Somarakis S., Witthames P.R., Damme C.J.G.v., Uriarte A., Lo N.C.H., Dickey-Collas M. (2012) Egg production methods in marine fisheries: an introduction. Fisheries Research, 117–118: 1–5
- Brown-Peterson N.J., Wyanski D.M., Saborido-Rey F., Macewicz B.J., Lowerre-Barbieri S.K. (2011) A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. Marine and Coastal Fisheries, 3: 52–70
- Casavola N., Rizzi E., Marano G. (1998) Daily egg production method for spawning biomass estimates of sardine in the south-western Adriatic Sea. Rapp. Comm. int. Mer Medit., 35:396–397
- Claramunt G., Herrera G. (1994a). A new method to estimate the fraction of daily spawning females and the numbers of spawning in *Sardinops sagax* in northern Chile. Scientia Marina, 58 (3): 169–177.
- Claramunt G., Herrera G., Pizarro P., (1994b) Potential annual production of eggs according to sizes of *Sardinops sagax* in northern Chile. Revista Biología Marina 29, 147–166.
- Collette B.B., Carpenter K.E., Polidoro B.A., Juan-Jorda M.J., Boustany A., Die D.J., Elfes C., Fox W., Graves J., Harrison L., McManus R., Minte-Vera C., Nelson R., Restrepo V., Schratwieser J., Sun C-L, Brick Peres M., Canales C., Cardenas G., Chang S.-K., Chiang W-C, de Oliveira Leite N., Harwell H., Lessa R., Fredou F.L., Oxenford H.A., Serra R., Shao K.-T., Sumalia R., Wang S-P, Watson R. and Yanez E. (2011) High value and long life: Double jeopardy for tunas and billfishes. Science, 333: 291-292

- Conseil General des Peches pour la Mediterranee (1982) Rapport de la premiere Consultation Technique sur l'Evaluation des Stocks dans la Mediterranee Centrale. FAO Rapp. Peches. FAO, Rome.
- Cunha E.M., Figueiredo I., Farinha A., Santos M. (1992) Estimation of sardine spawning biomass off Portugal by the daily egg production method. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 8:139–153
- Delesse M.A. (1847). *Procedemecanique pour determiner la composition des roches*. ComptesRendus de l'Academie des Sciences, Paris, 25: 544.
- Emerson L.S., Greer Walker M., Witthames P.R. (1990). A stereological method for estimating fish fecundity. *Journal of Fish Biology*, 36:721–730.
- Figueiredo I., Santos A. (1989) Reproductive biology of *Sardina pilchardus* (Walb.): seasonal maturity evolution (1986 to 1988). ICES.
- Fives J.M., Acevedo S., Lloves M., Whitaker A., Robinson M., King P.A. (2001) The distribution and abundance of larval mackerel, *Scomber scombrus* (L.), horse mackerel, *Trachurus trachurus* (L.), hake, *Merluccius merluccius* (L.), and blue whiting, *Micromesistius poutassou* (Risso, 1826) in the Celtic Sea and west of Ireland during the years 1986, 1989 and 1992. *Fisheries Research*, 50: 17–26
- Ganias K., Murua H., Claramunt G., Dominguez-Petit R., Gonçalves P., Juanes F., Keneddy J., Klibansky N., Korta M., Kurita Y., Lowerre-Barbieri S., Macchi G., Matsuyama M., Medina A., Nunes C., Plaza G., Rideout R., Somarakis S., Thorsen A., Uriarte A., Yoneda M. (2015a). Egg Production (Chapter 4) In: Domínguez-Petit, R., Murua, H., Saborido-Rey, F. Trippel, E. (ed.). *Handbook of Applied Fisheries Reproductive Biology for Stock Assessment and Management*, p 1-109
- Ganias K., Rakka M., Mantzouki E., Vavalidis T., Tsinganis M., Nunes C. (2015b). Maternal versus environmental constraints on the oocyte size of a marine pelagophil fish. *Marine Biology*, 162:1879-1888
- Ganias K. (2013) Determining the indeterminate: Evolving concepts and methods on the assessment of the fecundity pattern of fishes. *Fisheries Research*, 138: 23-30
- Ganias K. (2012) Thirty years of using the postovulatory follicles method: Overview, problems and alternatives. *Fisheries Research*, 117-118: 63-74
- Ganias K., Somarakis S., Koutsikopoulos C., Machias A. (2007) Factors affecting the spawning period of sardine in two highly oligotrophic seas. *Marine Biology*, 151:1559–1569
- Ganias K., Somarakis S., Machias A., Theodorou A. (2004) Pattern of oocyte development and batch fecundity in the Mediterranean sardine *Fisheries Research*, 67:13–23

