



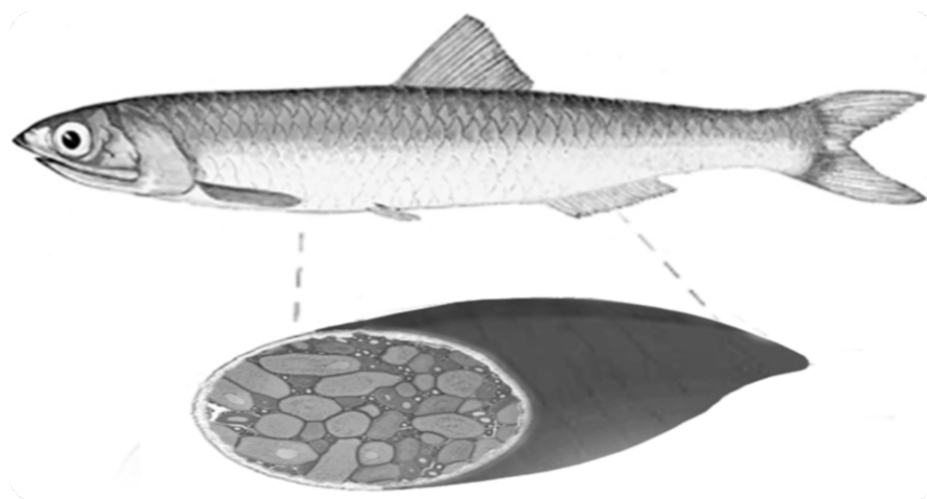
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΛΛΗΝΙΚΟ
ΚΕΝΤΡΟ
ΘΑΛΑΣΣΙΩΝ
ΕΡΕΥΝΩΝ 
ΕΛΚΕΘΕ

Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Περιβαλλοντική Βιολογία - Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων»

Διακυμάνσεις αναπαραγωγικών παραμέτρων του γαύρου
(*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus 1758) στο Βόρειο Αιγαίο



Μεταπτυχιακή Διατριβή

Κωνσταντίνος Μαρκάκης

Ηράκλειο 2018

«Διακυμάνσεις αναπαραγωγικών παραμέτρων του γαύρου (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus 1758) στο Βόρειο Αιγαίο»

Κωνσταντίνος Μαρκάκης – Μεταπτυχιακή Διατριβή

Πανεπιστήμιο Κρήτης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας

Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιων Ερευνών, Ινστιτούτο Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων και Εσωτερικών Υδάτων

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Αναπληρωτής Καθηγητής Γεώργιος Κουμουνδούρος (επιβλέπων)

Διευθυντής Ερευνών Στυλιανός Σωμαράκης (συνεπιβλέπων)

Διευθύντρια Ερευνών Μαριάννα Γιαννουλάκη

Ευχαριστίες

Η παρούσα διατριβή αποτελεί προϊόν δουλειάς που πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων και Εσωτερικών Υδάτων (Ι.ΘΑ.ΒΙ.Π.Ε.Υ.) του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε.) σε συνεργασία με το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Κρήτης στο πλαίσιο του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Περιβαλλοντική Βιολογία – Διαχείριση Χερσαίων και Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων». Ολοκληρώνοντας τον μεταπτυχιακό κύκλο σπουδών αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες σε ορισμένους ανθρώπους, η συμβολή και η συμπαράσταση των οποίων ήταν πολύτιμη και καθοριστική στην εκπόνηση της παρούσας διατριβής.

Πρωτίστως, θα ήθελα να απευθύνω τις θερμότερες ευχαριστίες μου στους επιβλέποντες Δρ. Γεώργιο Κουμουνδούρο, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας και Δρ. Στυλιανό Σωμαράκη, Διευθυντή Ερευνών του Ι.ΘΑ.ΒΙ.Π.Ε.Υ. που μου εμπιστεύθηκαν το θέμα της παρούσας διατριβής και που με την ουσιαστική τους καθοδήγηση ολοκληρώθηκε με επιτυχία. Στον κ. Κουμουνδούρο για την επιστημονική του καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε, καθώς και για την στήριξη του, τόσο κατά την εκπόνηση της παρούσας διατριβής όσο και καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού κύκλου σπουδών. Στον κ. Σωμαράκη για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, ώστε να αποκτήσω γνώσεις, εμπειρίες και εξοικείωση σε ένα τόσο ενδιαφέρον και σημαντικό αντικείμενο. Η επιστημονική του συμβολή, η αμέριστη υπομονή, η συμπαράσταση και η προσωπική συμμετοχή του από το στάδιο της δειγματοληψίας μέχρι και το στάδιο της συγγραφής ήταν ιδιαίτερα σημαντική και καθοριστική. Θεωρώ τον εαυτό μου πολύ τυχερό για την ευκαιρία που είχα να δουλέψω μαζί του, αφού από τα «χέρια» του πέρασαν καταξιωμένοι ερευνητές (Δρ. Ε. Σχισμένου, Δρ. Ν. Νικολιουδάκης κ.α.), και ευελπιστώ ότι η άσπογη συνεργασία μας θα συνεχιστεί και στο μέλλον.

Θα ήθελα, ακόμη να ευχαριστήσω θερμά την Διευθύντρια Ερευνών Δρ. Μαριάννα Γιαννουλάκη για την τιμή που μου έκανε να συμμετάσχει στην τριμελή εξεταστική επιτροπή. Οι πολύτιμες επισημάνσεις και υποδείξεις της, μέσα από την πολυδιάστατη επιστημονική της γνώση και τις εξόχως εποικοδομητικές συζητήσεις, εμπλούτισε τις γνώσεις μου και υπήρξαν καθοριστικές για την ποιοτική αναβάθμιση και ολοκλήρωση της διατριβής.

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή βασίστηκε σε δείγματα ενήλικων ατόμων γαύρου που συλλέχθηκαν στο πλαίσιο του Εθνικού Προγράμματος Συλλογής Αλιευτικών Δεδομένων

της δράσης MEDIAS με φορέα υλοποίησης το Ινστιτούτο Θαλάσσιων Βιολογικών Πόρων και επιστημονικό υπεύθυνο τον Διευθυντή Ερευνών Δρ. Αθανάσιο Μαχιά. Τον οποίο θα ήταν παράληψη μου να μην τον ευχαριστήσω θερμά για τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχε σχετικά με τις δειγματοληψίες πεδίου.

Αναμφισβήτητα, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να απευθύνω σε δύο εξαιρετες ερευνήτριες που χωρίς την καθοριστική βοήθειά τους δεν θα έχει πραγματοποιηθεί η παρούσα διατριβή. Την Δρ. Ευδοξία Σχισμένου που με μύησε στις τεχνικές της ιστολογίας, στις μεθόδους εκτίμησης της γονιμότητας και ήταν πρόθυμη να βοηθήσει σε οποιαδήποτε σχετική δυσκολία πρόκυπτε. Καθώς και την Δρ. Σταυρούλα Τσούκαλη που μου παρείχε τα υδρογραφικά δεδομένα και με βοήθησε σε ένα σημαντικό μέρος της χωρικής τούς απεικόνιση.

Οι δειγματοληψίες πεδίου πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία και οφείλονταν σε ένα μεγάλο βαθμό στον Ε. Κοκκό καπετάνιο του ερευνητικού σκάφους «ΦΙΛΙΑ» του ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. και στο πλήρωμα του αποτελούμενο από τους Γ. Γαργανουράκη, Κ. Λυγεράκη, Κ. Παρασκευά, Ν. Καπετανάκη, Δ. Ανυφαντάκη και τον περιβόητο εκ Αιγύπτου Σήφη. Οι οποίοι με την αυταπάρνησή τους και την προθυμία τους φέραν σε πέρας τις δειγματοληψίες και τους ευχαριστώ θερμά γι' αυτό.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους Α. Μαχιά, Σ. Σωμαράκη, Μ. Γιανουλάκη, Κ. Τσαγκαράκη, Ε. Σχισμένου, Α. Καπελώνη, Σ. Σταματά, που έκαναν τα ταξίδια μου με το Ε/Σ «ΦΙΛΙΑ» «καλοτάξιδα» και με εφοδίασαν με ανεκτίμητες επιστημονικές εμπειρίες.

Οι περισσότεροι εκ των προαναφερθέντων, μαζί με τους Γ. Τσερπέ, Ν. Περιστεράκη, Κ. Σκαρβέλη, Γ. Λαζαράκη, Α. Γιαννακάκη, Γ. Μαράκη, Γ. Κοσόγλου, Μ. Μεταξάκη έκαναν και κάνουν την καθημερινή μου εργασία στο ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε. ευχάριστη και δημιουργική. Τους ευχαριστώ θερμά όλους.

Κλείνοντας ευχαριστώ ειλικρινά, τους γονείς μου για την ηθική υποστήριξη που μου προσφέρουν όλα αυτά τα χρόνια, δίνοντάς μου ελπίδα και δύναμη να συνεχίσω να προσπαθώ για το καλύτερο.

Ηράκλειο, 14 Σεπτεμβρίου 2018

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	1
Abstract	2
1. Εισαγωγή	3
1.1 Σημασία των μικρών πελαγικών ψαριών.....	3
1.2 Κλιματική αλλαγή και μικρά πελαγικά ψάρια.....	3
1.3 Αναπαραγωγικές στρατηγικές και παραγωγή αβγών	4
1.4 Ο Ευρωπαϊκός γαύρος	6
1.5 Περιοχή μελέτης	8
1.6 Σκοπός της μελέτης.....	9
2. Υλικά και Μέθοδοι	11
2.1 Συλλογή δειγμάτων.....	11
Δειματοληψία μεσοζωπλαγκτού	12
Δειματοληψία ψαριών.....	12
2.2 Εργαστηριακή ανάλυση δειγμάτων	13
Ποσοτική ανάλυση μεσοζωπλαγκτού.....	13
Επεξεργασία και αναλύσεις ψαριών	13
2.3 Στερεολογική ανάλυση	16
2.4 Μέθοδος πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων (OPD).....	18
Εκτίμηση εξισώσεων διόρθωσης λόγω συρρίκνωσης των ωοκυττάρων.....	19
Υπολογισμός του σχετικού αριθμού των ωοκυττάρων στην γονάδα	20
2.6 Αυτοδιαμετρική μέθοδος (autodiametric method).....	20
2.7 Δείκτης σωματικής ευρωστίας (Somatic condition factor)	21
2.8 Στατιστική ανάλυση.....	22
3. Αποτελέσματα.....	25
3.1 Περιβαλλοντικές συνθήκες.....	25
3.2 Δείκτης σωματικής ευρωστίας και μέγεθος θηλυκών	32
3.3 Γονιμότητα.....	34
3.4 Αυτοδιαμετρική μέθοδος	35
3.5 Σχετικός αριθμός ωοκυττάρων ανά στάδιο <i>i</i>	39
4. Συζήτηση.....	47
5. Συμπεράσματα	52
6. Βιβλιογραφία	54
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	60

Περίληψη

Ο Ευρωπαϊκός γαύρος (European anchovy), *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus 1758) αποτελεί έναν σημαντικό αλιευτικό πόρο στη Μεσόγειο και την Ελλάδα. Η μελέτη της αναπαραγωγικής βιολογίας του θα βοηθήσει στην κατανόηση των διακυμάνσεων των πληθυσμών του και στην ορθολογική αλιευτική διαχείρισή τους. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθούν αναπαραγωγικές παράμετροι του συγκεκριμένου είδους και πώς αυτές διακυμαίνονται στην περιοχή του Βόρειου Αιγαίου. Χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ενήλικων ατόμων τα οποία συλλέχθηκαν κατά το μέγιστο της αναπαραγωγικής του περιόδου, τον Ιούνιο και Ιούλιο του 2014 και 2016. Εκτιμήθηκαν η σχετική γονιμότητα (relative batch fecundity) με τη μέθοδο των ενυδατωμένων ωοκυττάρων και οι σχετικοί αριθμοί ωοκυττάρων ανά ωοκυτταρικό στάδιο σε άτομα του ίδιου γοναδικού σταδίου (άτομα που είχαν ωοτοκήσει ~24 ώρες πριν τη σύλληψη) με μέθοδο που συνδυάζει τη θεωρία πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων (oocyte packing density) με τη στερεολογία (stereology). Στα ίδια άτομα, μετρήθηκε ο αριθμός των ωοκυττάρων >300μm και η μέση διάμετρος κάθε ωοκυττάρου με την αυτοδιαμετρική μέθοδο (autodiametric method), κατασκευάστηκαν οι κατανομές συχνοτήτων των διαμέτρων των ωοκυττάρων και υπολογίστηκε η μέση διάμετρος των 20 μεγαλύτερων ωοκυττάρων (L20). Οι δύο ανεξάρτητες μέθοδοι (στερεολογική και αυτοδιαμετρική) έδωσαν ισχυρά συσχετισμένα αποτελέσματα εκτίμησης του αριθμού των λεκιθικών ωοκυττάρων. Παρά τις σημαντικές διαφορές στις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, αλατότητα, φθορισμός) μεταξύ των ετών ή/και των περιοχών και τη μεγάλη διαφορά στη αναπαραγόμενη βιομάζα του γαύρου μεταξύ 2014 (14000 t) και 2016 (40000 τ), η σχετική γονιμότητα (αβγά g⁻¹), από τη μέθοδο των ενυδατωμένων ωοκυττάρων, δεν παρουσίαζε διαφορές ανάμεσα στα έτη και τις περιοχές. Ομοίως και ο σχετικός αριθμός ωοκυττάρων >300μm, από την αυτοδιαμετρική μέθοδο, καθώς οι σχετικοί αριθμοί ωοκυττάρων, συνολικών και ανά στάδιο, από τη στερεολογική μέθοδο. Το μέγεθος της πιο προωθημένης ομάδας ωοκυττάρων (L20) μειώνεται με τη θερμοκρασία και αυξάνεται με το μέγεθος των γεννητόρων και τη διαθεσιμότητα τροφής.

Λέξεις κλειδιά: *Engraulis encrasicolus*, πυκνότητα πακεταρίσματος ωοκυττάρων, στερεολογία, αυτοδιαμετρική μέθοδος, γονιμότητα, Βόρειο Αιγαίο

Abstract

European anchovy, (*Engraulis encrasicolus* [Linnaeus 1758]) is an important fisheries resource in the Mediterranean and the Hellenic Seas. The study of its reproductive biology will help to understand the fluctuations of its stocks and will improve their assessment and management. The aim of the present study was to investigate certain reproductive parameters of the species and their variability in the North Aegean Sea. Samples of adult fish were collected during the peak of the spawning period in June and July 2014 and 2016. Relative batch fecundity was measured with the hydrated oocytes method and the relative numbers of oocytes per oocyte stage in Day-1 females (females that had spawned ~ 24 hours before capture) was estimated by a method that combined the oocyte packing density theory with stereology. For the same individuals, the number of oocytes >300µm and the mean diameter of each oocyte were measured with the autodiometric method. Frequency distributions of oocyte diameters were constructed and the mean diameters of the largest 20 oocytes (L20) were calculated. The two independent methods (stereological and autodiometric) resulted in strongly and positively correlated estimates of the number of vitellogenic oocytes. In spite of the significant differences in environmental conditions (temperature, salinity, fluorescence) between years and/or regions and the marked difference in the spawning stock biomass of anchovy between 2014 (14000 t) and 2016 (40000 t), relative batch fecundity (eggs g⁻¹), by the hydrated oocytes method, did not exhibit any significant difference between years and regions. Similarly, the relative number of oocytes >300µm, by the autodiometric method, and the relative oocyte numbers, total and by stage, by the stereological method, did not differ significantly between years and regions. The size of the most advanced group of oocytes (L20) decreased with temperature and increased with female size and food availability.

Keywords: *Engraulis encrasicolus*, oocyte packing density, stereology, autodiometric method, fecundity, North Aegean Sea

1. Εισαγωγή

1.1 Σημασία των μικρών πελαγικών ψαριών

Τα μικρά πελαγικά ψάρια (ΜΠΨ), όπως οι σαρδέλες και οι γαύροι, είναι γενικά πλανγκτονοφάγα είδη. Απαντώνται σε πολύ υψηλές αφθονίες παγκοσμίως και τείνουν να σχηματίζουν πυκνά κοπάδια ή συναθροίσεις. Τα ΜΠΨ αντιπροσωπεύουν το 30% της παγκόσμιας αλιευτικής παραγωγής (Branch et al. 2010), καθώς επίσης και της Μεσογειακής και της Ελληνικής αλιευτικής παραγωγής (Somarakis et al. 2006). Παρόλο που το μεγαλύτερο μέρος τους χρησιμοποιείται για την παραγωγή ιχθυάλευρων, που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή ζωοτροφών για την κτηνοτροφία και τις υδατοκαλλιέργειες (Alder 2008), τα ΜΠΨ συμβάλουν επίσης σημαντικά στην επισιτιστική ασφάλεια πολλών αναπτυσσόμενων χωρών (Freon et al. 2005). Στην Μεσόγειο, οι περισσότερες εκφορτώσεις γαύρου και σαρδέλας διοχετεύονται κατευθείαν στο καταναλωτικό κοινό ως φρέσκο αλίευμα ή χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία της κονσερβοποιίας.

Τα ΜΠΨ διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στα θαλάσσια τροφικά πλέγματα καθώς αποτελούν τον κύριο κρίκο μεταφοράς ενέργειας από τα χαμηλότερα (μεσοζωοπλαγκτό) προς τα υψηλότερα (ανώτεροι θηρευτές) τροφικά επίπεδα (Freon et al. 2005). Αποκτούν δε ιδιαίτερη σημασία σε συστήματα που χαρακτηρίζονται από τροφική αλυσίδα τύπου «μέση της σφίγγας» (wasp-waist), όπου διοχετεύονται τεράστια ποσά ενέργειας από τους πλαγκτονικούς οργανισμούς στα υψηλότερα τροφικά επίπεδα, μέσω μικρού αριθμού ΜΠΨ ή άλλων πλανγκτονοφάγων ειδών (Cury et al. 2003). Πρόσφατες συγκριτικές οικοσυστημικές μελέτες έδειξαν ότι η αλιεία των ΜΠΨ δεν έχει αντίκτυπο μόνο σ' αυτά, αλλά και σε άλλα είδη που τρέφονται από αυτά, όπως τα κητώδη, τα θαλάσσια πτηνά κ.α. (Smith 2011). Αλλά και στη Μεσόγειο έχειδειχθεί επίσης ότι η εντατική εκμετάλλευση των μικρών πελαγικών ειδών μπορεί να προκαλέσει σημαντικές επιπτώσεις στη δομή και τη λειτουργία των θαλάσσιων οικοσυστημάτων (Coll and Libralato 2011).