- Ganias K. (2003). Oceanographic and biological investigation of ichthyoplanktonic production of sardine, *Sardina pilchardus* (Walbaum, 1792), in the seas of coastal central Greece. Ph.D. Thesis. University of Thessaly, Volos, Greece (in Greek with English abstract).
- Ganias K., Somarakis S., Machias A., Theodorou A. (2003) Evaluation of spawning frequency in a Mediterranean sardine population. *Marine Biology*, 142:1169–1179.
- Garcia A., Perez N., Lo C.H.N., Lago de Lanzos A., Sola A. (1992) The Egg Production Method applied to the spawning biomass estimation of sardine, *Sardina pilchardus* (Walb.) on the North Atlantic Spanish coast. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 8:123–138
- Goncalves P., Costa A.M., Murta A.G. (2009) Estimates of batch fecundity and spawning fraction for the southern stock of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in ICES Division IXa. *ICES Journal of Marine Science*, 66:617-622
- Greer-Walker M., Witthames P.R., Bautista De Los Santos J.I. (1994) Is the fecundity of the Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*: scombridae) determinate? *Sarsia*, 79:13–26
- Gregoire F. (1993) Estimate of the spawning stock of mackerel (*Scomber scombrus* L.) in the Gulf of St. Lawrence and the monitoring of catches for NAFO subareas 2-6 in 1992. DFO Atlantic Fisheries Research Document 93/54.
- Hunter J.R., Macewicz B.J., Lo N.C.H., Kimbrell C.A. (1992) Fecundity, spawning, and maturity of female Dover sole, *Microstomus pacificus*, with an evaluation of assumptions and precision. *Fishery Bulletin*, 90: 101-128
- Hunter J. R., Macewicz B. J., Kimbrell C. A. (1989) Fecundity and other aspects of the reproduction of sablefish, *Anaplopoma fimbria*, in Central California waters. *California Cooperative Oceanic Fisheries Investigations Reports*, 30: 61-72
- Hunter J.R., Macewicz B.J. (1985) Measurement of spawning frequency in multiple spawning fishes. In: Lasker, R. (eds) *An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, *Engraulis mordax**. P 79–93, NOAA Technical Report NMFS 36
- Hunter J.R., Goldberg S.R. (1980) Spawning incidence and batch fecundity in northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fishery Bulletin*, 77: 641–652
- Hunter J.R., Macewicz B.J. (1980) Sexual maturity, batch fecundity, spawning frequency, and temporal pattern of spawning for the northern anchovy, *Engraulis mordax*, during the 1979 spawning season. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.*, 21:139–149

- ICES (2016) WGMEGS Manual for the AEPM and DEPM estimation of fecundity in mackerel and horse mackerel. WGMEGS–AEPM & DEPM. Series of ICES Survey Protocols, 5: 84
- ICES (2003) Report of the Study Group on the estimation of spawning stock biomass of sardine and anchovy. ICES C.M. 2003/G:17, 107 pp.
- Isaac-Nahum J.V., Cardoso D.R., Servo G. (1988) Aspects of the spawning biology of the Brazilian sardine *Sardinella brasiliensis* (Steedachner, 1879) (Clupeidae). Journal of Fish Biology, 32:383–396
- IUCN (2015) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015-4. Available at: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). (Accessed: 19 November 2015)
- IUCN (2011) IUCN Red List of Threatened Species (ver. 2011.2). Available at: <http://www.iucnredlist.org>. (Accessed: 10 November 2011)
- Jansen T., Gislason H. (2013) Population Structure of Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*). PLoS ONE, 8 (5), e64744
- Jons G.D., Miranda L.E. (1997) Ovarian weight as an index of fecundity, maturity, and spawning periodicity. Journal of Fish Biology, 50:150-156
- Kjesbu O.S., Fonn M., Gonzáles B.D., Nilsen T. (2010) Stereological calibration of the profile method to quickly estimate atresia levels in fish. Fisheries Research, 104:8–18
- Kraus G., Hinrichsen H-H., Voss R., Teschner E., Tomkiewicz J., Köster F.W. (2012) Robustness of egg production methods as a fishery independent alternative to assess the Eastern Baltic cod stock (*Gadus morhua callarias* L.). Fisheries Research, 117–118: 75–85
- Lago de Lanzos A., Quintanilla L., Franco C. (1998) The daily egg production method applied to the spawning biomass estimation of sardine *Sardina pilchardus* off the North Atlantic Spanish coast. ICES C.M. 1998/BB:17, 20 pp.
- LaPlante L.H., Schultz E.T. (2007) Annual fecundity of tautog in long island sound: Size effects and long-term changes in a harvested population. Transactions of the American Fisheries Society, 136:1520–1533
- Le Clus F. (1979) Oocyte development and spawning frequency in the south west African pilchard *Sardinops ocellata*. Fish. Bull. S. Afr., 12:53–68
- Lockwood S.J. (1978) Mackerel: A problem in fish stock assessment. Laboratory Leaflet. MAFF. 44. 18

- Lowerre-Barbieri S.K., Ganas K., Murua H., Saborido-Rey F., Hunter J.R. (2011) Reproductive timing in marine fishes: variability, temporal scales and methods. *Marine Coastal Fish*, 3: 71-91.
- Macer C.T. (1974) The reproductive biology of the horse mackerel *Trachurus trachurus* (L) in the North Sea and English Channel. *Journal of Fish Biology*, 6(4):415-438
- Macewicz B., Castro González J.J., Coto Altamirano C.E., Hunter J.R. (1996) Adult reproductive parameters of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) during 1994. *Calif. Coop. Ocean. Fish. Invest. Rep.*, 37: 140–151
- Matsuura S., Matsuyama M., Otsuka T., Takeshita K., Mitani T., Ogawa T. (1991) Histological maturity scales, maturation and spawning in Kyushu-subpopulation sardine, *Sardinops melanostictus*. In: Kawaaki K., Tanaka S., Toba Y., Taniguchi A. (eds.), *Long-term Variability of Pelagic Fish Populations and their Environment*. Pergamon Press, Oxford, pp. 221–228
- Murayama T., Shirashi M., Aoki I. (1994) Changes in ovarian development and plasma levels of sex hormones in the wild female Japanese sardine (*Sardinops melanostictus*) during the spawning period. *Journal of Fish Biology*, 45:235–245
- Murua H., Kraus G., Saborido-Rey F., Witthames P.R., Thorsen A., Junquera S. (2003) Procedures to estimate fecundity of marine fish species in relation to their reproductive strategy. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 33:33-54
- Murua H., Saborido-Rey F. (2003) Female reproductive strategies of marine fish species of the North Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, 33:23–31
- Muus B.J., Nielsen J.G. (1999) Sea fish. *Scandinavian Fishing Year Book*, Hedeusene, Denmark
- O'Brien L., Burnett J., Mayo R.K. (1993) Maturation of nineteen species of finfish off the northeast coast of the United States, 1985-1990. *National Oceanographic and Atmospheric Administration (NOAA)*
- Parker K. (1980) A direct method for estimating northern anchovy, *Engraulis mordax*, spawning biomass. *Fishery Bulletin*, 78:541–544
- Picquelle S.J., Stauffer G. (1985) Parameter estimation for an egg production method of anchovy biomass assessment. In: Lasker, R. (eds), *An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, Engraulis mordax.*, pp. 7–16, NOAA Technical Report NMFS 36.
- Priede I.G., Raid T., Watson J.J. (1995) Deep-water spawning of Atlantic mackerel *Scomber scombrus*, west of Ireland. *Marine Biology*, 75:849-855