1.2 Κλιματική αλλαγή και μικρά πελαγικά ψάρια

Πέραν της οικονομικής τους σημασίας, της παγκόσμιας κατανομής τους και του βασικού ρόλου τους στα θαλάσσια τροφικά πλέγματα, τα ΜΠΨ είναι ένα ιδανικό θέμα για τη μελέτη των επιπτώσεων της αλλαγής του κλίματος στα θαλάσσια οικοσυστήματα, διότι, έχοντας μικρή διάρκεια ζωής και τρεφόμενα με πλαγκτό, οι πληθυσμοί τους μεταβάλλονται ταχέως σε συνάρτηση με το περιβάλλον (Alheit et al., 2009). Είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις

κλιματικές μεταβολές και εξαιρετικά μεταβλητά ως προς την αφθονία τους, τόσο από έτος σε έτος όσο και σε κλίμακα δεκαετιών (Freon et al., 2005). Σε πολλά οικοσυστήματα παρατηρούνται επίσης εναλλαγές στην αφθονία γαύρου και σαρδέλας, δηλαδή υπάρχουν περίοδοι που επικρατεί η σαρδέλα και περίοδοι που ο γαύρος έχει μεγάλη αφθονία και η σαρδέλα μικρή (Alheit et al. 2009).

Ένα αποτελεσματικό σύστημα διαχείρισης των ΜΠΨ, θα πρέπει να ενσωματώνει την κατανόηση των μηχανισμών που ελέγχουν τις ραγδαίες μεταβολές της αφθονίας τους, της χωρικής τους κατανομής και της παραγωγικότητας των πληθυσμών τους. Η μεγάλη μεταβλητότητα των αποθεμάτων ΜΠΨ οφείλεται κατά κύριο λόγο στις μεταβολές στη στρατολόγηση (recruitment) που στα Μεσογειακά είδη καθορίζεται τόσο από τη θνησιμότητα κατά τα νεαρά στάδια αλλά εξίσου σημαντικά και από μεταβολές στην παραγωγή αβγών (Somarakis et al. 2018).

1.3 Αναπαραγωγικές στρατηγικές και παραγωγή αβγών

Τα ψάρια χρειάζονται ενέργεια για να αναπαραχθούν (McBride et al. 2015). Ορισμένα είδη ωοτοκούν και τρέφονται σε διαφορετικές περιοχές, κατά την διάρκεια διαφορετικών περιόδων, αποθηκεύοντας ενέργεια στην περιοχή διατροφής την οποία χρησιμοποιούν αργότερα για την αναπαραγωγή τους στο πεδίο ωοτοκίας (capital breeding). Άλλα είδη τρέφονται και ταυτόχρονα ωοτοκούν κατά τη διάρκεια μιας παρατεταμένης αναπαραγωγικής περιόδου και η ενέργεια για την παραγωγή αβγών προέρχεται άμεσα από την τροφοληψία (income breeding).

Ο γαύρος και η σαρδέλα είναι πολλαπλοί αποθέτες (batch spawners) που ωριμάζουν και απελευθερώνουν πελαγικά αβγά σε διακριτά χρονικά διαστήματα κατά τη διάρκεια μιας σχετικά παρατεταμένης αναπαραγωγικής περιόδου. Η γονιμότητά τους δεν είναι καθορισμένη (indeterminate spawners) που σημαίνει ότι ένα σημαντικό ποσοστό της ετήσιας γονιμότητας, δηλαδή των συνολικών αβγών που θα απελευθερωθούν κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου, θα παραχθεί εντός της περιόδου αυτής (*de novo* vitellogenesis) (Schismenou et al. 2012).

Η δυναμική της *de novo* λεκιθογένεσης στον Ευρωπαϊκό γαύρο διευκρινίστηκε πρόσφατα από τους Schismenou et al. (2012), χρησιμοποιώντας ένα συνδυασμό σύγχρονων μεθόδων και θεωριών της αναπαραγωγικής βιολογίας ιχθύων (συμπεριλαμβανομένης την

θεωρίας «πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων» [Kurita and Kjesbu 2009] σε συνδυασμό με στερεολογικές τεχνικές [Korta et al. 2010], της αυτοδιαμετρικής μεθόδου [Thorsen and Kjesbu 2001], αρχές της γοναδικής αλλομετρίας [Somarakis et al. 2004a] και χρονολόγηση των μεταωορρηξιακών ωοθυλακίων [Somarakis et al. 2012]). Η μελέτη κατέδειξε ότι η στρατολόγηση της ομάδας των λεκιθικών ωοκυττάρων δεν είναι συνεχής κατά την περίοδο της ωοτοκίας, αλλά συμβαίνει σε παλμούς μικρής διάρκειας (αμέσως μετά την απελευθέρωση της τελευταίας ομάδας ώριμων αβγών). Στην ωοθήκη υπάρχουν πάντα δύο ομάδες λεκιθικών ωοκυττάρων, εκτός από κάποιες ώρες πριν και μετά το συμβάν της ωοτοκίας. Ο χρόνος που απαιτείται για μία ομάδα λεκιθικών ωοκυττάρων να αναπτυχθεί, ωριμάσει και να απελευθερωθεί (ωορρηξία), είναι δύο φορές το διάστημα μεταξύ δύο διαδοχικών συμβάντων ωοτοκίας (inter-spawning interval).

Η στρατηγική των Κλουπεοειδών που είναι πολλαπλοί αποθέτες ποικίλει. Υπάρχουν είδη που βασίζουν την παραγωγή αβγών κατά κύριο λόγο στην αποθηκευμένη ενέργεια (capital breeders) έως είδη που βασίζουν την αναπαραγωγή τους αυστηρά στην ενέργεια που προσλαμβάνουν από την τροφή (income breeders) (Ganias et al. 2014, McBride et al. 2015). Ωστόσο, η στρατηγική πρόσληψης ενέργειας και διοχέτευσής της στην αναπαραγωγή μπορεί να αλλάζει σε κάποια είδη ανάλογα με τη φυσιολογική κατάσταση των ατόμων και τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είδους που αποθηκεύει ενέργεια για να αναπαραχθεί είναι η Ευρωπαϊκή σαρδέλα *Sardina pilchardus*. Στην περιοχή του κεντρικού Αιγαίου και του Ιονίου, η σαρδέλα ωοτοκεί τον χειμώνα χρησιμοποιώντας τα αποθέματα ενέργειας που είχε αποθηκεύσει κατά τους καλοκαιρινούς μήνες (Ganias et al. 2007, 2014). Υπάρχει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ του γοναδοσωματικού της δείκτη και του δείκτη σωματικής ευρωστίας. Ωστόσο, εκτός της αποθηκευμένης ενέργειας, η σαρδέλα μπορεί να χρησιμοποιεί και ενέργεια από την άμεση κατανάλωση τροφής για να υποστηρίξει την παραγωγή αβγών (Ganias 2009).

Σε είδη που είναι πιο κοντά στη στρατηγική του «εισοδηματία» (income breeding) όπως ο Μεσογειακός γαύρος *Engraulis encrasicolus*, η άμεση τροφοληψία πιστεύεται ότι είναι το κύριο καύσιμο που ξοδεύεται για την παραγωγή αβγών (Somarakis 2005, Somarakis et al. 2004b). Το συμπέρασμα αυτό βασίστηκε σε μελέτες που έγιναν στο Βόρειο και Κεντρικό Αιγαίο και το Ιόνιο τη δεκαετία του 90. Κατά την καλοκαιρινή αναπαραγωγική περίοδο του γαύρου, αυξανόταν τόσο ο γοναδοσωματικός του δείκτης όσο και ο δείκτης σωματικής

ευρωστίας. Ωστόσο, ενέργεια αποθηκευμένη με τη μορφή λίπους πριν την αναπαραγωγική περίοδο μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί και στο γούρο (Basilone et al. 2006). Σε άλλα αποθέματα όπως του *E. encrasicolus* στο Βισκαϊκό κόλπο (Pecquerie et al. 2009) και του *E. mordax* στην Καλιφόρνια (Hunter and Leong 1981) υπολογίστηκε ότι σχεδόν τα 2/3 της ενέργειας που απαιτείται για την παραγωγή αυγών προέρχεται από αποθηκευμένα αποθέματα.

Όταν η διαθεσιμότητα ενέργειας είναι επαρκής, ο ρυθμός λεκιθογένεσης και κατά συνέπεια η συχνότητα ωοτοκίας στους πολλαπλούς αποθέτες εξαρτάται από τη θερμοκρασία (Takasuka et al. 2005, Ganias et al. 2014). Έτσι στο γούρο που ωοτοκεί κατά τους καλοκαιρινούς μήνες το διάστημα ανάμεσα σε δύο συμβάντα ωοτοκίας είναι 2-4 μέρες (Schismenou et al. 2012, Uriarte et al. 2012) ενώ στη σαρδέλα που ωοτοκεί το χειμώνα είναι 9-11 μέρες (Ganias et al. 2014). Στο Βόρειο Αιγαίο, οι Somarakis et al. (2012) βρήκαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ειδικής ημερήσιας γονιμότητας (αριθμός αυγών ανά γραμμάριο αποθέματος) και της κατά κεφαλήν διαθεσιμότητας τροφής. Την ίδια περίοδο (2003-2008) βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στην γονιμότητα ομάδας (batch fecundity) από χρονιά σε χρονιά ή μεταξύ περιοχών.

1.4 Ο Ευρωπαϊκός γούρος

Ο Ευρωπαϊκός γούρος (*Engraulis encrasicolus*) είναι ένα από τα πιο κοινά και άφθονα είδη μικρών πελαγικών ψαριών, ιδιαίτερης οικονομικής σημασίας για την ελληνική αλιεία (Stergiou et al. 1997). Εκτός από τη Μεσόγειο κατανέμεται στη Μαύρη Θάλασσα και κατά μήκος των ανατολικών ακτών του Ατλαντικού, από τη Βόρεια Θάλασσα μέχρι τη νότια Αφρική.

Τα κύρια αποθέματα γούρου στη Μεσόγειο απαντώνται στη Βορειοδυτική Μεσόγειο, την Αδριατική και το Βόρειο Αιγαίο και είναι γενετικά διακριτά (Magoulas et al. 1996). Γενετικές διαφορές έχουν αναφερθεί επίσης μεταξύ των αποθεμάτων του Ιονίου και του Αιγαίου πελάγους (Magoulas et al. 1996). Ο γούρος, όπως και όλα τα μικρά πελαγικά ψάρια, χαρακτηρίζεται από μικρή διάρκεια ζωής (3-4 χρόνια), ωριμάζει αναπαραγωγικά όταν συμπληρώσει το πρώτο έτος της ζωής του και παράγει μεγάλο αριθμό αυγών (Somarakis et al. 2004b, 2006). Τα ενήλικα άτομα γούρου στο Βόρειο Αιγαίο τρέφονται κατά τη διάρκεια της ημέρας το καλοκαίρι, αλλά και τις πρώτες νυκτερινές ώρες το χειμώνα και καταναλώνουν ζωοπλαγκτονικούς οργανισμούς, κυρίως κωπήποδα και σε μικρότερο βαθμό κλαδοκεραιωτά και άλλα καρκινοειδή (Nikolioudakis et al. 2014). Τα κοπάδια του γούρου συναντώνται πιο

κοντά στην επιφάνεια κατά τη διάρκεια της νύχτας ενώ, κατά τη διάρκεια της μέρας, μετακινούνται προς μεγαλύτερα βάθη (Palomera et al. 2007; Tsagarakis et al. 2012).

Στη Μεσόγειο, η αναπαραγωγική περίοδος του γαύρου εκτείνεται, συνήθως, από το Μάιο μέχρι το Σεπτέμβρη (Somarakis et al. 2004b, 2018). Η μέγιστη αναπαραγωγική δραστηριότητα παρατηρείται κατά τον Ιούνιο-Ιούλιο (Somarakis et al. 2004b, 2006). Τα πεδία αναπαραγωγής σχετίζονται με περιόδους και περιοχές υψηλής παραγωγικότητας. Οι περιοχές αναπαραγωγής στο Β. Αιγαίο χαρακτηρίζονται από εκτεταμένη ηπειρωτική υφαλοκρηπίδα, ή/και περιοχές κλειστές ή ημίκλειστες, όπως ο Παγασητικός και ο Β. Ευβοϊκός κόλπος (Somarakis et al. 2012). Οι περιοχές αυτές έχουν σχετικά υψηλή παραγωγικότητα, σε αντίθεση με τον ιδιαίτερα ολιγοτροφικό χαρακτήρα του Αιγαίου (Somarakis et al. 2004b, 2012), καθώς και ιδιαίτερα υδρογραφικά και τοπογραφικά χαρακτηριστικά που ευνοούν την κατακράτηση των ιχθυονυμφών (Somarakis and Nikoliodakis 2007, Somarakis et al. 2018).

1.5 Περιοχή μελέτης

Η περιοχή μελέτης της παρούσας διατριβής περιλαμβάνει τη συνήθη περιοχή που πραγματοποιούνται οι ετήσιες αποστολές ακουστικής και πλαγκτονικής δειγματοληψίας (Somarakis et al. 2012) και περιλαμβάνει την υφαλοκρηπίδα της Λήμνου, το Θρακικό πέλαγος, το Στρυμονικό κόλπο, το Θερμαϊκό κόλπο, τις Β. Σποράδες και τους κόλπους της Χαλκιδικής. Βασικό υδρογραφικό χαρακτηριστικό της περιοχής είναι η εισροή νερού από τη Μαύρη Θάλασσα (Black Sea Water, BSW) μέσω των Δαρδανελίων. Το νερό της Μαύρης Θάλασσας είναι η κύρια πηγή νερού χαμηλής αλατότητας στο Β. Αιγαίο. Απόρροια της εισροής και της κίνησης του BSW είναι ο σχηματισμός ενός μόνιμου αντικυκλώνα που περιβάλλει τη Σαμοθράκη όπου εγκλωβίζεται μεγάλο μέρος του BSW (Zervakis and Georgopoulos 2002, Somarakis et al. 2002). Κάτω από το επιφανειακό στρώμα του BSW, το νερό έχει την τυπική θερμοκρασία και αλατότητα νερού προέλευσης Ν. Αιγαίου και Λεβαντινής. Καθώς το BSW κινείται προς τα δυτικά, εκτός του αντικυκλώνα της Σαμοθράκης συχνά σχηματίζεται και ένας δεύτερος αντικυκλώνας στο Στρυμονικό κόλπο (Somarakis and Nikolioudakis 2007) ενώ νοτίως της Θάσου σχηματίζεται ένα κυκλωνικό σύστημα (Somarakis et al. 2002). Εκτός από το BSW, η περιοχή επηρεάζεται και από πολλά ποτάμια όπως ο Έβρος, ο Νέστος και ο Στρυμόνας. Όλα τα παραπάνω συμβάλλουν στην αυξημένη πρωτογενή και δευτερογενή παραγωγικότητα (Isari et al. 2006, 2007).

Ο κόλπος του Θερμαϊκού είναι μια ρηχή, ημίκλειστη θαλάσσια περιοχή όπου εκβάλλουν αρκετά ποτάμια (Αξιός, Αλιάκμονας, Λουδίας, Γαλλικός και Πηνειός) που παίζουν ρόλο στον εμπλουτισμό του κόλπου με θρεπτικά και οργανικό υλικό. Η κυκλοφορία στο Θερμαϊκό είναι συνήθως αντικυκλωνική στο εσωτερικό του και κυκλωνική στην είσοδο του κόλπου (Somarakis and Nikolioudakis 2007).

Το Βόρειο Αιγαίο, λόγω του BSW και της εκροής των ποταμών, η συγκέντρωση θρεπτικών και οργανικού άνθρακα καθώς η αφθονία του φυτοπλαγκτού και ζωοπλαγκτού είναι κατά μια τάξη μεγέθους μεγαλύτερη σε σχέση με το Νότιο Αιγαίο και το Ιόνιο πέλαγος (Stergiou et al. 1997, Siokou-Frangou et al. 2002). Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης διαλυμένου και σωματιδιακού οργανικού άνθρακα, ένα μεγάλο μέρος της τροφικής ενέργειας διοχετεύεται μέσω της μικροβιακής αλυσίδας στα κωπήποδα (Siokou-Frangou et al. 2002), που αποτελούν την κύρια πηγή τροφής για το γαύρο (Nikolioudakis et al. 2014).

1.6 Σκοπός της μελέτης

Η περιοχή εξάπλωσης του αποθέματος γαύρου στο Βόρειο Αιγαίο είναι ιδιαίτερα ετερογενής όσον αφορά στις περιβαλλοντικές συνθήκες (παραγωγικότητα, ρεύματα, θερμοκρασία, αλατότητα κ.α.) που οφείλεται κυρίως στη εισροή και κίνηση του Νερού της Μαύρης θάλασσας (Somarakis et al. 2002, Isari et al. 2006). Επίσης, η παραγωγικότητα και οι αβιοτικές περιβαλλοντικές συνθήκες παρουσιάζουν μεγάλη μεταβλητότητα από έτος σε έτος την περίοδο Ιουνίου-Ιουλίου (μέγιστο της αναπαραγωγής του γαύρου) που οφείλεται σε διακυμάνσεις στις εκροές από τα Δαρδανέλια και τα ποτάμια και τις επικρατούσες κλιματικές συνθήκες στην ευρύτερη περιοχή την περίοδο του χειμώνα-άνοιξης (Somarakis et al. 2002, 2011, 2012, Isari et al. 2006, 2007). Κατά το παρελθόν έχουν παρατηρηθεί σημαντικές διακυμάνσεις στις αναπαραγωγικές παραμέτρους του γαύρου (π.χ. γονιμότητα, συχνότητα ωοτοκίας) τόσο τη δεκαετία του '90 (Somarakis 2005, Somarakis et al. 2004b) όσο και του 2000 (Somarakis et al. 2002) οι οποίες όμως δεν έχουν διερευνηθεί σε βάθος. Ιδιαίτερα την περίοδο 2003-2004 παρατηρήθηκε μία πυκνοεξαρτώμενη ρύθμιση της ειδικής ημερήσιας γονιμότητας (Somarakis et al. 2012), η παράμετρος όμως αυτή είναι συνάρτηση της γονιμότητας ομάδας, της συχνότητας ωοτοκίας, του μέσου βάρους θηλυκού και της αναλογίας φύλου και δεν αντανακλά ακριβώς την αναπαραγωγική κατάσταση στο επίπεδο του ατόμου.

Οι τελευταίες εκτιμήσεις του αναπαραγόμενου αποθέματος του γαύρου στο Βόρειο Αιγαίο που πραγματοποιήθηκαν το Ιούνιο-Ιούλιο 2014 και 2016 έδειξαν μία υπερδιπλάσια αύξηση της βιομάζας από 14000 t το 2014 σε 40000 t το 2016 (Σ. Σωμαράκης, αδημοσίευτα δεδομένα). Τα δείγματα από τις δύο αυτές χρονιές προσφέρονταν λοιπόν για τη διερεύνηση πιθανών πυκνοεξαρτώμενων επιδράσεων στην παραγωγή αβγών.