- Priede I.G., Watson J.J. (1993) An Evaluation of the Daily Egg Production Method for Estimating Biomass of Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*). Bulletin of Marine Science, 53: 891-911
- Quintanilla L., Pérez N. (2000) Spawning frequency of sardine *Sardina pilchardus* (Walb.) off the Spanish North Atlantic coast in 1997. Fisheries Research, 45:73–79
- Saidapur K.S. (1982) Structure and function of postovulatory follicles (corpora lutea) in the ovaries of nonmammalian vertebrates. International Review of Cytology, 75:243–285
- Sette O.E. (1943) Biology of the Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) of North America. Fishery Bulletin, 50:149-237
- Skagen D.W. (1989) Growth patterns in the North Sea and Western mackerel in Norwegian catches 1960- 1985. ICES CM 1989/H:21 21 pp
- Somarakis S., Ganias K., Siapatis A., Koutsikopoulos C., Machias A., Papaconstantinou C. (2006) Spawning habitat and daily egg production of sardine (*Sardina pilchardus*) in the eastern Mediterranean. Fisheries Oceanography, 15(4):281-292
- Villamor B., Abaunza P., Farina C. (2001) Age and growth of Northeast Atlantic Mackerel (*Scomber scombrus*) in waters off the north and northwest of Spain (ICES Divisions VIIIc and IXa North) 1990-2000. ICES CM 2001/J 44: 30pp.
- Wardle C.S., He P. (1988) Burst swimming speeds of mackerel, *Scomber scombrus* L. Journal of Fish Biology, 32:471-478
- Ware D.M. (1977) Spawning time and egg size of Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*, in Relation to the Plakton. Journal of Fisheries Research Board of Canada, 34:2308-2315
- Weibel E.R. (1969) Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. International Review of Cytology, 26:235-302
- Weibel E.R., Kistler G.S., Scherle W. (1966) Practical stereological methods for morphometric cytology. Journal of Cell Biology, 30:22-38
- Weibel E.R. (1963) Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. Laboratory Investigation, 12:131-155
- Weibel E.R., Gomez D.M. (1962) Special communications. A principle for counting tissue structures on random sections. Journal of Applied Physiology, 17: 343-348
- Whitehead P. (1990) Clupeidae. In: Quero. J., J.C. Hureau, C. Karrer, A. Post and L. Saldanha (eds), Checklist of the fishes of the eastern tropical Atlantic, 208-227. CLOFETA, JNICT, Lisbon, Paris

Whitehead P.J.P. (1985) Clupeoid fishes of the world (suborder Clupeoidei). An annotated and illustrated catalogue of the herrings, sardines, pilchards, sprats, shads, anchovies and wolf-herrings. Part 1 -Chirocentridae, Clupeidae and Pristigaster. Food and Agricultural Organization (FAO), Rome, Italy

Williams M.A. (1977) Quantitative methods in Biology. Amsterdam and New York: Elsevier/ North Holland Biomedical Press. 234pp. [vol. 6(2) of Practical Methods in Electron Microscopy (A. Glover.ed.)]

Winemiller K.O. (1989) Patterns of variation in life-history among south-American fishes in seasonal environments. *Oecologia*, 81:225–241

### **Ελληνική**

Χατζιωάννου Μ., Βαφείδης Δ. (2015) Ιστολογία υδρόβιων ζωικών οργανισμών, Εργαστηριακές ασκήσεις ιστολογίας, 1-82

### **Ιστοσελίδες**

<http://www.fao.org/fishery/species/2910/en> (τελευταία πρόσβαση 16/6/2017)

## ABSTRACT

The postovulatory follicle method (*POF Method*) is particularly applicable for the calculation of **spawning fraction** ( $S$ ), which is a **population parameter** for the estimation of **spawning frequency** ( $f$ ) in multiple spawners and it is used further in applications of the **daily egg production method** (*DEPM*) for the assessment of fish stocks. In spite of its popularity the *POF Method* can be inaccurate when the same criteria are used to every species and population without prior validation. In general, the Atlantic sardine, *Sardina pilchardus*, is very well studied species and it was used in our study as a control to confirm the correct application of the method. As regards to the Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*, there are a lot of doubts both for the fecundity pattern and for the methods that have to be used. The aim of this study was to estimate the quantity of *POFs* in both species using histology (stereological method). The main objective was not the fecundity estimation, but to show whether the *POF Method* may be applied to A. mackerel. According to the results, *POF Method* can be applied to sardine because of the existence of a single daily *POF* cohort in its ovaries. Turning on the other hand, in mackerel ovaries there were 2 or 3 different daily *POFs* cohorts which resulted to an overestimation of **relative batch fecundity** (*RFb*). Thus, the use of  $S$  as a parameter seems to be difficult when there are more than one daily *POFs* cohorts. Perhaps the use of spawning interval ( $SI$ ) - which is an individual parameter – for the estimation of  $f$  is more appropriate for the A. mackerel.

**Keywords:** POF Method, spawning fraction ( $S$ ), postovulatory follicles (*POFs*), *Scomber scombrus*



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1

**Πίνακας 1:** Πρωτόκολλο Ιστοκινέτας

Αιθανόλη 70%	1h
Αιθανόλη 70%	2h
Αιθανόλη 80%	1h
Αιθανόλη 95%	1h
Αιθανόλη 95%	2h
Αιθανόλη 95%	1h
Αιθανόλη 100%	1h
Αιθανόλη 100%	2h
Ξυλόλη	2h
Ξυλόλη	2h
Παραφίνη	2h
Παραφίνη	4h

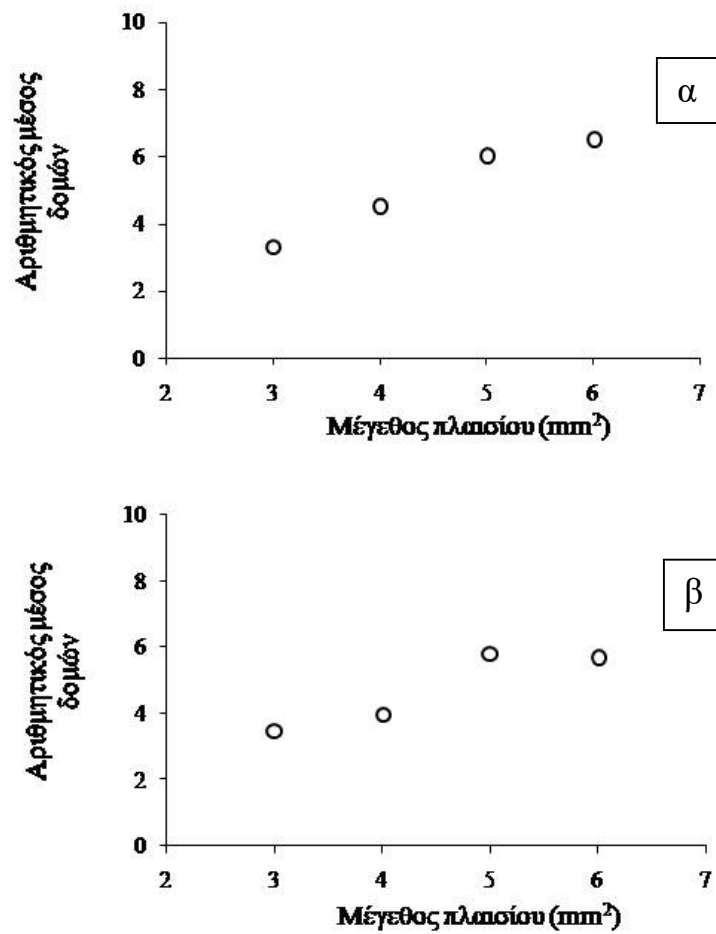
**Πίνακας 2:** Πρωτόκολλο Χρώσης Αιματοξυλίνη- Ηωσίνη.

Ξυλόλη I	15'
Ξυλόλη II	15'
Αλκοόλη 100%	5'
Αλκοόλη 100%	5'
Αλκοόλη 95%	5'
Αλκοόλη 95%	5'
Αλκοόλη 70%	5'
Αιματοξυλίνη	10'
Διάλυμα διαφοροποίησης	2 εμβαπτίσεις
Ηωσίνη	3'
Αλκοόλη 70%	1'
Αλκοόλη 95%	1'
Αλκοόλη 95%	1'
Αλκοόλη 100%	1'
Αλκοόλη 100%	1'
Ξυλόλη	15'

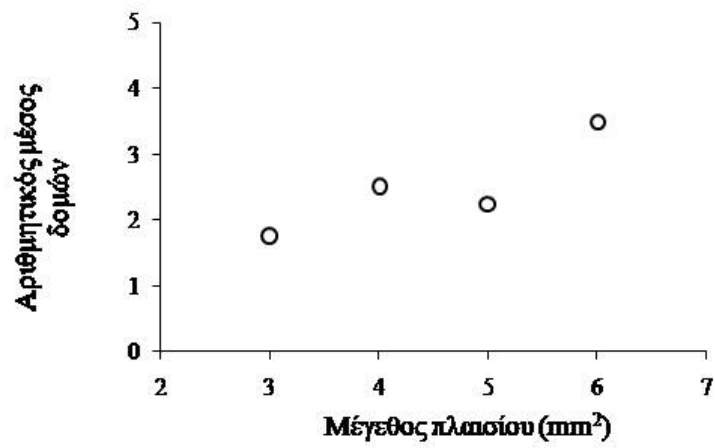
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2