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η διερεύνηση πιθανών διακυμάνσεων στην παραγωγή αβγών του γαύρου που οφείλονται σε πυκνοεξαρτώμενη επίδραση και διαφορές στις βιοτικές και αβιοτικές συνθήκες από χρονιά σε χρονιά ή από περιοχή σε περιοχή.

Για το σκοπό αυτό αναπτύξαμε, για πρώτη φορά στην Ελλάδα και χρησιμοποιήσαμε επιτυχώς δύο σύγχρονες τεχνικές μελέτης της αναπαραγωγικής βιολογίας στα ψάρια που εφαρμόστηκαν για πρώτη φορά στο γαύρο του Βορείου Αιγαίου από τους Schismenou et al. (2012), αλλά σε εργαστήριο του IMR (Bergen, Norway).

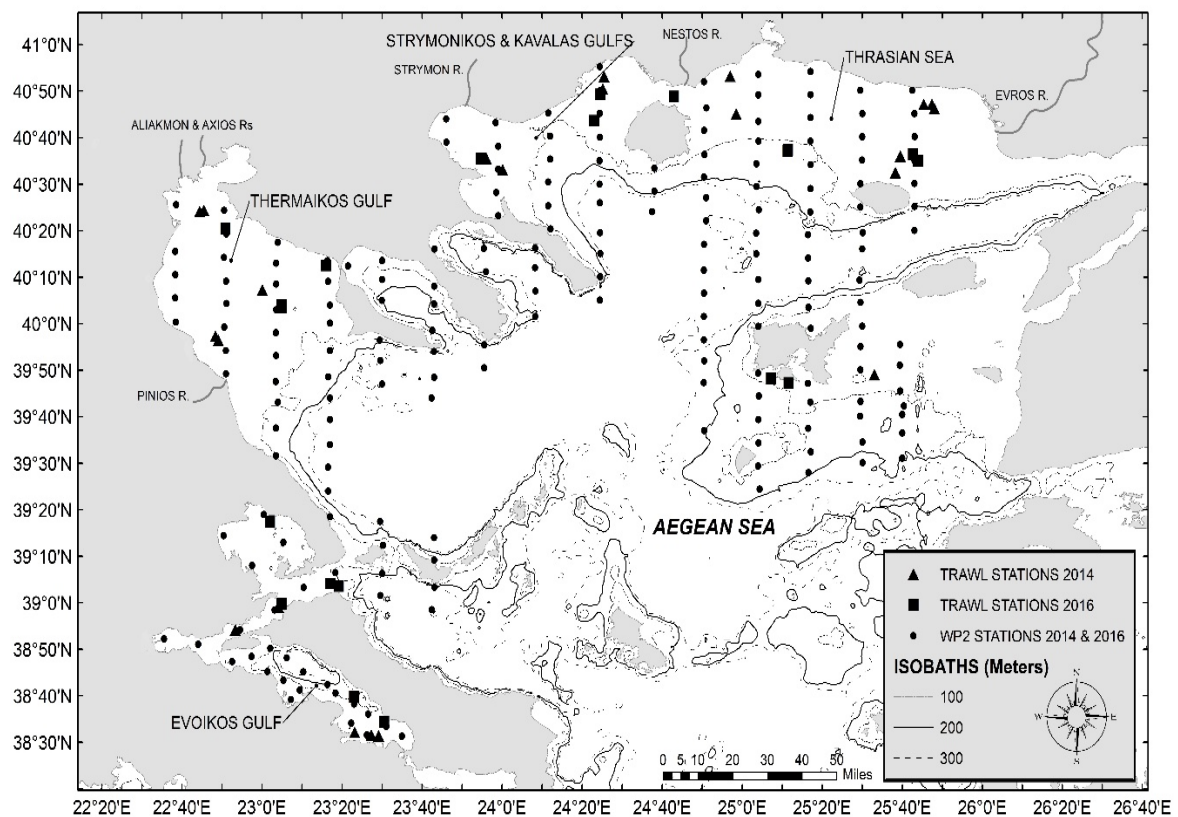
Η πρώτη τεχνική βασίζεται στο συνδυασμό της θεωρίας πακεταρίσματος ωοκυττάρων (Kurita and Kjesbu 2009) και στερεολογίας και επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό του αριθμού ωοκυττάρων ανά αναπτυξιακό στάδιο και ανά γραμμάριο γονάδας.

Η δεύτερη τεχνική ονομάζεται αυτοδιαμετρική μέθοδος (autodiametric method [Thorsen and Kjesbu 2001]) και επιτρέπει την ημι-αυτόματη και με μεγάλη ακρίβεια μέτρηση του αριθμού των ωοκυττάρων και της μέσης διαμέτρου κάθε ωοκυττάρου σε δείγματα από γοναδικό ιστό.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Συλλογή δειγμάτων μεσοζωοπλαγκτού, περιβαλλοντικών παραμέτρων και ενηλικών ατόμων γάβρου πραγματοποιήθηκε κατά την διάρκεια δύο ερευνητικών ταξιδιών τον Ιούνιο/Ιούλιο του 2014 και του 2016 στο πλαίσιο του Εθνικού Προγράμματος Συλλογής Αλιευτικών Δεδομένων (Somarakis et al. 2012). Τα δείγματα συλλέχθηκαν με το ερευνητικό σκάφος «ΦΙΛΙΑ» στο Βόρειο Αιγαίο και συγκεκριμένα από την περιοχή της Λήμνου ανατολικά, έως το Βόρειο Ευβοϊκό κόλπο, όπως φαίνεται στην Σχήμα 2.1.



Σχήμα 2.1. Χάρτης της περιοχής δειγματοληψίας για το 2014 και το 2016.

Figure 2.1. Map of the survey area for 2014 and 2016.

Δειγματοληψία μεσοζωοπλαγκτού

Για την συλλογή του μεσοζωοπλαγκτού χρησιμοποιήθηκε δειγματολήπτης με δύο κωνικά δίχτυα (WP2) με διάμετρο στεφάνης 50 cm και πόρο γάζας (mesh size) 200 μm . Οι σύρσεις ήταν κάθετες από τα 100 m βάθος, ή 5 m από τον πυθμένα όταν το βάθος του σταθμού ήταν μικρότερο, έως την επιφάνεια. Το σχέδιο δειγματοληψίας περιλάμβανε δίκτυο σταθμών τοποθετημένων σε απόσταση πέντε ναυτικών μιλίων μεταξύ τους (Εικόνα 2.1) τοποθετημένων σε κάθετες διατομές (transects). Η απόσταση μεταξύ των διατομών ήταν δέκα ναυτικά μίλια. Από τον κάθε σταθμό συλλέγονταν δύο δείγματα. Το πρώτο δείγμα, αφού φιλτράρονταν σε προζυγισμένα φίλτρα GF/A (47 mm, Whatman), καταψύχονταν άμεσα στους $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ για να χρησιμοποιηθεί μετέπειτα στο εργαστήριο για την εκτίμηση της βιομάζας με τη μέθοδο του ξηρού βάρους (dry weight), ενώ το δεύτερο μονιμοποιούνταν σε 4% διάλυμα φορμαλδεΰδης με βόρακα ($\text{pH} > 7.5$) για την εκτίμηση της αφθονίας και την ταυτοποίηση των ομάδων και των ειδών του μεσοζωοπλαγκτού (Somarakis 1999).

Παράλληλα με την δειγματοληψία του μεσοζωοπλαγκτού πραγματοποιήθηκε λήψη κατακόρυφων διατομών υδρογραφικών παραμέτρων (θερμοκρασίας, αλατότητας, πυκνότητας και φθορισμού) με τη χρήση θερμοσαλινογράφου συνεχούς καταγραφής (CTD, conductivity temperature depth) τύπου SBE-19 της Sea Bird Electronics, εφοδιασμένου με αισθητήρα φθορισμού. Το CTD ποντίζονταν σε κάθε σταθμό από την επιφάνεια μέχρι τα 100 m βάθος ή μέχρι τον πυθμένα όταν το βάθος του σταθμού ήταν μικρότερο. Οι σταθμοί CTD απείχαν μεταξύ τους δέκα ναυτικά μίλια και τις δύο χρονιές.

Δειγματοληψία ψαριών

Εκτός της δειγματοληψίας μεσοζωοπλαγκτού, πραγματοποιήθηκε ταυτόχρονη δειγματοληψία ψαριών με την χρήση μικρής πελαγικής τράτας (άνοιγμα 10 m και μάτι δίχτυου του σάκου 10 mm) (Σχήμα 2.1). Μετά από κάθε σύρση, από τα ψάρια που συλλέγονταν επιλέγονταν τυχαία ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα ενήλικών ατόμων γαύρου (τουλάχιστον 50) και τοποθετούνταν άμεσα σε παγωμένο θαλασσινό νερό (παγόνερο) για να διακοπεί η δράση των ενζύμων. Εν συνεχεία, από το δείγμα των ατόμων του γαύρου επιλέγονταν 20 – 25 θηλυκά έπειτα από διάνοιξη της σωματικής κοιλότητας και την ταυτοποίηση του φύλου. Από τα θηλυκά άτομα αφαιρούνταν οι ωοθήκες και μονιμοποιούνταν σε 4% διάλυμα φορμαλδεΰδης ουδετεροποιημένου με άλατα φωσφορικού νατρίου, ενώ το υπόλοιπο σώμα καταψύχθηκε σε ατομικά σακουλάκια για περαιτέρω επεξεργασία στο εργαστήριο.

2.2 Εργαστηριακή ανάλυση δειγμάτων

Ποσοτική ανάλυση μεσοζωοπλαγκτού

Στο εργαστήριο πραγματοποιήθηκε η ποσοτική ανάλυση των δειγμάτων του μεσοζωοπλαγκτού με την μέθοδο του ξηρού βάρους. Η εκτίμηση της ξηρής βιομάζας έγινε με την ξήρανση των φίλτρων που περιείχαν το δείγμα του μεσοζωοπλαγκτού σε κλίβανο στους 60 °C για χρονικό διάστημα 24 ωρών. Ακολούθησε η επαναζύγισή τους και ο υπολογισμός του καθαρού βάρους του σε γραμμάρια.

Επεξεργασία και αναλύσεις ψαριών

Στο εργαστήριο, η επεξεργασία των δειγμάτων του γαύρου περιελάμβανε την απόψυξή τους, τις μετρήσεις του ολικού μήκους (TL, mm), του ολικού βάρους (TW, 0.01 g) και του βάρους χωρίς εντόσθια (eviscerated weight, EW, 0.01 g) για κάθε άτομο χωριστά. Οι γονάδες, αφού ζυγίστηκαν (GW, 0.001 g), παρέμειναν στην φορμόλη για μετέπειτα ιστολογική ανάλυση και εκτίμηση της γονιμότητας. Συνολικά, εξετάστηκαν οι γονάδες 20 τυχαίων θηλυκών ανά σταθμό και επιπλέον, οι γονάδες που μακροσκοπικά φαινόταν να περιέχουν ώριμα αβγά (ενυδατωμένα) (Hunter et al. 1985).

Σε είδη με ασύγχρονη ανάπτυξη ωοκυττάρων (με συνεχή *de novo* λεκιθογένεση και πολλαπλή ωοτοκία κατά την διάρκεια της αναπαραγωγικής περιόδου), η μόνη δυνατή μέτρηση της γονιμότητας είναι η «γονιμότητα ομάδας» (batch fecundity). Η γονιμότητα ομάδας είναι ο αριθμός των αβγών που απελευθερώνονται από το θηλυκό σε ένα συγκεκριμένο συμβάν ωοτοκίας (Hunter et al. 1985). Για την εκτίμηση της γονιμότητας ομάδας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των ενυδατωμένων ωοκυττάρων (hydrated oocyte method), που είναι η απλούστερη, λιγότερο χρονοβόρος και περισσότερο ασφαλής μέθοδος. Τα ενυδατωμένα ωοκύτταρα μετρήθηκαν σε τρία υποδείγματα ιστού 40-60 mg (που περιείχαν 100-200 αβγά) ανά ψάρι, τα οποία προέρχονταν από το εμπρόσθιο, μεσαίο και οπίσθιο μέρος της γονάδας σύμφωνα με τη μέθοδο των Hunter et al. (1985). Στα *Engraulidae* η ενυδάτωση είναι μια σύντομη διαδικασία, η οποία αρχίζει μερικές ώρες πριν την ώρα της ωοτοκίας και ακολουθείται σχεδόν αμέσως από την ωορρηξία (ovulation). Η μέθοδος των ενυδατωμένων ωοκυττάρων εφαρμόστηκε σε άτομα με ενυδατωμένες (hydrated) γονάδες και όχι σε άτομα που βρίσκονταν στη φάση της ωορρηξίας (ovulated). Στον γαύρο, η πιθανότερη χρονική περίοδος εμφάνισης ενυδατωμένων θηλυκών είναι από αργά το απόγευμα έως νωρίς το βράδυ (Somarakis 1999).

Η ιστολογική ανάλυση περιελάμβανε την μικροσκοπική εξέταση και ταξινόμηση των ωοθηκών με βάση το αναπτυξιακό στάδιο της πιο προηγμένης ομάδας ωοκυττάρων και

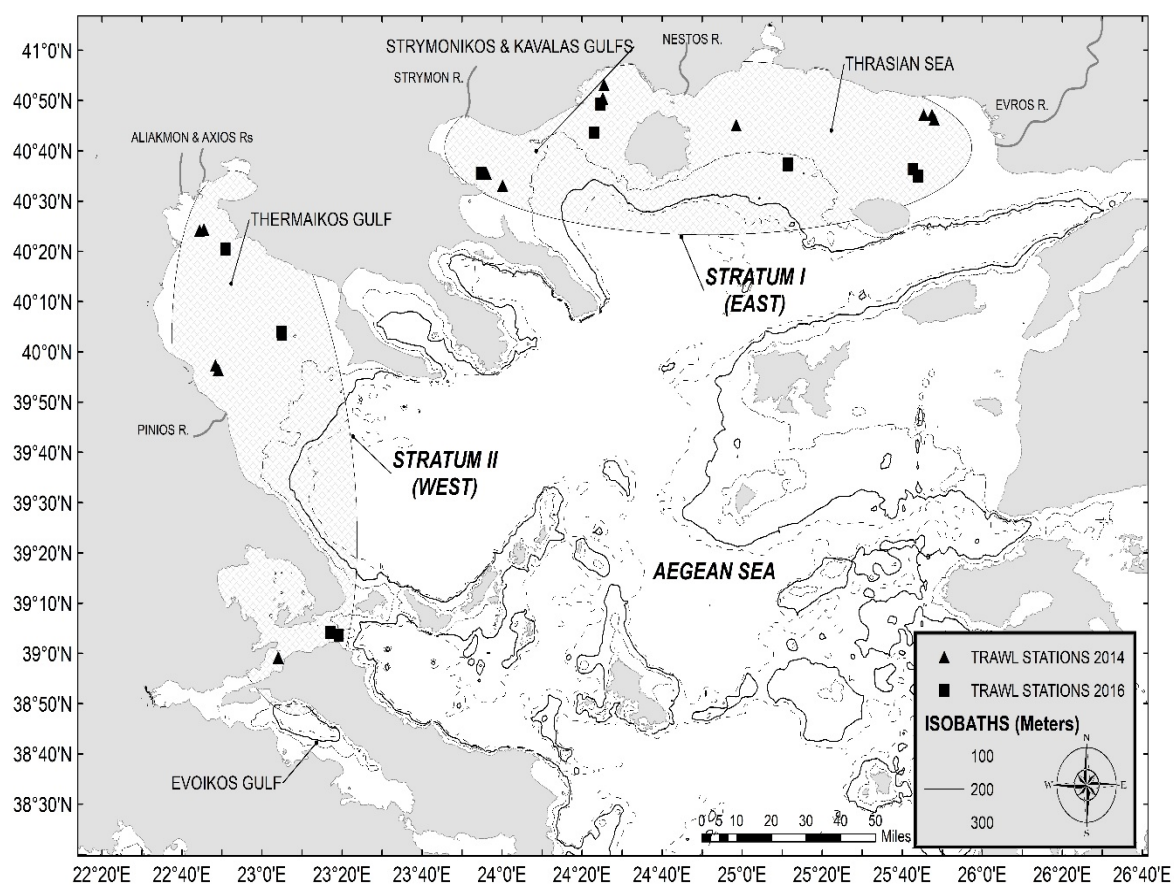
την παρουσία και τον βαθμό αποδιοργάνωσης των μετα-ωορρηξιακών (ή κενών) ωοθυλακίων (postovulatory follicles, POFs) (Πίνακας 2.1). Για την ιστολογική ανάλυση επιλέχθηκε ένα υπόδειγμα για το κάθε έτος, ήτοι 478 άτομα το 2014 και 379 το 2016. Η έγκλιση των γονάδων έγινε σε ρητίνη (Historesin) και η χρώση των τομών (4 μm) με τον συνδυασμό των χρωστικών κυανό του μεθυλενίου – βασικής φουξίνης. Το πρωτόκολλο της ιστολογικής τεχνικής που ακολουθήθηκε περιγράφεται στο Παράρτημα Α.

Εν συνεχεία, από τις ιστολογικές τομές εκτιμήθηκε η συχνότητα ωοτοκίας ή αλλιώς το κλάσμα των θηλυκών που ωοτοκούν ανά ημέρα, με την μέθοδο των κενών ωοθυλακίων (Somarakis et al. 2012). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή τα κενά ωοθυλάκια μπορούν να κατηγοριοποιηθούν, ανάλογα με τον βαθμό αποδιοργάνωσής τους, σε τρεις τύπους: α) ωοθυλάκια ημέρας μηδέν (POF-0), που αντιστοιχούν σε άτομα τα οποία έχουν απελευθερώσει τα ωοκύτταρα τους πρόσφατα (δηλ. το βράδυ της δειγματοληψίας) και δεν εμφανίζουν χαρακτηριστικά αποδιοργάνωσης, β) ωοθυλάκια πρώτης ημέρας (POF-1), που αντιστοιχούν σε θηλυκά που απελευθέρωσαν αβγά το προηγούμενο βράδυ (εμφανή χαρακτηριστικά αποδιοργάνωσης) και γ) ωοθυλάκια δεύτερης ημέρας (POF-2), που αντιστοιχούν σε άτομα που απελευθέρωσαν τα ωοκύτταρά τους δύο ημέρες πριν την δειγματοληψία (προχωρημένη αποδιοργάνωση). Παρενθετικά, οι ωοθυλακικές στοιβάδες είναι δομές που περικλείουν τα ωοκύτταρα κατά την ανάπτυξή τους και παραμένουν στην γονάδα μετά την απελευθέρωση των αβγών, ως μετα-ωορρηξιακά (κενά) ωοθυλάκια. Εκεί σταδιακά απορροφώνται και βάσει των χαρακτηριστικών της αποδιοργάνωσής τους μπορούν να χρονολογηθούν και να βρεθεί πότε πραγματοποιήθηκε το τελευταίο συμβάν ωοτοκίας (Somarakis et al. 2012). Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν κυρίως θηλυκά Ημέρας-1 (με POF-1, θηλυκά που ωοτόκησαν 22-26 ώρες πριν την σύλληψη τους, Somarakis et al. [2012]). Τα δείγματα που εξετάστηκαν διαχωρίστηκαν σε δύο υποπεριοχές (STRATUM 1 & 2), όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2.