### Πιλοτική μελέτη 1

Για την εκτέλεση της στερεολογικής μεθόδου η επιλογή του αριθμού των πλαισίων σε κάθε είδος έγινε με βάση το μέγεθος της κάθε τομής έτσι ώστε να γίνει ικανοποιητική κάλυψή της. Για τη σαρδέλα επιλέχθηκαν 4 πλαίσια καθώς οι τομές ήταν μεγαλύτερες από του σκουμπριού όπου επιλέχθηκαν 3 πλαίσια. Έπειτα μελετήθηκε η επιλογή του κατάλληλου εμβαδόν πλαισίου εξετάζοντας 6 άτομα για τη σαρδέλα και 4 άτομα για το σκουμπρί και επιλέγοντας δοκιμαστική πυκνότητα πλέγματος (*Weibel grid*) ίση με  $0.08 \text{ mm}^2$ . Ο μέσος αριθμός κενών ωοθυλακίων έδειξε να σταθεροποιείται στο εμβαδόν πλαισίου  $5 \text{ mm}^2$  και στα δύο είδη (**Σχ. 8 και Σχ.9**). Για την επιβεβαίωση του προηγούμενου αποτελέσματος έγινε ακόμα μία μέτρηση με δοκιμαστική πυκνότητα πλέγματος  $0.1 \text{ mm}^2$  στη σαρδέλα. Στη συνέχεια, εφόσον ο αριθμός σε κάθε πλαίσιο έπρεπε να περιέχει περίπου 5000 σημεία- σταυρούς ανά  $\text{cm}^2$  (Emerson *et al.* 1990) υπολογίστηκε ότι στα  $5 \text{ mm}^2$  θα πρέπει να περιέχεται πλέγμα με εμβαδόν  $0.02 \text{ mm}^2$  έτσι ώστε να υπάρχουν 256 σημεία- σταυροί εντός του κάθε πλαισίου, άρα  $5120 \text{ σημεία/cm}^2$ .



**Σχήμα 8:** *Sardina pilchardus*. Σχέση μεταξύ μέσου αριθμού κενών ωοθυλακίων και τεσσάρων διαφορετικών εμβαδόν πλαισίου. α) πυκνότητα πλέγματος 0,08 mm<sup>2</sup>, β) πυκνότητα πλέγματος 0,1 mm<sup>2</sup>

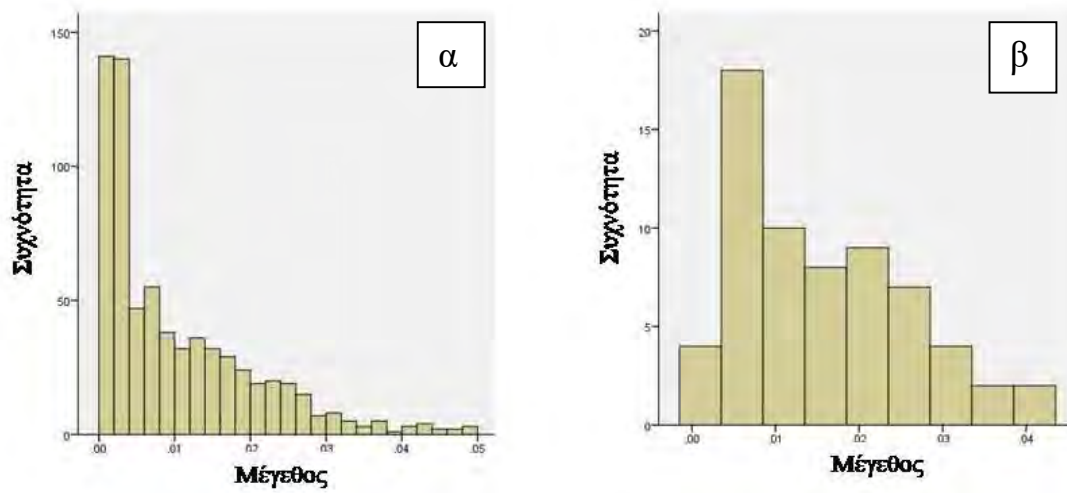


**Σχήμα 9:** *Scomber scombrus*. Σχέση μεταξύ μέσου αριθμού κενών ωοθυλακίων και τεσσάρων διαφορετικών εμβαδόν πλαισίου με σταθερή πυκνότητα πλαισίου 0,08 mm<sup>2</sup>.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 3