Πίνακας 2.1. Γοναδικά στάδια (GONAD) και αντίστοιχα στάδια προηγμένης ομάδας ωοκυττάρων (OOCYTE). POFs: κενά ωοθυλάκια. Παρουσιάζονται και οι αντίστοιχες γοναδικές φάσεις, όπως έχουν οριστεί από τους Brown-Peterson et al. (2011)

Table 2.1. Ovarian stages (GONAD) and respective stages of the most advanced batch of oocytes (OOCYTE). POFs: postovulatory follicles. Corresponding ovarian phases, as defined in Brown-Peterson et al. (2011), are also indicated.

Ovarian phase	Ovarian stage (GONAD)	Advanced oocyte stage (OOCYTE)
Immature	Primary growth, PG	PG, ellipsoid primary growth oocytes with homogenous cytoplasm
Developing	Yolk vesicle, CA	CA, previtellogenic oocytes with yolk vesicles or cortical alveoli formed
Developing	Early vitellogenic, EVTO	EVTO, early vitellogenic oocytes with yolk granules in the periphery of cytoplasm
Spawning capable	Vitellogenic, VTO	VTO, vitellogenic oocytes with yolk granules all over the cytoplasm
Spawning capable	Late vitellogenic, MN	MN, fully vitellogenic oocytes with migrating nucleus
Spawning capable	Hydrated, HYD	HYD, hydrated oocytes
Spawning capable	Day-0, with POFs-0 (spawned the night of sampling)	VTO, vitellogenic oocytes with yolk granules all over the cytoplasm
Spawning capable	Day-1, with POFs-1 (spawned the previous night)	VTO, vitellogenic oocytes with yolk granules all over the cytoplasm
Spawning capable	Day-2, with POFs-2 (spawned two nights before sampling)	VTO or MN, fully vitellogenic oocytes or with initial nucleus migration



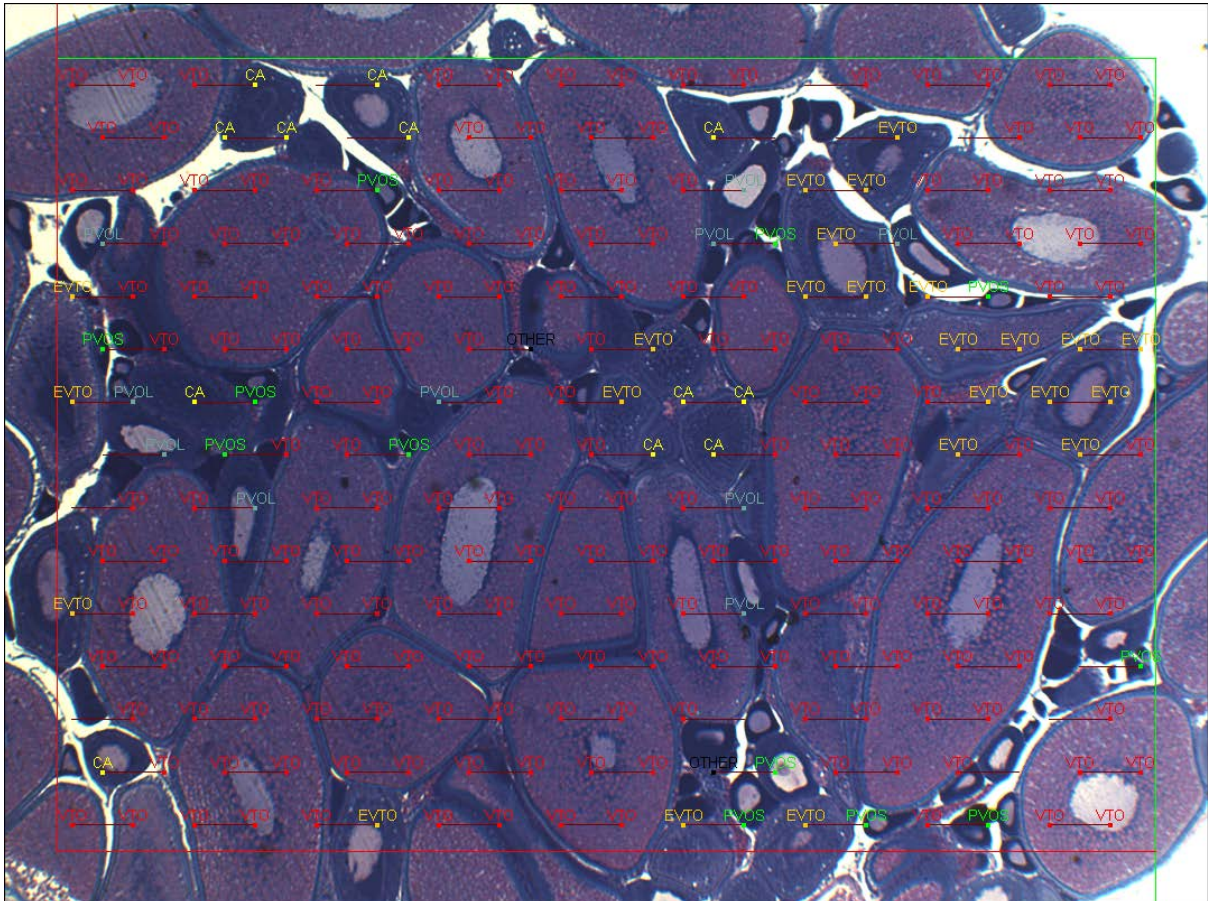
Σχήμα 2.2. Χάρτης της περιοχής έρευνας που δείχνει τον διαχωρισμό των υπό εξέταση δειγμάτων σε δύο υποπεριοχές (Ανατολική [STRATUM I] και Δυτική [STRATUM II]).

Figure 2.2. Map of the survey area showing the stratification of the examined samples in two sub-regions (East [STRATUM I] and West [STRATUM II]).

2.3 Στερεολογική ανάλυση

Η εκτίμηση του κλάσματος όγκου των ωοκυττάρων κάθε σταδίου i (V_{Vi}) στη γονάδα έγινε στερεολογικά σε ιστολογικές τομές 70 θηλυκών Ημέρας-1 (POF-1), βάσει της αρχής Delesse, σύμφωνα με την οποία το κλάσμα επιφάνειας ισούται με το κλάσμα όγκου (Howard and Reed 1998). Για τη στερεολογική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ένα πλέγμα 256 σημείων και 5 κατηγορίες ανά άτομο (Korta et al. 2010), όπως φαίνεται στην Σχήμα 2.3. Το σύνολο των σημείων που καταμετρήθηκαν ανά κατηγορία κυμαίνονταν από 111 (για τα μικρά προλεκιθικά ωοκύτταρα, PVOS) έως 2374 (για τα λεκιθικά ωοκύτταρα, VTO). Σε κάθε γονάδα το V_{Vi} εκτιμήθηκε για κάθε ωοκυτταρικό στάδιο που υπήρχε στη γονάδα (από τα

μικρά προλεκιθικά ωοκύτταρα PVOS, τα μεγάλα προλεκιθικά PVOL, τα ωοκύτταρα με κυστίδια λεκίθου ή cortical alveoli CA, τα μερικώς λεκιθικά EVTO, έως τα λεκιθικά VTO), καθώς και για την κατηγορία ‘other’ που περιλάμβανε το τοίχωμα της γονάδας, το στρώμα και τα μετα-ωορρηξιακά ωοθυλάκια. Το V_V ήταν το άθροισμα των V_{Vi} από τα μικρά προλεκιθικά (PVOS) έως τα λεκιθικά ωοκύτταρα (VTO).



Σχήμα 2.3. Μικροφωτογραφία ιστολογικής τομής ωοθήκης με λεκιθικά ωοκύτταρα κατά τη στερεολογική ανάλυση. Παρουσιάζεται το πλέγμα των 256 σημείων. Τα διαφορετικά χρώματα των σημείων αντιστοιχούν στις 5 διαφορετικές κατηγορίες των αναπτυξιακών σταδίων των ωοκυττάρων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

Figure 2.3. Microphotograph of histological section of a gonad with vitellogenic oocytes during stereological analysis. The 256 grid is presented. Different colors of point numbers represent different oocyte developmental stages.

Στις ίδιες ιστολογικές τομές, μετρήθηκαν η μεγάλη και η μικρή διάμετρος σε 2-15 από τα μεγαλύτερα ωοκύτταρα κάθε σταδίου i , από PVOS έως VTO για κάθε θηλυκό. Οι μετρήσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της διαμέτρου κάθε ωοκυττάρου

($OD(ind) = (L+S)/2$), του λόγου L/S , της μέσης διαμέτρου (OD_{Vi}) και της αριθμητικής μέσης διαμέτρου (OD_{Ni}) των ωοκυττάρων ανά στάδιο i (Kurita & Kjesbu 2009, Korta et al. 2010):

$$OD_{Vi} = \left[\sum_{j=1}^{n_i} \left(\frac{(OD_{(ind)ij})^3}{n_i} \right) \right]^{\frac{1}{3}}, \quad OD_{Ni} = \sum_{j=1}^{n_i} \frac{OD_{(ind)ij}}{n_i}$$

Κατόπιν, η μέση διάμετρος (OD_V) και η αριθμητική μέση διάμετρος (OD_N) όλων των ωοκυττάρων στη γονάδα, ζυγισμένες με τις OPD_i , εκτιμήθηκαν για κάθε θηλυκό:

$$OD_V = \left[\sum_i \left(\frac{OD_{Vi}^3 \times OPD_i}{OPD} \right) \right]^{\frac{1}{3}}, \quad OD_N = \sum_i \frac{OD_{Ni} \times OPD_i}{OPD}$$

2.4 Μέθοδος πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων (OPD)

Η OPD εκτιμήθηκε θεωρητικά (Kurita & Kjesbu 2009) για κάθε στάδιο ωοκυττάρων που υπήρχε στη γονάδα σε ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα 70 γονάδων (35 γονάδες για το κάθε έτος). Επιπλέον, η OPD υπολογίστηκε και βαρυμετρικά (OPD_N) σύμφωνα με τους Thorsen & Kjesbu (2001) στο ίδιο δείγμα των 70 γονάδων για λόγους σύγκρισης με την αυτοδιαμετρική μέθοδο (autodiametric method, βλέπε παρακάτω): ένα υπόδειγμα ιστού από την γονάδα ζυγίστηκε και σε αυτό καταμετρήθηκαν όλα τα ωοκύτταρα με μεγάλη διάμετρο $>300\mu\text{m}$ και καταγράφηκαν η μεγάλη και μικρή διάμετρος τους.

Η εκτίμηση της θεωρητικής OPD έγινε βάση της εξίσωσης των Kurita & Kjesbu (2009), δηλ. οι εκτιμήσεις πραγματοποιήθηκαν ξεχωριστά για κάθε αναπτυξιακό στάδιο των ωοκυττάρων (στάδιο i):

$$OPD_i = V_{Vi} \times \left(\frac{1}{\rho_0} \right) \times \left[\frac{(1+k)^3}{8 \times k} \right] \times 10^{12} \times \left(\frac{6}{\pi} \right) \times OD_{Vi}^{-3}$$

ή μετά από τον λογαριθμικό μετασχηματισμό της (Korta et al. 2010):

$$\log(OPD_i) = \log \left[V_{Vi} \times \left(\frac{1}{\rho_o} \right) \times \left\{ \frac{(1+k^3)}{8 \times k} \right\} \right] + 12.28 - 3 \times \log(OD_{Vi})$$

όπου, OPD_i = αριθμός των ωοκυττάρων σταδίου i ανά γραμμάριο γονάδας

V_{Vi} = κλάσμα όγκου των ωοκυττάρων σταδίου i

ρ_o = πυκνότητα της γονάδας, $g\ cm^{-3}$

k = μέσος λόγος της μεγάλης (L) προς τη μικρή (S) διάμετρο των ωοκυττάρων σταδίου i

OD_{Vi} = μέση διάμετρος ωοκυττάρων σταδίου i , ογκομετρικά υπολογισμένη, μm

Το άθροισμα των OPD_i όλων των ωοκυτταρικών σταδίων στη γονάδα ισούταν με τον ολικό αριθμό των ωοκυττάρων ανά γραμμάριο γονάδας (OPD).

Εκτίμηση εξισώσεων διόρθωσης λόγω συρρίκνωσης των ωοκυττάρων

Οι μετρήσεις διαμέτρου (L, S) που πραγματοποιήθηκαν στις ιστολογικές τομές διορθώθηκαν για τη συρρίκνωση που υφίστανται κατά την ιστολογική επεξεργασία ώστε να αντιπροσωπεύουν διαστάσεις ωοκυττάρων συντηρημένων στη φορμόλη. Οι εξισώσεις που προέκυψαν, εκτιμήθηκαν από τους Schismenou et al. (2012) στην γενική τους μορφή, περιλάμβαναν το ωοκυτταρικό στάδιο ως κατηγορική μεταβλητή και χρησιμοποιήθηκαν για τη μετατροπή των ιστολογικών διαμέτρων σε διαμέτρους ωοκυττάρων συντηρημένων σε φορμόλη:

$$L = 146.008 + 0.851 \times L_H + 1 \times (\text{Stage}=\text{PG}) + 25.922 \times (\text{Stage}=\text{CA}) + 109.598 \times (\text{Stage}=\text{EVTO}) + 99.668 \times (\text{Stage}=\text{VTO}) + 72.010 \times (\text{Stage}=\text{MN}) + 163.778 \times (\text{Stage}=\text{HYD})$$

και

$$S = 50.716 + 0.871 \times S_H + 1 \times (\text{Stage}=\text{PG}) + 14.999 \times (\text{Stage}=\text{CA}) + 78.781 \times (\text{Stage}=\text{EVTO}) + 75.711 \times (\text{Stage}=\text{VTO}) + 71.744 \times (\text{Stage}=\text{MN}) + 150.597 \times (\text{Stage}=\text{HYD})$$

Στην παρούσα μελέτη τα δύο τελευταία γινόμενα, που αναφέρονται στα στάδια των ωοκυττάρων με μετανάστευση πυρήνα (MN) και ενυδατωμένων ωοκυττάρων (HYD), και από τις δύο εξισώσεις παραλήφθηκαν εξαιτίας της απουσίας των συγκεκριμένων ωοκυτταρικών σταδίων στις γονάδες των θηλυκών Ημέρας-1.

Υπολογισμός του σχετικού αριθμού των ωοκυττάρων στην γονάδα

Αρχικά, υπολογίστηκε ο αριθμός των ωοκυττάρων σταδίου i σε κάθε γονάδα από το OPDi (βλ. § 2.4) και το βάρος της γονάδας ως εξής:

$$N_i = OPD_i \times GW_{FORMALIN}$$

Το βάρος της γονάδας όμως, εκτός από το γοναδικό στάδιο (μέσο μέγεθος ωοκυττάρου), και τη γονιμότητα, εξαρτάται και από το μέγεθος του ψαριού (Jons & Miranda 1997, Somarakis et al. 2004b). Υπολογίστηκε λοιπόν ο σχετικός αριθμός των ωοκυττάρων σταδίου i από τον λόγο του αριθμού των ωοκυττάρων σταδίου i σε κάθε γονάδα προς το βάρος του θηλυκού χωρίς τις γονάδες, σύμφωνα με τον τύπο:

$$RN_i = \frac{N_i}{GFW^b}$$

όπου: RN_i : σχετικός αριθμός ωοκυττάρων σταδίου i

i : το ωοκυτταρικό στάδιο (PVOS, PVOL, CA, EVTO, VTO)

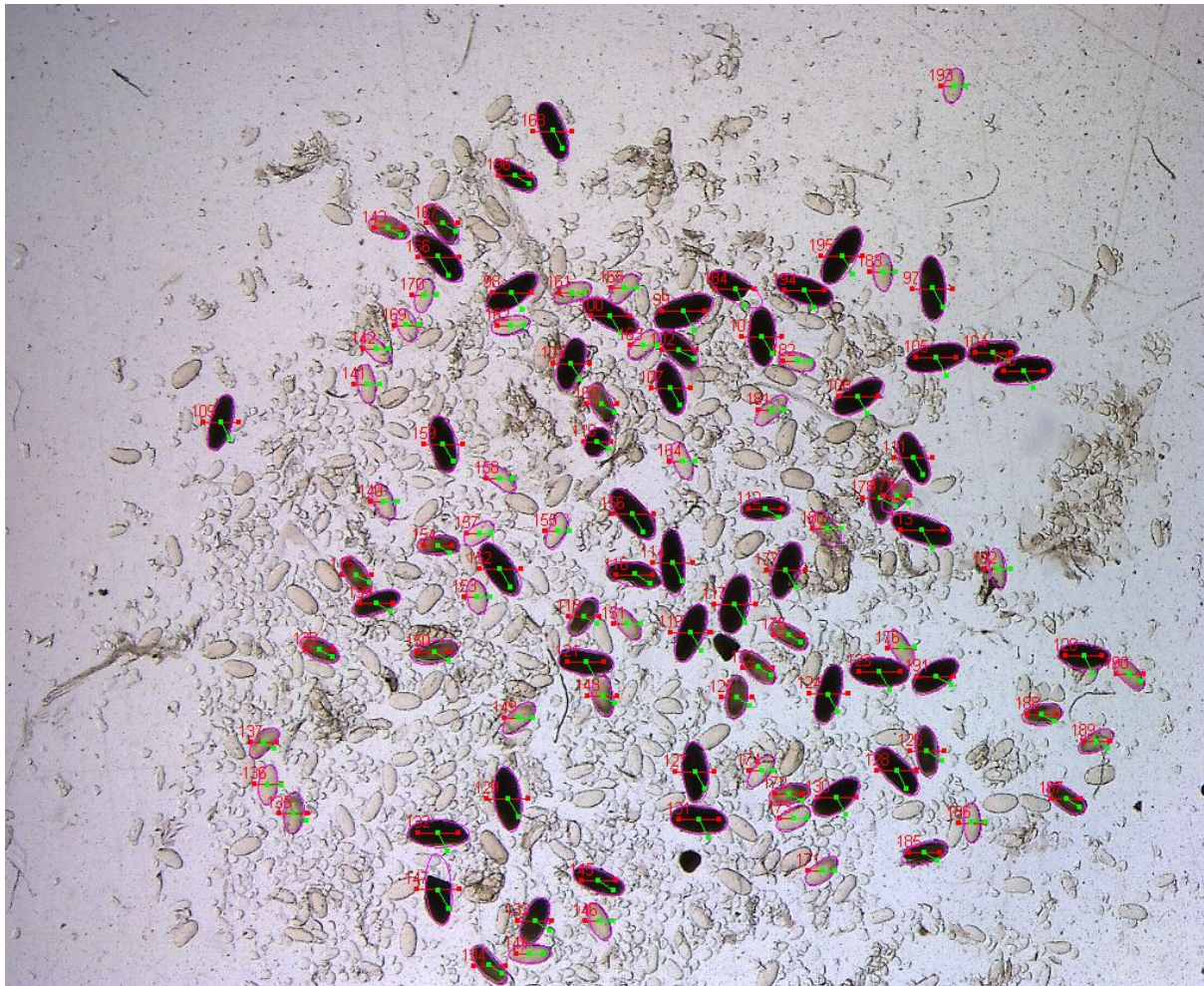
N_i : αριθμός ωοκυττάρων σταδίου i

GFW : βάρος του θηλυκού χωρίς γονάδες

b : συντελεστής αλλομετρίας μεταξύ N_i και GFW

2.6 Αυτοδιαμετρική μέθοδος (autodiametric method)

Σε υπόδειγμα ιστού από τις μονιμοποιημένες γονάδες μετρήθηκαν οι διάμετροι των ωοκυττάρων σε φωτογραφίες (ανάλυσης: $0.1596 \text{ pixels } \mu\text{m}^{-1}$) που τραβήχτηκαν με κάμερα (Leica MC170 HD) στερεωμένη σε στερεοσκόπιο (Leica M80) με διερχόμενο φωτισμό. Τα ωοκύτταρα μετρήθηκαν ημιαυτόματα χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) συνδυασμένο με το ObjectJ (<http://simon.bio.uva.nl/objectj/>) (Σχήμα 2.4). Αρχικά μετρήθηκαν αυτόματα τα μεγάλα λεκιθικά (σκούρα) ωοκύτταρα και στη συνέχεια μετρήθηκαν χειροκίνητα τα εναπομείναντα ωοκύτταρα (κυρίως διάφανα ανώριμα ωοκύτταρα) με μεγάλη διάμετρο πάνω από $300 \mu\text{m}$. Καταγραφήκαν η μεγάλη (L) και η μικρή (S) διάμετρος των ωοκυττάρων. Επίσης, από τις μετρήσεις ωοκυττάρων σε υποδείγματα ιστού, εκτιμήθηκε η μέση τιμή διαμέτρου για τα 20 μεγαλύτερα ωοκύτταρα ανά γονάδα (L20). Καθώς τα ωοκύτταρα του γαύρου, σε αντίθεση με τα περισσότερα είδη ψαριών, είναι ωοειδή το λογισμικό που χρησιμοποιούνταν μέχρι τότε επανασχεδιάστηκε και είναι διαθέσιμο στην ηλεκτρονική διεύθυνση: <http://simon.bio.uva.nl/objectj/examples/oocytes/Oocytes.htm>.



Σχήμα 2.4. Απεικόνιση των ωοκυττάρων γάυρου σε υπόδειγμα ιστού μετά από ημιαυτόματες μετρήσεις όλων των ωοκυττάρων με μεγάλη διάμετρο >300 μm (καταμετρημένα ωοκύτταρα με σχεδιασμένο περίγραμμα).

Figure 2.4. Appearance of anchovy oocytes in a tissue subsample after performing semi-automatic measurements for all oocytes with long diameter >300 μm (numbered oocytes with drawn outline)

2.7 Δείκτης σωματικής ευρωστίας (Somatic condition factor)

Η ευρωστία ενός ψαριού εκφράζεται με το δείκτη ευρωστίας (condition factor) που περιγράφει την κατάσταση ενός ψαριού. Για τον προσδιορισμό του δείκτη ευρωστίας των ώριμων θηλυκών ατόμων του γάυρου χρησιμοποιήθηκε ο σχετικός δείκτης ευρωστίας (relative condition factor):

$$CF = GFW/TL^b$$

όπου:

CF: ο δείκτης ευρωστίας

GFW: το βάρος του θηλυκού χωρίς γονάδες (g)

TL: το ολικό μήκος (mm)

b: η κλίση της αλλομετρικής εξίσωσης που συνδέει το GFW με το TL.

2.8 Στατιστική ανάλυση

Ο έλεγχος ύπαρξης διαφορών μεταξύ των ετών (2014 & 2016) και των υποπεριοχών (STRATUM I & II) στις περιβαλλοντικές συνθήκες (θερμοκρασία, αλατότητα, φθορισμό, βιομάζα μεσοζωοπλαγκτού), στα χαρακτηριστικά των ενηλίκων (δείκτης σωματικής ευρωστίας και μέσο μέγεθος θηλυκών) καθώς και στη σχετική γονιμότητα, τους σχετικούς αριθμούς ωοκυττάρων και το μέγεθος των ωοκυττάρων (L20) πραγματοποιήθηκε με πολυπαραγοντική ανάλυση διακύμανσης (two-way ANOVA) (Zar, 2009). Στην περίπτωση που δεν υπήρχε ομογένεια των διασπορών (Leneve's test, $p < 0.05$) η εξαρτημένη μεταβλητή μετασχηματίστηκε λογαριθμικά, ώστε να επιτευχθεί ομογένεια.

Η γονιμότητα σχετίστηκε με το GFW με γραμμική παλινδρόμηση μετά από λογαριθμικό μετασχηματισμό των δύο μεταβλητών ώστε να βελτιωθούν οι ιδιότητες των υπολειπόμενων σφαλμάτων (τυχαία κατανομή, ομοσκεδαστικότητα) (Zar, 1999).

Τέλος το μέγεθος των ωοκυττάρων σχετίστηκε με τη θερμοκρασία, το μέγεθος των θηλυκών και τη βιομάζα του μεσοζωοπλαγκτού με πολλαπλή γραμμική παλινδρόμηση. Και σ' αυτή την περίπτωση, οι δύο τελευταίες μεταβλητές χρειάστηκε να λογαριθμθούν για να τηρούνται οι παραδοχές της γραμμικής παλινδρόμησης (τυχειότητα και ομοσκεδαστικότητα των υπολειπόμενων σφαλμάτων).

Στους Πίνακες 2.3 και 2.4 δίνονται συνοπτικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη όπως, μεταξύ άλλων, ο αριθμός θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν στην στερεολογική ανάλυση (N_S) και ο αριθμός θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν στην αυτοδιαμετρική μέθοδο (N_{AM}).

Πίνακας 2.1. Ερευνητικό ταξίδι 2014. Ημερομηνία, γεωγραφικές συντεταγμένες, ώρα συλλογής και δεδομένα παραμέτρων των ενηλίκων (μέσο βάρος ώριμου θηλυκού W, αναλογία φύλου R, γονιμότητα ομάδας F και κλάσμα των ώριμων θηλυκών που ωοτόκησαν την προηγούμενη ημέρα S). N_T: Ολικός αριθμός ατόμων που εξετάστηκαν, N_F: Ολικός αριθμός θηλυκών που εξετάστηκαν, N_H: Αριθμός θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν στην ιστολογική ανάλυση, N_S: Αριθμός θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν στην στερεολογική ανάλυση και N_{AM}: Αριθμός θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν στην αυτοδιαμετρική μέθοδο.

Table 2.2. Sampling survey 2014. Date, geographical coordinates, time of sampling and data for spawning parameters of mature anchovies (average weight of mature female W, weight specific sex ratio R, batch fecundity F and spawning fraction of mature female S). N_T: Total number of fish examined, N_F: Total number of females examined, N_H: Number of fish used in histological analysis, N_S: Number of fish used in stereological analysis, N_{AM}: Number of fish used in auto-diametric method.

Sample	Date	Longitude	Latitude	Time	W	R	F	S	N _T	N _F	N _H	N _S	N _{AM}
1	3/6/2014	25° 33' 03"	39° 49' 03"	22:28	17.89	0.51	7363	0.56	69	18	18	-	-
2	7/6/2014	24° 00' 08"	40° 33' 08"	00:09	8.71	0.82	3746	0.15	30	25	20	3	3
3	8/6/2014	23° 56' 03"	40° 35' 33"	14:03	7.71	0.58	3315	0.10	35	20	20	2	2
4	8/6/2014	24° 25' 29"	40° 53' 11"	22:17	7.15	0.56	2985	0.35	41	25	20	3	3
5	8/6/2014	24° 25' 10"	40° 50' 28"	00:53	6.53	0.51	2760	0.30	39	22	20	2	2
6	28/6/2014	24° 58' 30"	40° 45' 06"	23:15	9.93	0.35	4178	0.55	64	25	20	5	5
7	29/6/2014	24° 57' 00"	40° 53' 14"	12:30	8.44	0.46	3573	0.05	45	20	20	-	-
8	30/6/2014	25° 38' 17"	40° 32' 31"	22:30	12.81	0.60	5438	0.55	39	25	20	-	-
9	30/6/2014	25° 39' 32"	40° 36' 03"	00:33	12.20	0.58	5181	0.35	36	21	20	-	-
10	2/7/2014	25° 47' 24"	40° 47' 10"	21:45	7.99	0.46	3353	0.40	51	25	20	1	1
11	2/7/2014	25° 45' 22"	40° 47' 09"	23:18	7.99	0.72	3352	0.35	29	20	20	2	2
12	3/7/2014	25° 48' 02"	40° 46' 18"	21:50	6.66	0.35	2809	0.25	62	24	20	2	2
13	10/7/2014	22° 49' 07"	39° 56' 27"	23:02	7.17	0.39	2996	0.25	57	24	20	3	3
14	10/7/2014	22° 48' 21"	39° 57' 19"	00:50	7.68	0.24	3180	0.35	93	24	20	2	2
15	11/7/2014	22° 45' 31"	40° 24' 23"	22:33	6.00	0.38	2513	0.55	55	24	20	3	3
16	11/7/2014	22° 44' 25"	40° 24' 08"	00:23	6.22	0.42	2585	0.35	53	24	20	2	2
17	12/7/2014	23° 00' 06"	40° 07' 15"	22:46	9.33	0.54	3953	0.10	41	21	20	-	-
18	15/7/2014	23° 04' 00"	38° 59' 06"	22:01	6.34	0.44	2698	0.70	51	24	20	3	3
19	15/7/2014	23° 04' 10"	38° 59' 08"	23:48	6.32	0.83	2658	0.20	28	23	20	2	2
20	16/7/2014	22° 53' 20"	38° 54' 12"	13:58	-	-	-	-	68	-	-	-	-
21	19/7/2014	23° 29' 10"	38° 31' 26"	22:05	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	19/7/2014	23° 23' 10"	38° 32' 10"	23:45	11.95	0.56	5056	0.75	39	22	20	-	-
23	19/7/2014	23° 27' 19"	38° 31' 35"	01:23	11.63	0.91	4927	0.75	36	22	20	-	-

Πίνακας 2.2. Ερευνητικό ταξίδι 2016. Ημερομηνία, γεωγραφικές συντεταγμένες, ώρα συλλογής και δεδομένα παραμέτρων των ενηλίκων (μέσο βάρος ώριμου θηλυκού W, αναλογία φύλου R, γονιότητα ομάδας F και κλάσμα των ώριμων θηλυκών που ωοτοκούν κάθε ημέρα S). N_T: Ολικός αριθμός ατόμων που εξετάστηκαν, N_F: Ολικός αριθμός θηλυκών που εξετάστηκαν, N_H: Αριθμός θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν στην ιστολογική ανάλυση, N_S: Αριθμός θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν στην στερεολογική ανάλυση και N_{AM}: Αριθμός θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν στην αυτοδιαμετρική μέθοδο.

Table 2.2. Sampling survey 2016. Date, geographical coordinates, time of sampling and data for spawning parameters of mature anchovies (average weight of mature female W, weight specific sex ratio R, batch fecundity F and spawning fraction of mature females S). N_T: Total number of fish examined, N_F: Total number of female fish examined, N_H: Number of fish used in histological analysis, N_S: Number of fish used in stereological analysis, N_{AM}: Number of fish used in auto-diametric method.

Sample	Date	Longitude	Latitude	Time	W	R	F	S	N _T	N _F	N _H	N _S	N _{AM}
1A	2/6/2016	25° 11' 36"	39° 47' 13"	22:53	21.19	0.44	10846	0.00	33	14	13	-	-
1B	2/6/2016	25° 07' 14"	39° 48' 18"	00:45	11.98	0.43	4407	0.50	44	19	19	-	-
2	6/6/2016	25° 42' 42"	40° 36' 24"	22:48	19.49	0.59	9803	0.00	25	14	14	-	-
3	6/6/2016	25° 43' 54"	40° 35' 01"	00:09	8.93	0.48	2482	0.42	50	26	20	3	3
4	12/6/2016	25° 11' 26"	40° 37' 21"	22:22	8.10	0.81	1981	0.50	51	40	21	2	2
5	12/6/2016	25° 11' 22"	40° 48' 50"	00:19	12.89	0.48	5404	0.45	50	24	19	4	4
6	13/6/2016	24° 42' 56"	40° 49' 17"	22:34	12.21	0.29	4709	0.45	83	26	20	1	1
7	15/6/2016	24° 24' 34"	40° 43' 38"	21:49	9.73	0.72	3060	0.23	49	35	20	-	-
8	15/6/2016	24° 23' 03"	40° 35' 33"	23:28	9.15	0.73	3041	0.24	50	36	20	3	3
9	17/6/2016	23° 54' 43"	40° 20' 27"	22:14	11.83	0.28	4431	0.50	85	25	20	2	2
10	22/6/2016	22° 50' 53"	40° 12' 32"	22:53	11.25	0.49	4082	0.46	57	29	20	5	5
11	24/6/2016	23° 16' 02"	40° 03' 34"	23:47	7.53	0.31	2426	0.50	72	21	20	5	5
12	25/6/2016	23° 04' 59"	40° 04' 01"	23:18	8.27	0.28	2866	0.33	83	23	20	-	-
13	26/6/2016	23° 04' 54"	39° 03' 39"	01:02	10.13	0.64	4052	0.27	50	32	20	3	3
14	28/6/2016	23° 19' 11"	39° 04' 10"	22:39	9.73	0.52	3748	0.24	51	27	20	2	2
15	28/6/2016	23° 17' 06"	39° 17' 26"	00:09	6.42	0.38	1836	0.42	56	21	20	3	3
16	30/6/2016	23° 02' 01"	38° 59' 45"	08:55	6.47	0.21	1864	0.48	100	21	20	2	2
17	30/6/2016	23° 04' 57"	38° 39' 53"	14:40	5.08	0.34	1161	0.26	71	25	20	-	-
18	2/7/2016	23° 23' 02"	38° 34' 23"	20:08	5.66	0.47	1391	0.38	51	24	20	-	-

3. Αποτελέσματα

3.1 Περιβαλλοντικές συνθήκες

Οι μέσες τιμές της θερμοκρασίας, της αλατότητας, του φθορισμού και της βιομάζας του μεσοζωοπλαγκτού παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1. και τα αποτελέσματα των στατιστικών συγκρίσεων μεταξύ των ετών και των υποπεριοχών (ανάλυση διακύμανσης [ANOVA]) στον Πίνακα 3.2. Το 2014 η επιφανειακή θερμοκρασία (5m) κυμάνθηκε μεταξύ 19.96 και 25.70 °C με τις μικρότερες τιμές να παρατηρούνται στην Ανατολική υποπεριοχή (STATUM I) και τις μεγαλύτερες στην Δυτική (STRATUM II) (Πίνακας 3.1). Το 2016 η επιφανειακή θερμοκρασία κυμάνθηκε μεταξύ 20.21 και 26.42 °C με τις μικρότερες τιμές να παρατηρούνται και πάλι στην Ανατολική υποπεριοχή. Οι χάρτες οριζόντιας κατανομής της θερμοκρασίας φαίνονται στο Σχήμα 3.2. Το πρότυπο της οριζόντιας κατανομής ήταν παρόμοιο και για τα δύο έτη. Η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη μέση επιφανειακή θερμοκρασία μεταξύ των ετών, αλλά η διαφορά μεταξύ των υποπεριοχών ήταν σημαντική (Πίνακας 3.2, Σχήμα 3.1a).

Το 2016 η επιφανειακή αλατότητα (5m) ήταν υψηλότερη σε σχέση με το 2014 και διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο υποπεριοχών (Πίνακας 3.1). Από τις οριζόντιες κατανομές της αλατότητας (Σχήμα 3.3) μπορεί κανείς να παρατηρήσει τις διαφορετικής προέλευσης υδάτινες μάζες: το χαμηλότερης αλατότητας νερό της Μαύρης Θάλασσας ($S < 34$) και το υψηλότερης αλατότητας νερό του Αιγαίου, καθώς και το έντονο μέτωπο που βρίσκεται νοτιοανατολικά και βορειοανατολικά της Λήμνου. Η επίδραση του νερού της Μαύρης Θάλασσας ήταν εμφανώς μεγαλύτερη το 2014 σε σχέση με το 2016. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται από την ανάλυση διακύμανσης που έδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ετών, των υποπεριοχών ενώ και η αλληλεπίδραση μεταξύ ετών και υποπεριοχών ήταν σημαντική (Πίνακας 3.2, Σχήμα 3.1b).

Οι τιμές φθορισμού (0-50 m) ήταν ιδιαίτερα αυξημένες το 2014 και διέφεραν σημαντικά σε σχέση με το 2016, ενώ παρόμοιες ήταν οι τιμές μεταξύ των υποπεριοχών (Πίνακας 3.2, Σχήμα 3.1c). Από τις οριζόντιες κατανομές του φθορισμού (Σχήμα 3.4) είναι φανερό ότι η πρωτογενής παραγωγή επηρεάζεται από τα ποτάμια και το νερό της Μαύρης Θάλασσας που είναι πλούσιο σε θρεπτικά άλατα και οργανικό άνθρακα.

Η δευτερογενής παραγωγή, εκφρασμένη ως ξηρή βιομάζα του μεσοζωοπλαγκτού (mg) ανά τετραγωνικό μέτρο (m^2), δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο ετών (Πίνακας 3.2,

Σχήμα 3.1d). Οι οριζόντιες κατανομές του ζωοπλαγκτού (Σχήμα 3.5) ακολούθησαν το πρότυπο του φθορισμού με αυξημένες τιμές στις περιοχές επίδρασης του νερού της Μαύρης Θάλασσας και των ποταμών.