### Πιλοτική μελέτη 2

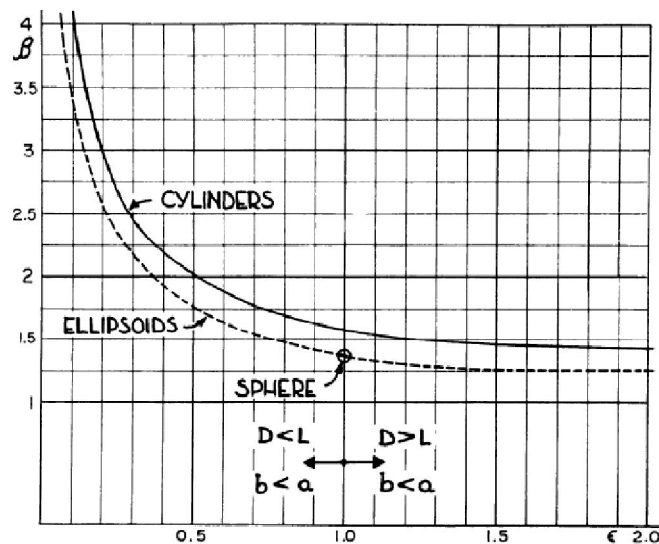
Ο συντελεστής  $K$  στη σαρδέλα υπολογίστηκε μετρώντας τη διάμετρο από συνολικά 690 κενά ωοθυλάκια, ενώ στο σκουμπρί από 101 κενά ωοθυλάκια. Αρχικά, έγινε έλεγχος κανονικότητας όσον αφορά το μέγεθος των κενών ωοθυλακίων, όπου βρέθηκε και για τα δύο είδη ότι δεν ακολουθούν κανονική κατανομή (Σχήμα 10). Σύμφωνα το Weibel (1963, 1969) εάν οι μετρήσεις του μεγέθους των σωματιδίων ακολουθούν κανονική κατανομή τότε το  $K$  θα είναι μεταξύ 1.00 και 1.07, ενώ αν δεν ακολουθούν κανονική κατανομή τότε θα είναι μεγαλύτερο από 1.07. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε η μέτρηση της διαμέτρου *Feret* με τη βοήθεια του εργαλείου *ROI Manager* του λογισμικού προγράμματος *ImageJ 1.51p*. Με τη διάμετρο *Feret* υπολογίζεται η μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ δύο οποιονδήποτε σημείων κατά μήκος μιας επιλεγμένης περιοχής. Ακολουθώντας τους τύπους (2), (3) και (4), όπως αναφέρονται στο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι, υπολογίστηκε ο συντελεστής  $K$ , για τη σαρδέλα 1.41 και για το σκουμπρί 1.25.



**Σχήμα 10:** Τεστ κανονικότητας α) *S. pilchardus*, (*Shapiro- Wilk*,  $p < 0.05$ ), β) *S. scombrus*, (*Shapiro- Wilk*,  $p < 0.05$ ). Μέγεθος σε  $\text{mm}^2$ .

### Πιλοτική μελέτη 3

Ο συντελεστής  $\beta$  καθορίζεται ως η αναλογία μεγέθους της μεγαλύτερης προς τη μικρότερη διάμετρο. Έτσι, μέσω του εργαλείου *ROI Manager* του λογισμικού προγράμματος *ImageJ 1.51p* υπολογίστηκε η αναλογία διαστάσεων (*aspect ratio, AR*), δηλαδή το κλάσμα του μεγαλύτερου προς το μικρότερου άξονα για κάθε κενό ωθυλάκιο, 690 κενά ωθυλάκια στη σαρδέλα, ενώ στο σκουμπρί 101. Η μέση τιμή για την αναλογία διαστάσεων (*AR*) στη σαρδέλα υπολογίστηκε 2.12, ενώ για το σκουμπρί 2.35. Σύμφωνα με το διάγραμμα που παρουσιάζεται στην εργασία Weibel (1969), στην οποία γίνεται η υπόθεση ότι όλα τα ωθυλάκια της ωθήκης προσαρμόζονται σε μία ελλειψοειδή μορφή (Ganias *et al.* 2015a) (Σχ. 11), οι παραπάνω τιμές του  $\beta$  υπολογίστηκαν να είναι ίσες με 1.25 και για τα δύο είδη.