Πίνακας 3.1: Μέση τιμές και εύρος τιμών θερμοκρασίας (T), αλατότητας (S), αθροισμένων (integrated) τιμών φθορισμού (0-50 m) και βιομάζας μεσοζωοπλαγκτού (Z) ανά έτος και υποπεριοχή (σε παρένθεση οι τιμές της τυπικής απόκλισης).*

Table 3.1: Mean values and range of temperature (T), salinity (S), integrated fluorescence (0-50 m) and mesozooplankton biomass (Z) per year and stratum (standard deviations in parentheses).*

REGION	T(°C)		S		Fluorescence		Z	
	5m		5m		Integrated 0-50 m		(mg m ⁻²)	
	2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016
STRATUM I (EAST)	22.52 19.96 – 24.04 (1.5)	21.62 20.21 – 24.07 (1.2)	33.69 32.84 – 38.56 (1.6)	35.38 34.08 – 37.82 (1.46)	113.78 48.23 – 133.78 (25.8)	46.37 32.25 – 66.09 (13.42)	1508 604 – 2204 (541)	1397 928 – 1967 (397)
STRATUM II (WEST)	25.09 24.30 – 25.70 (0.45)	25.89 25.18 – 26.42 (0.4)	36.19 34.94 – 37.38 (0.99)	36.32 35.76 – 37.25 (0.58)	142.48 95.91 – 186.60 (32.27)	39.51 15.73 – 74.31 (19.45)	1362 967 – 1957 (309)	1407 997 – 1996 (361)
TOTAL	23.75 19.96 – 25.70 (1.71)	23.65 20.21 – 26.42 (2.36)	34.89 32.84 – 38.56 (1.84)	35.83 34.08 – 37.82 (1.2)	127.51 95.51 – 186.60 (31.95)	42.93 15.73 – 74.31 (16.55)	1438 604 – 2204 (442)	1402 928 – 1996 (371)

* οι τιμές αναφέρονται στους σταθμούς δειγματοληψίας των ενήλικων ατόμων του γαύρου και όχι στο σύνολο της περιοχής μελέτης.

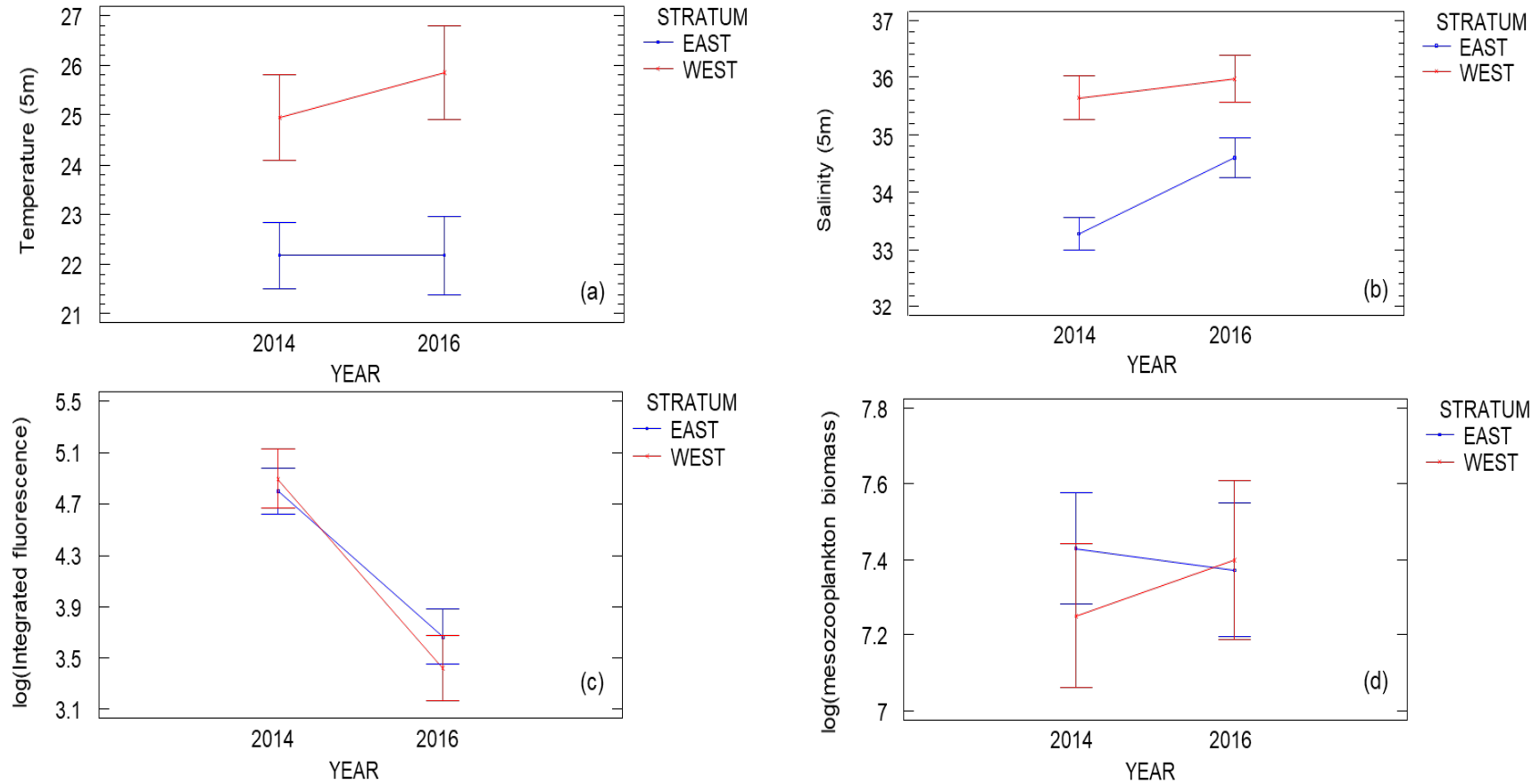
* the values refer to the sampling stations of adult anchovies and not to the entire study area.

Πίνακας 3.2: Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (F-ratios) της επίδρασης των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM) σε επιλεγμένες περιβαλλοντικές παραμέτρους. Τα δεδομένα φθορισμού και μεσοζωοπλαγκτού μετασχηματίστηκαν λογαριθμικά.

Table 3.2: Results of the analysis of variance (F-ratios) to test the effect of YEAR and STRATUM on selected environmental parameters. The fluorescence and mesozooplankton data were log-transformed.

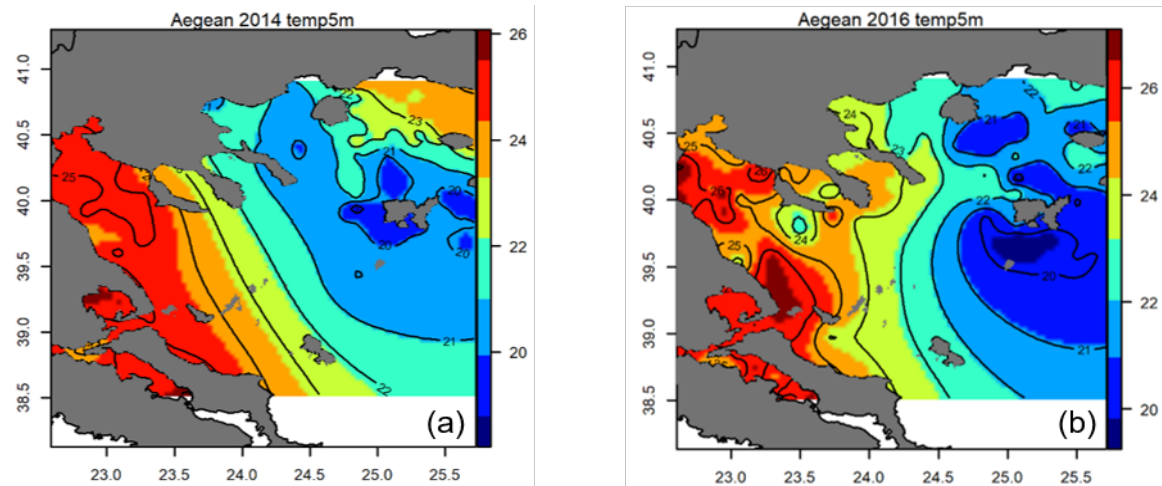
Parameter	YEAR	STRATUM	YEAR×STRATUM
Temperature (5m), °C	1.27	63.82***	1.26
Salinity (5m)	21.96***	111.61***	8.02**
Integrated fluorescence, arbitrary units	144.13***	0.49	2.42
mesozooplankton biomass, mg m ⁻²	0.25	0.72	1.29

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001



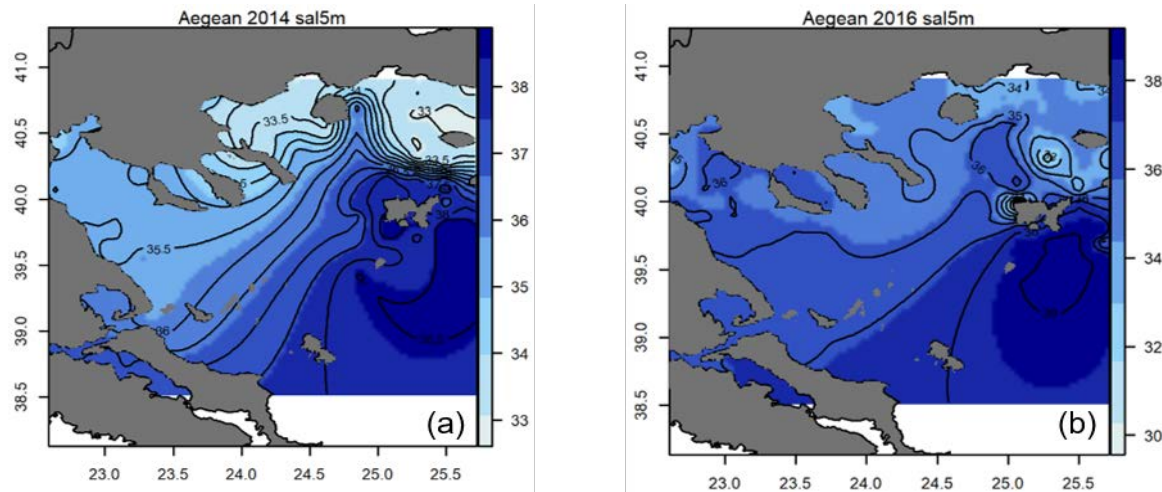
Σχήμα 3.1: Διαγράμματα αλληλεπίδρασης (με διορθωμένα κατά Bonferroni διαστήματα εμπιστοσύνης) για την επίδραση των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM) σε επιλεγμένες περιβαλλοντικές παραμέτρους: (a) επιφανειακή θερμοκρασία (5m), (b) επιφανειακή αλατότητα (5m), (c) αθροισμένες τιμές φθορισμού (0-50 m) και (d) βιομάζα μεσοζωοπλαγκτού (mg m^{-2}).

Figure 3.1: Interaction plots (with Bonferroni-corrected confidence intervals) for the effect of YEAR and STRATUM on selected environmental parameters: (a) surface temperature (5m), (b) surface salinity (5m), (c) integrated fluorescence (0-50 m) and (d) zooplankton biomass (mg m^{-2}).



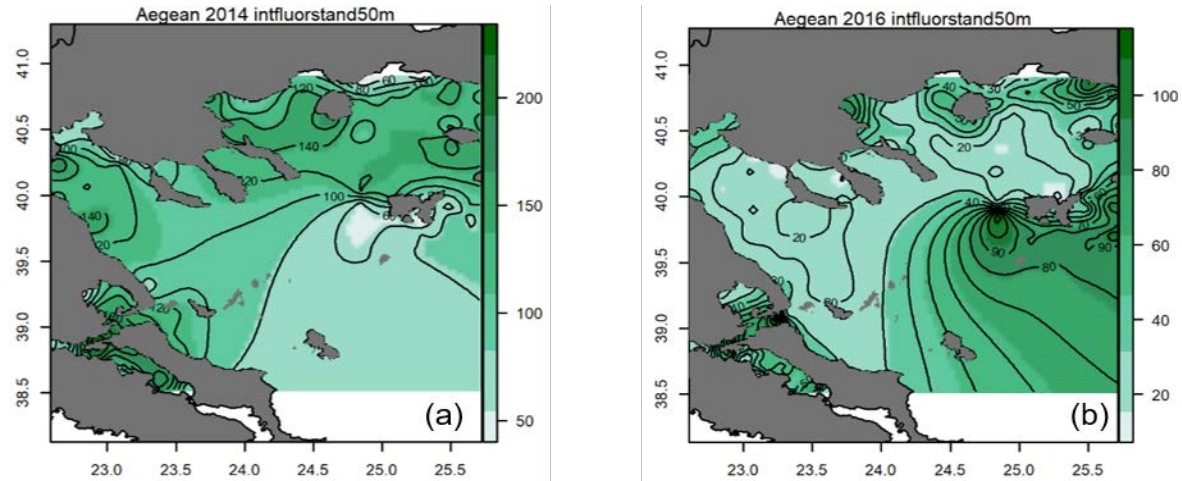
Σχήμα 3.2. Οριζόντια κατανομή της επιφανειακής θερμοκρασίας (5m) (α) το 2014 και (β) το 2016.

Figure 3.2: Horizontal distribution of surface temperature (5m) in (a) 2014 and (b) 2016.



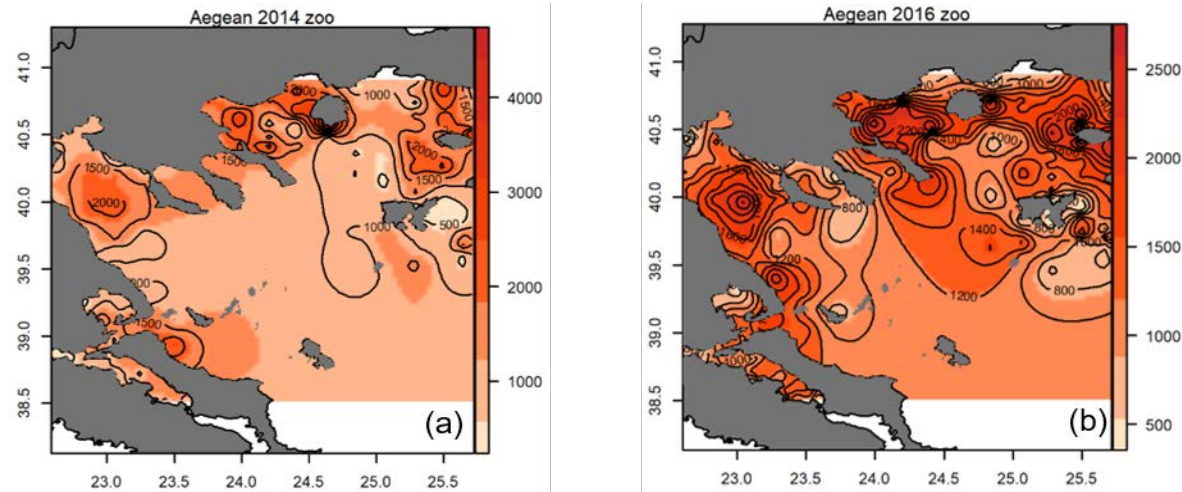
Σχήμα 3.3: Οριζόντια κατανομή της επιφανειακής αλατότητας (5m) (α) το 2014 και (β) το 2016.

Figure 3.3: Horizontal distribution of surface salinity (5m) in (a) 2014 and (b) 2016.



Σχήμα 3.4. Οριζόντια κατανομή του φθορισμού (0-50 m) (a) το 2014 και (b) το 2016.

Figure 3.4. Horizontal distribution of integrated fluorescence (0-50 m) in (a) 2014 and (b) 2016.



Σχήμα 3.5. Οριζόντια κατανομή της βιομάζας μεσοζωοπλαγκτού (mg m^{-2}) (a) το 2014 και (b) το 2016.

Figure 3.5. Horizontal distribution of mesozooplankton biomass (mg m^{-2}) in (a) 2014 and (b) 2016.

3.2 Δείκτης σωματικής ευρωστίας και μέγεθος θηλυκών

Ο δείκτης σωματικής ευρωστίας (CF) των ώριμων θηλυκών ατόμων του γαύρου υπολογίστηκε ως:

$$CF = GFW/TL^{3.24}$$

όπου 3.24 είναι η κλίση της αλλομετρικής εξίσωσης μήκους βάρους.

Η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι η μέση σωματική ευρωστία των θηλυκών δε διέφερε μεταξύ των ετών αλλά διέφερε σημαντικά μεταξύ των υποπεριοχών με τα άτομα της ανατολικής υποπεριοχής (STRATUM I) να έχουν μεγαλύτερη ευρωστία (Πίνακας 3.3, Σχήμα 3.6a).

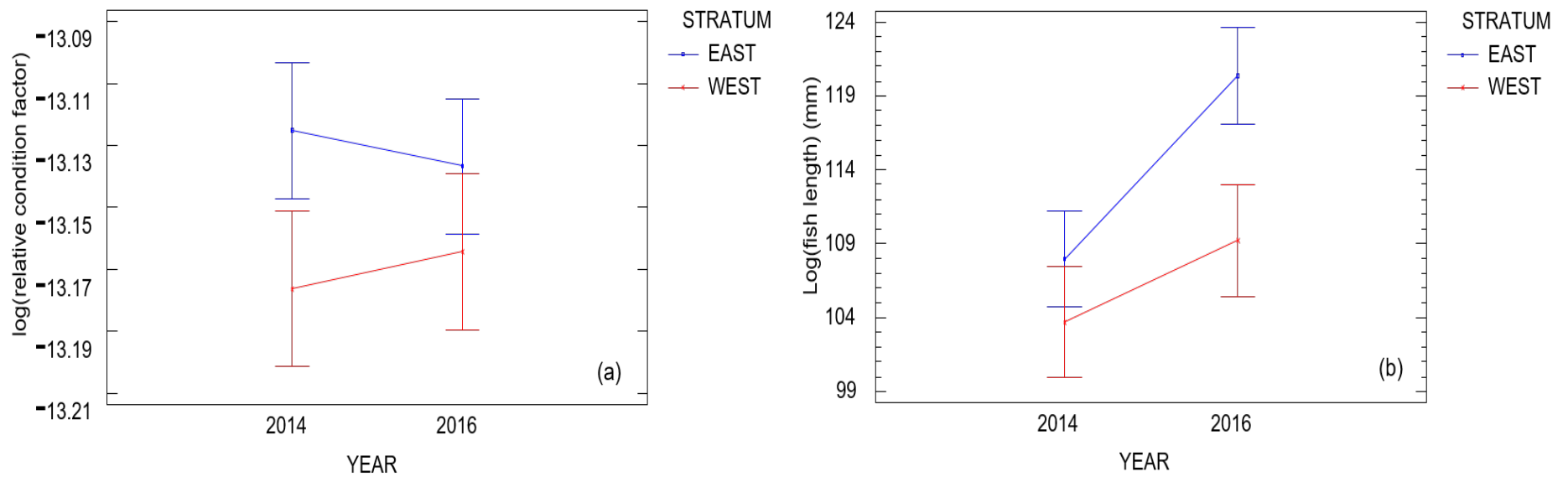
Όσον αφορά το μέγεθος (μήκος), η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι υπήρχαν σημαντικές διαφορές στο μέγεθος των ψαριών ανάμεσα στα έτη και τις υποπεριοχές (Πίνακας 3.3, Σχήμα 3.6b). Αναλυτικότερα, τα θηλυκά άτομα ήταν μεγαλύτερα σε μέγεθος το 2016 σε σχέση με το 2014 και στην ανατολική περιοχή (STRATUM I) σε σχέση με τη Δυτική (STRATUM II).