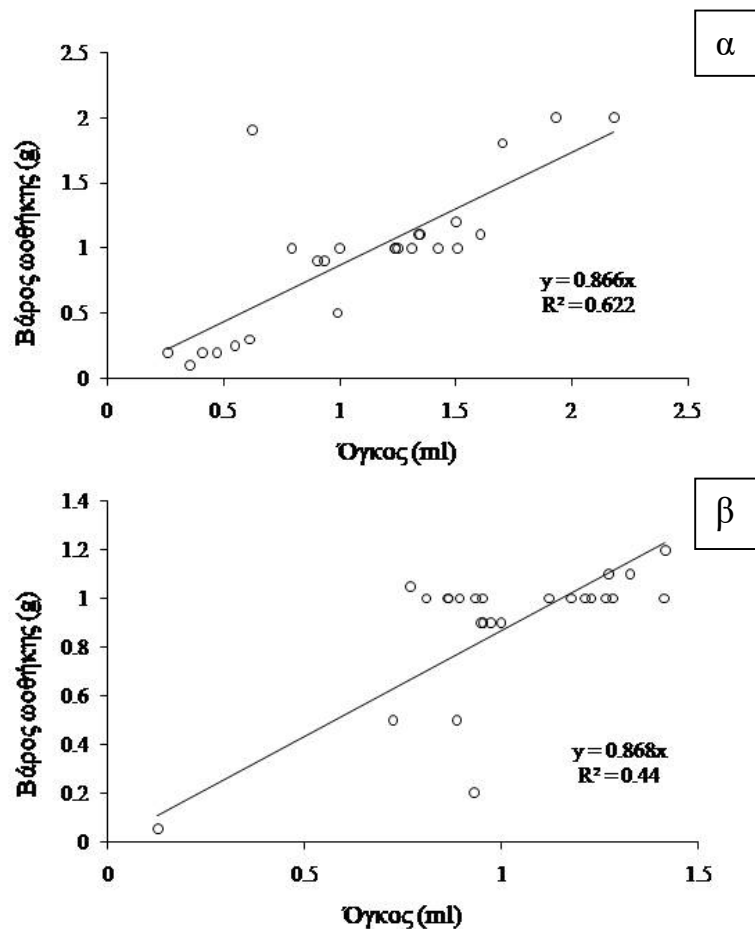


**Σχήμα 11:** Τιμές συντελεστή διαμόρφωσης,  $\beta$ , όσον αφορά το λόγο  $\epsilon$  της διαμέτρου σε μήκος για κύλινδρο, έλλειψη και σφαίρα. (Παράθεση διαγράμματος από την εργασία Weibel & Gomes 1962).



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 4

Για την εκτίμηση της πυκνότητας ωοθήκης ( $\rho$ ), αρχικά ζυγίστηκαν σε ζυγαριά ακριβείας και στη συνέχεια μετρήθηκε ο όγκος σε συνολικά 50 ωοθήκες, 25 ωοθήκες σαρδέλας και 25 σκουμπριού. Στην **Εικόνα 5** δείχνεται βάση των αποτελεσμάτων ότι δεν ήταν εφικτός ο υπολογισμός της πυκνότητας ( $\rho$ ) βάση των δειγμάτων μας καθώς ο συντελεστής προσδιορισμού  $R^2$  ήταν αρκετά χαμηλός. Αυτό συνέβη λόγω των μετρήσεων σε μικρές ποσότητες διαθέσιμου υλικού, το οποίο καθιστά μεγαλύτερο το τυπικό σφάλμα.



**Εικόνα 5.** Σχέση μεταξύ βάρους (g) και όγκου (ml) ωοθήκης α) για σαρδέλα, β) για σκουμπρί