Πίνακας 3.3. Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (F-ratios) για την δοκιμή της επίδρασης των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM) στον σχετικό δείκτη σωματικής ευρωστίας (condition factor) και στο μήκος του ψαριού. Τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν λογαριθμικά.

Table 3.3. Results of the Analysis of Variance (F-ratios) to test the effect of YEAR and STRATUM on somatic condition and fish length. All data were log-transformed.

Parameter	YEAR	STRATUM	YEAR×STRATUM
Somatic condition	0.00	10.34**	0.91
Fish length	23.34***	17.52***	2.98

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

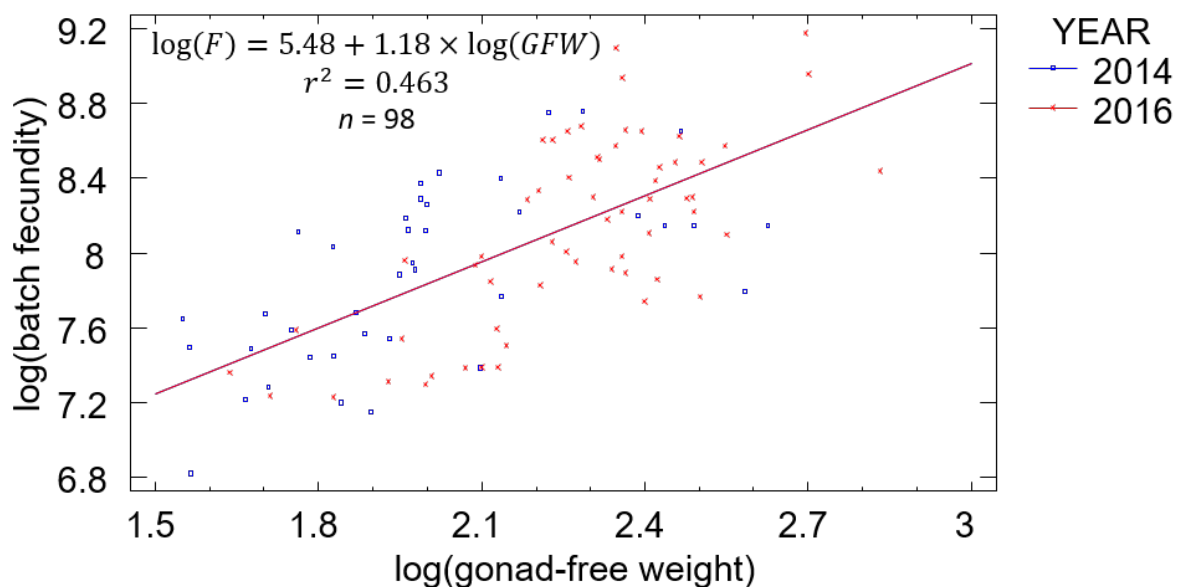


Σχήμα 3.6. Διαγράμματα αλληλεπίδρασης (με διορθωμένα κατά Bonferroni διαστήματα εμπιστοσύνης) για την επίδραση των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM): (a) στον δείκτη σωματικής ευρωστίας (relative condition factor) και (b) στο μήκος του ψαριού (fish length, mm).

Figure 3.6. Interaction plots (with Bonferroni-corrected confidence intervals) for the effect of YEAR and STRATUM: (a) on relative somatic condition factor and (b) fish length (mm).

3.3 Γονιμότητα

Η γονιμότητα υπολογίστηκε με τη μέθοδο των ενυδατωμένων ωοκυττάρων σε θηλυκά που περιείχαν στις γονάδες τους πλήρως ενυδατωμένα ωοκύτταρα αλλά δεν είχαν κενά ωοθυλάκια. Ο καλύτερος τρόπος για να περιγραφούν οι σχέσεις της γονιμότητας και του βάρους των θηλυκών είναι μέσω χρήσης μοντέλων γραμμικής παλινδρόμησης. Η εφαρμογή γραμμικής παλινδρόμησης μετά από λογαρίθμιση των μεταβλητών παρουσίασε την πιο ικανοποιητική προσαρμογή στα δεδομένα (Σχήμα 3.7). Συγκεκριμένα, η γονιμότητα συσχετιζόταν σημαντικά με το βάρος των θηλυκών χωρίς γονάδες ($F = 82.70$, $p < 0.0001$, $n = 98$) με το μοντέλο παλινδρόμησης να εξηγεί (r^2) το 46% της διακύμανσης στη γονιμότητα.



Σχήμα 3.7. Σχέση γονιμότητας και βάρους θηλυκών χωρίς γονάδες.

Figure 3.7. Relationship between batch fecundity and ovary-free female weight.

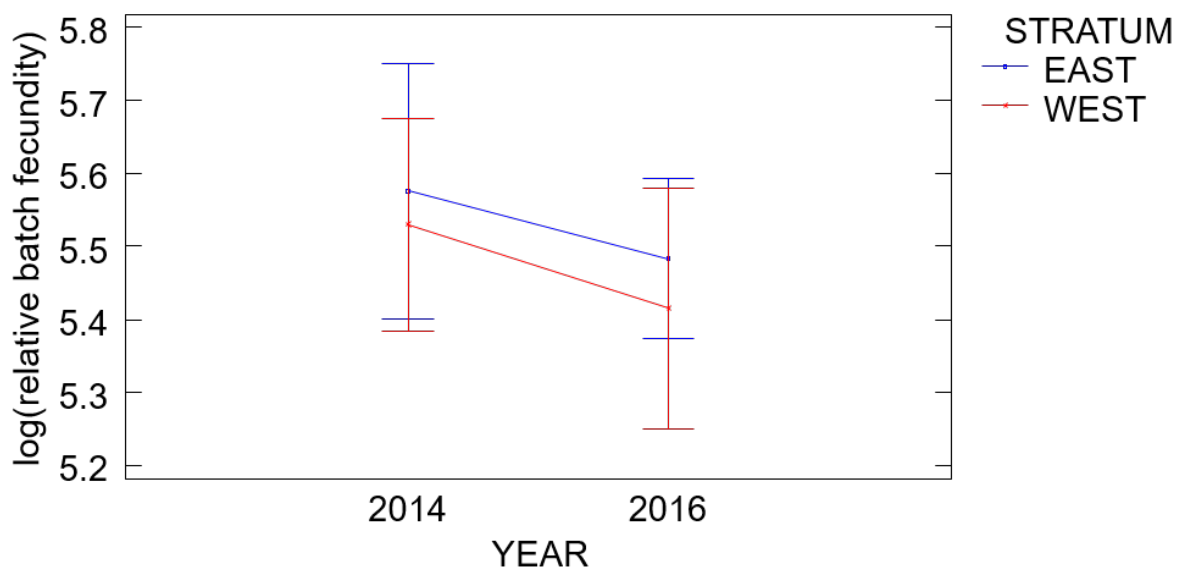
Στην συνέχεια υπολογίστηκε η σχετική γονιμότητα, ως ο λόγος της γονιμότητας προς το βάρος των θηλυκών χωρίς γονάδες (batch fecundity/gonad-free female weight) και ελέγχθηκε αν υπάρχει διαφορά μεταξύ των ετών και των υποπεριοχών. Η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα έτη και στις υποπεριοχές (Πίνακας 3.4, Σχήμα 3.8). Η σχετική γονιμότητα ήταν περίπου $320 \text{ αυγά } \text{g}^{-1}$, ανεξαρτήτως έτους και υποπεριοχής.

Πίνακας 3.4. Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (F-ratios) για την επίδραση των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM) στην σχετική γονιμότητα. Τα δεδομένα μετασχηματίστηκαν λογαριθμικά.

Table 3.4. Results of the analysis of variance (F-ratios) to test the effect of YEAR and STRATUM on relative batch fecundity. Data were log-transformed.

Parameter	YEAR	STRATUM	YEAR×STRATUM
Relative fecundity	1.71	0.52	0.02

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

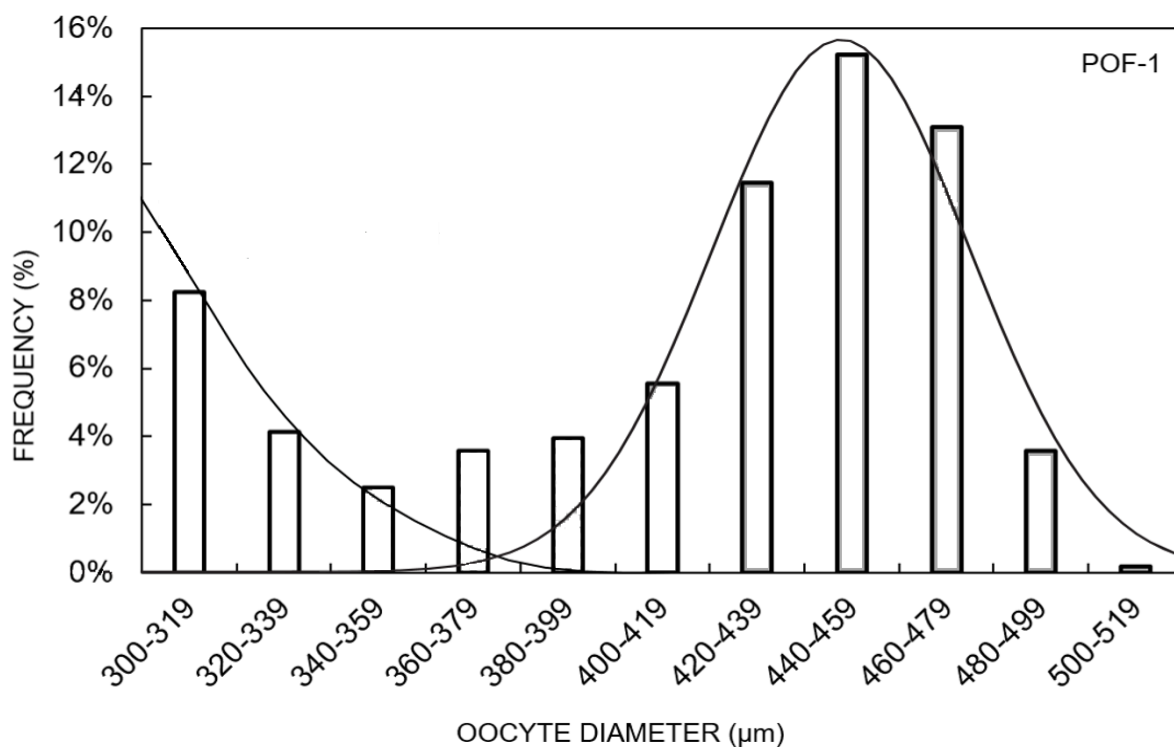


Σχήμα 3.8. Διάγραμμα αλληλεπίδρασης (με διορθωμένα κατά Bonferroni διαστήματα εμπιστοσύνης) για την επίδραση των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM) στην σχετική γονιμότητα.

Figure 3.8. Interaction plot (with Bonferroni-corrected confidence intervals) for the effect of YEAR and STRATUM on relative batch fecundity.

3.4 Αυτοδιαμετρική μέθοδος

Με την αυτοδιαμετρική μέθοδο μετρήθηκε ο αριθμός και η μέση διάμετρος των ωοκυττάρων > 300 μm σε προζυγισμένα υποδείγματα γοναδικού ιστού. Από τις μετρήσεις των διαμέτρων κατασκευάστηκαν κατανομές συχνότητας μεγέθους των ωοκυττάρων για μεμονωμένα θηλυκά Ημέρας-1 (δηλ. άτομα που είχαν ωοτοκήσει την προηγούμενη νύχτα). Στο Σχήμα 3.9 φαίνεται μια ενδεικτική κατανομή μεγεθών ωοκυττάρων, με εμφανή τον υπό εξέλιξη διαχωρισμό της ομάδας των ωοκυττάρων προς επόμενη ωοκυτταρική ωρίμανση (advanced batch) από την ομάδα των λιγότερο ανεπτυγμένων ωοκυττάρων.



Σχήμα 3.9. Ενδεικτικό ιστόγραμμα μεγέθους ωοκυττάρων σε θηλυκό Ημέρας-1 που διακρίνεται η πιο προωθημένη ομάδα ωοκυττάρων.

Figure 3.9. Indicative histogram of oocyte sizes in a Day-1 female showing the advanced batch of oocytes.

Η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι η μέση διάμετρος των είκοσι μεγαλύτερων ωοκυττάρων στη γονάδα (Λ20) διέφερε σημαντικά τόσο μεταξύ των ετών όσο και των υποπεριοχών. Συγκεκριμένα, η L20 ήταν σημαντικά μεγαλύτερη το 2016 σε σχέση με το 2014 και σημαντικά μεγαλύτερη στην ανατολική υποπεριοχή (STRATUM I) σε σχέση με τη δυτική (STRATUM II) (Πίνακας 3.5, Σχήμα 3.10a).

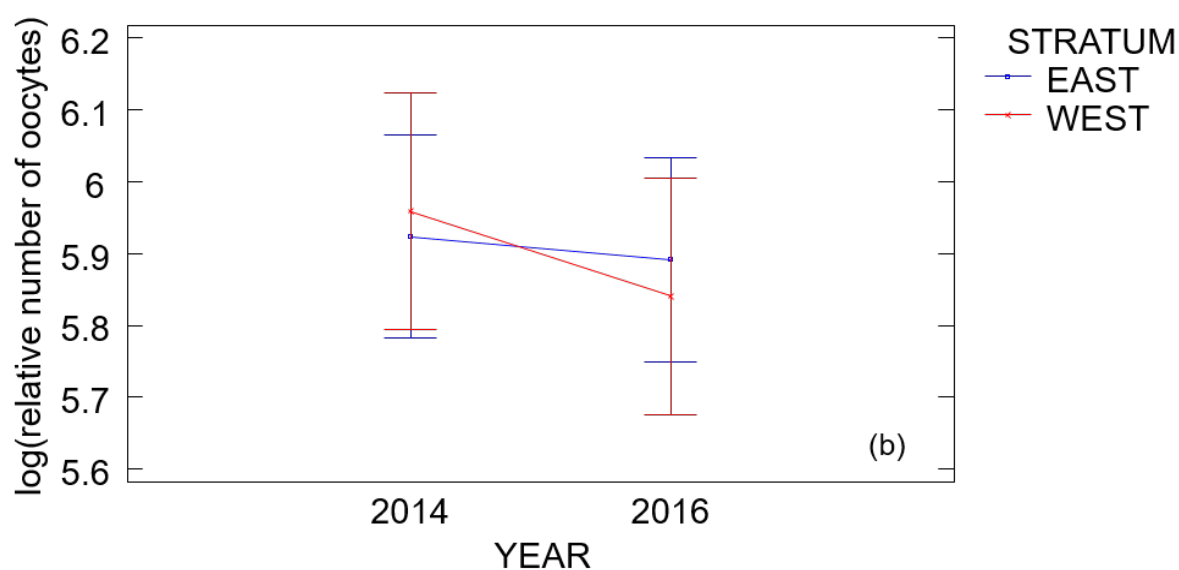
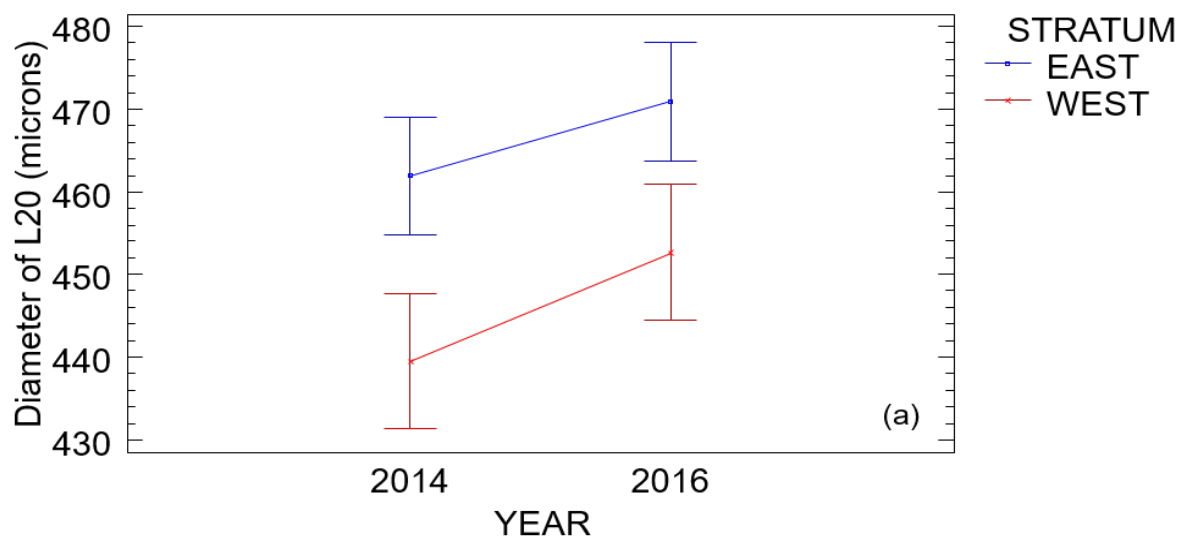
Όσον αφορά στον σχετικό αριθμό (ανά g GFW) των ωοκυττάρων που είχαν διάμετρο μεγαλύτερη των 300 μικρών (>300μm), δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ετών και μεταξύ των υποπεριοχών (Πίνακας 3.5, Σχήμα 3.10b).

Πίνακας 3.5. Αποτελέσματα της ανάλυσης διακύμανσης (F-ratios) της επίδρασης των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM) στη μέση διάμετρο των 20 μεγαλύτερων ωοκυττάρων στην ωοθήκη και στον σχετικό αριθμό ωοκυττάρων με μεγάλη διάμετρο > 300μm. Ο σχετικός αριθμός των ωοκυττάρων με μεγάλη διάμετρο (>300 μm) μετασχηματίστηκε λογαριθμικά.

Table 3.5. Results of the analysis of variance (F-ratios) to test the effect of YEAR and STRATUM on average diameter of the 20 largest oocytes in the ovary and on relative number of oocytes with long diameter >300μm. The relative number of oocytes (>300 μm) data was log-transformed.

Parameter	YEAR	STRATUM	YEAR×STRATUM
Average diameter of leading cohort	7.69**	26.05***	0.26
Relative number of oocytes (>300 μm)	0.90	0.01	0.29

* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001



Σχήμα 3.10. Διαγράμματα αλληλεπίδρασης (με διορθωμένα κατά Bonferroni διαστήματα εμπιστοσύνης) για την επίδραση των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM): (a) στη μέση διάμετρο των 20 μεγαλύτερων ωοκυττάρων στην ωοθήκη (L20, μm) και (b) στον σχετικό αριθμό ωοκυττάρων με μεγάλη διάμετρο > 300μm..

Figure 3.10. Interaction plots (with Bonferroni-corrected confidence intervals) for the effect of YEAR and STRATUM: (a) on average diameter of the 20 largest oocytes per ovary (L20, μm) and (b) relative number of oocytes with long diameter >300 μm.

Προκειμένου να προσδιορισθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν το μέγεθος των ωοκυττάρων της προωθημένης ομάδας (L20), εξετάστηκε, με μοντέλο πολλαπλής παλινδρόμησης, η επίδραση παραμέτρων όπως η βιομάζα του μεσοζωοπλαγκτού, η επιφανειακή θερμοκρασία και το μέγεθος των ψαριών.

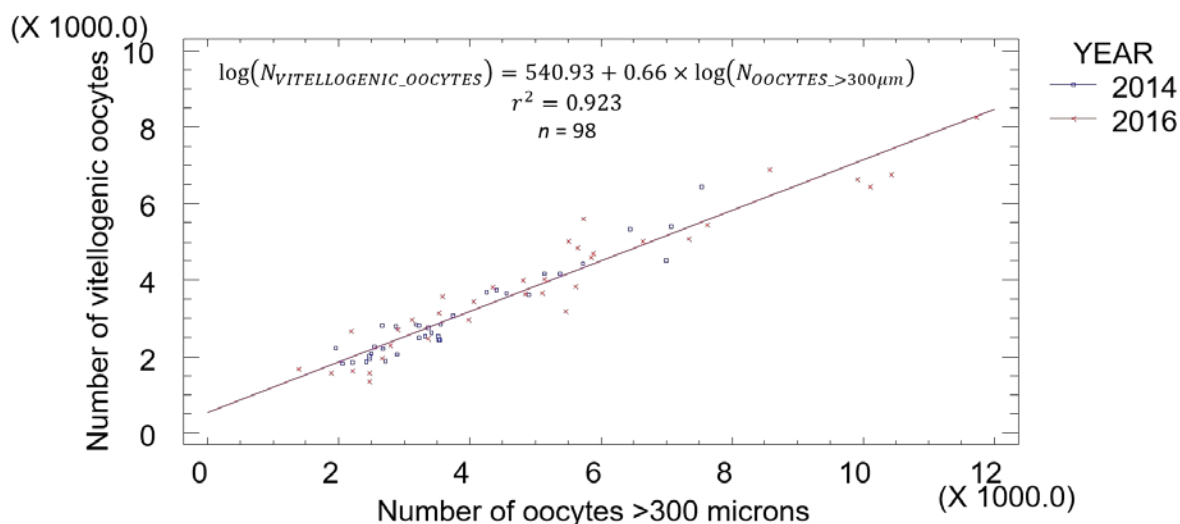
Το μοντέλο πολλαπλής παλινδρόμησης ήταν σημαντικό και προσαρμόστηκε ικανοποιητικά στα δεδομένα ($F = 13.23$, $r^2_{adj.} = 0.41$, $p < 0.0001$, $n = 73$), με τους συντελεστές της να παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.6. Το μέγεθος των ψαριών καθώς και η διαθεσιμότητα τροφής (βιομάζα μεσοζωοπλαγκτού) επιδρούν θετικά στο μέγεθος των ωοκυττάρων, ενώ η επιφανειακή θερμοκρασία επιδρούν αρνητικά.

Πίνακας 3.6. Συντελεστές πολλαπλής παλινδρόμησης για τη μέση διάμετρο των 20 μεγαλύτερων ωοκυττάρων στην ωοθήκη (L20) σε σχέση με τη βιομάζα μεσοζωοπλαγκτού, την ώρα συλλογής, την επιφανειακή θερμοκρασία και το ολικό μήκος του ψαριού.

Table 3.6. Multiple regression coefficients for the relationship of average diameter of the 20 largest oocytes in the ovary on mesozooplankton biomass, hauling time, surface temperature and total fish length.

	Paramete			
	r	<i>SE</i>	t	P
CONSTANT	263.36	119.40	2.206	0.031
log(Mesozooplankton biomass), mg m ⁻²	17.44	8.55	2.041	0.045
Temperature (5m), °C	-4.18	1.07	-3.918	<0.001
log(Total length), mm	48.39	22.78	2.125	0.037

Η αυτοδιαμετρική μέθοδος χρησιμοποιήθηκε και για την πιστοποίηση (validation) της εκτίμησης του αριθμού των λεκιθικών ωοκυττάρων με το συνδυασμό θεωρίας πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων και στερεολογίας. Για το σκοπό αυτό συσχετίστηκε ο αριθμός των λεκιθικών ωοκυττάρων στην ωοθήκη, όπως πρόκυπτε από τη στερεολογική μέθοδο με τον αριθμό ωοκυττάρων >300μm, από την αυτοδιαμετρική μέθοδο, για τα ίδια άτομα (Schismenou et al. 2012). Η σχέση (log-log) ήταν γραμμική και ισχυρή ($F = 819.25$, $r^2 = 0.920$, $p < 0.0001$, $n = 70$) υποδηλώνοντας καλή συμφωνία μεταξύ των δύο ανεξάρτητων μεθόδων στην εκτίμηση του αριθμού ωοκυττάρων (Σχήμα 3.11).



Σχήμα 3.11. Παλινδρόμηση μεταξύ του αριθμού των ωοκυττάρων όπως προκύπτουν από τη στερεολογική μέθοδο και του αριθμού ωοκυττάρων >300μm από την αυτοδιαμετρική μέθοδο.

Figure 3.11. Regression of the number vitellogenic oocytes estimated with the stereological method against the number of oocytes with long diameter >300 μm from the autodiometric method.

3.5 Σχετικός αριθμός ωοκυττάρων ανά στάδιο *i*

Το βάρος των γονάδων αυξήθηκε σημαντικά (~7%) κατά την μονιμοποίησή τους στη φορμόλη. Έπειτα, η ιστολογική επεξεργασία (βλ. Παράρτημα Α) προκάλεσε συρρίκνωση των γονάδων και κατά επέκταση του μεγέθους των ωοκυττάρων. Συνεπώς, χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες εξισώσεις για τη διόρθωση της συρρίκνωσης της μεγάλης (L_H) και της μικρής (S_H) ωοκυτταρικής διαμέτρου (Schismenou et al. 2012):

$$L = 146.008 + 0.851 \times L_H + 1 \times (\text{Stage}=\text{PVOS}) + 1 \times (\text{Stage}=\text{PVOL}) + 25.922 \times (\text{Stage}=\text{CA}) + 109.598 \times (\text{Stage}=\text{EVTO}) + 99.668 \times (\text{Stage}=\text{VTO})$$

$$S = 50.716 + 0.871 \times S_H + 1 \times (\text{Stage}=\text{PVOS}) + 1 \times (\text{Stage}=\text{PVOL}) + 14.999 \times (\text{Stage}=\text{CA}) + 78.781 \times (\text{Stage}=\text{EVTO}) + 75.711 \times (\text{Stage}=\text{VTO})$$

Στην συνέχεια οι διορθωμένες τιμές της μεγάλης (L) και της μικρής (S) διαμέτρου χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό όλων των παραμέτρων της θεωρίας της πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων ($OPDi$) (L/S , $OD_{(ind)}$, $OD_{(ind)}^3$, ODV_i , ODN_i , ODV , ODN), του κάθε ωοκυτταρικού σταδίου i (Πίνακας 3.7). Η μέση τιμή της γοναδικής πυκνότητας σε λεκιθικές γονάδες θηλυκών (POF-1), εκτιμήθηκε στα $\rho_0 = 1.109 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ (Σχισμένου 2012).

Από τις παραμέτρους της θεωρίας πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων και το βάρος της γονάδας υπολογίστηκε, επί της ουσίας, ο αριθμός των ωοκυττάρων κάθε αναπτυξιακού σταδίου i (N_i) και για το σύνολο τους (N) (Πίνακας 3.8).

Στη συνέχεια υπολογίστηκαν οι σχετικοί αριθμοί ωοκυττάρων κάθε αναπτυξιακού σταδίου i δηλαδή ο αριθμός των ωοκυττάρων (RN_i) κάθε σταδίου ανά γραμμάριο θηλυκού (βάρος θηλυκού χωρίς τις γονάδες). Ο στατιστικός έλεγχος έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στους σχετικούς αριθμούς πρωτογενών ωοκυττάρων μεταξύ των ετών (για τα μικρά προ-λεκιθικά (PVOS) [$F = 0.00$, $p = 0.959$] και για τα μεγάλα προ-λεκιθικά ωοκύτταρα (PVOL) [$F = 1.26$, $p = 0.266$]), των υποπεριοχών ((PVOS) [$F = 0.00$, $p = 0.966$] και (PVOL) [$F = 0.22$, $p = 0.641$]) και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης ((PVOS) [$F = 0.12$, $p = 0.731$] και (PVOL) [$F = 2.34$, $p = 0.131$]) (Σχήμα 3.12).

Πίνακας 3.7. Μέση τιμές και εύρη τιμών πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων (ωοκύτταρα g⁻¹ γονάδας) ανά στάδιο (*i*) (σε παρένθεση οι τιμές της τυπικής απόκλισης).

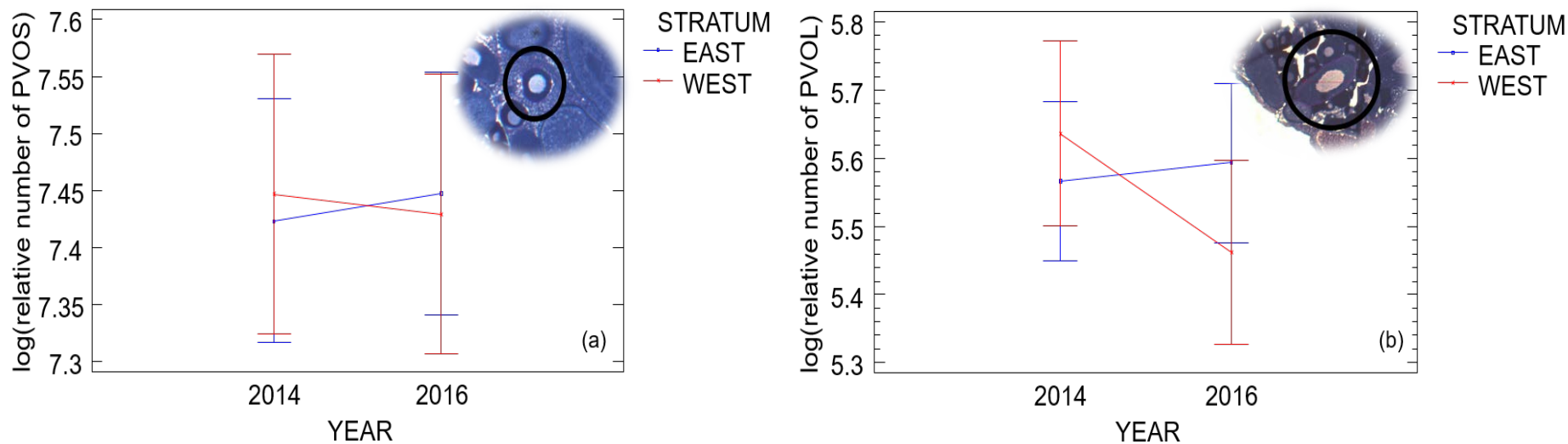
Table 3.7. Mean values and ranges of oocyte packing density (oocytes g⁻¹ gonad) per stage (*i*) (standard deviations in parentheses).

YEAR	OPD _i		OPD _i		OPD _i		OPD _i		OPD _i		OPD	
	PVOS		PVOL		CA		EVTO		VTO		ALL STAGES	
REGION	2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016
STRATUM I (EAST)	68788	71079	20206	23864	8183	8335	4499	4784	9138	9380	110816	117444
	33959 – 111343	34959 – 133353	9213 – 29333	13157 – 44283	2995 – 11865	5076 – 10209	1889 – 8096	2945 – 7078	6541 – 12808	8033 – 12216	70898 – 153987	71002 – 200315
	(21914)	(23465)	(4850)	(8203)	(2341)	(1471)	(1313)	(1082)	(1487)	(1299)	(24461)	(29973)
STRATUM II (WEST)	67117	76098	19630	20024	8340	9820	4668	4516	10115	9218	109872	119678
	36804 – 111016	32138 – 110916	12235 – 29178	10021 – 28075	4300 – 10288	4514 – 14670	3528 – 6150	2631 – 6536	8098 – 12413	6802 – 12930	69049 – 151703	67249 – 152858
	(19485)	(23046)	(4790)	(4890)	(1620)	(2464)	(819)	(1115)	(1327)	(1790)	(21853)	(27452)
TOTAL	68072	73230	19959	22218	8250	8972	4571	4669	9557	9311	110412	118402
	33959 – 111343	32138 – 133353	9213 – 29333	10021 – 44283	2995 – 11865	4514 – 14670	1889 – 8096	2631 – 7078	6541 – 12808	6802 – 12930	69049 – 153987	67249 – 200315
	(20625)	(23081)	(4762)	(7153)	(2037)	(2065)	(1117)	(1088)	(1484)	(1506)	(23048)	(28524)

Πίνακας 3.8. Μέσες τιμές και εύρη τιμών του αριθμού των ωοκυττάρων κάθε αναπτυξιακού σταδίου (*i*) (σε παρένθεση οι τιμές της τυπικής απόκλισης).

Table 3.8. Mean values and ranges of the numbers oocytes at each developmental stage (*i*) (standard deviation in parentheses).

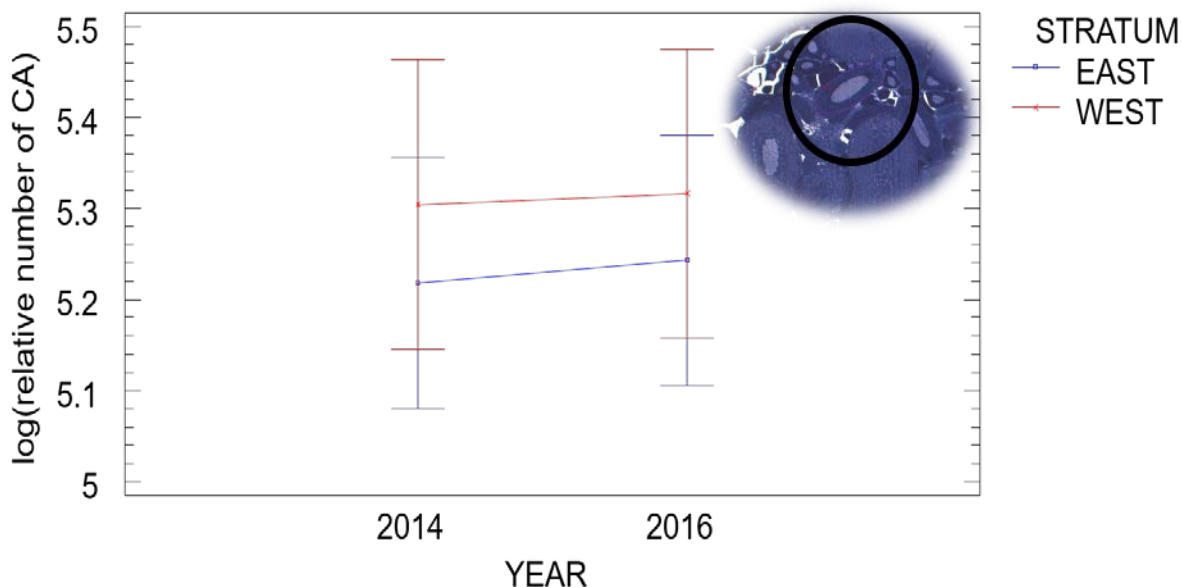
YEAR	<i>N_i</i>		<i>N_i</i>		<i>N_i</i>		<i>N_i</i>		<i>N_i</i>		N	
	PVOS		PVOL		CA		EVTO		VTO		ALL STAGES	
	2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016	2014	2016
REGION												
STRATUM I (EAST)	14915	22024	4512	7603	1878	2715	1055	1560	2115	3063	24477	36967
	6384 – 27583 (4743)	11740 – 45283 (8152)	1400 – 7601 (1447)	3339 – 13754 (3256)	455 – 3618 (811)	1182 – 5103 (1066)	287 – 2671 (540)	406 – 2722 (602)	1205 – 4931 (926)	1265 – 6523 (1185)	13376 – 44952 (7106)	18297 – 67057 (12193)
	12405	15393	3807	4188	1592	2024	912	912	1944	2068	20662	24587
STRATUM II (WEST)	8232 – 21162 (3458)	6151 – 30519 (6321)	2182 – 7944 (1621)	1700 – 7155 (1813)	824 – 2621 (524)	1007 – 3975 (864)	501 – 1771 (350)	482 – 1379 (299)	1227 – 3507 (604)	870 – 5362 (1282)	14117 – 35329 (5588)	11057 – 42527 (9349)
	13840	19182	4210	6139	1755	2419	994	1282	2041	2636	22842	31661
	6384 – 27583 (43688)	6151 – 45283 (8042)	1400 – 7944 (1542)	1700 – 13754 (3197)	455 – 3618 (708)	1007 – 5103 (1031)	287 – 2671 (467)	406 – 2722 (588)	1205 – 4931 (798)	870 – 6523 (1308)	13376 – 44952 (6689)	11057 – 67057 (12558)
TOTAL												



Σχήμα 3.12. Διαγράμματα αλληλεπίδρασης (με διορθωμένα κατά Bonferroni διαστήματα εμπιστοσύνης) για την επίδραση των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM): (a) μικρά προ-λεκιθικά (PVOS) και (b) μεγάλα προ-λεκιθικά ωκύτταρα (PVOL).

Figure 3.12. Interaction plots (with Bonferroni-corrected confidence intervals) for the effect of YEAR and STRATUM: (a) small previtellogenic oocytes (PVOS) and (b) large previtellogenic oocytes (PVOL).

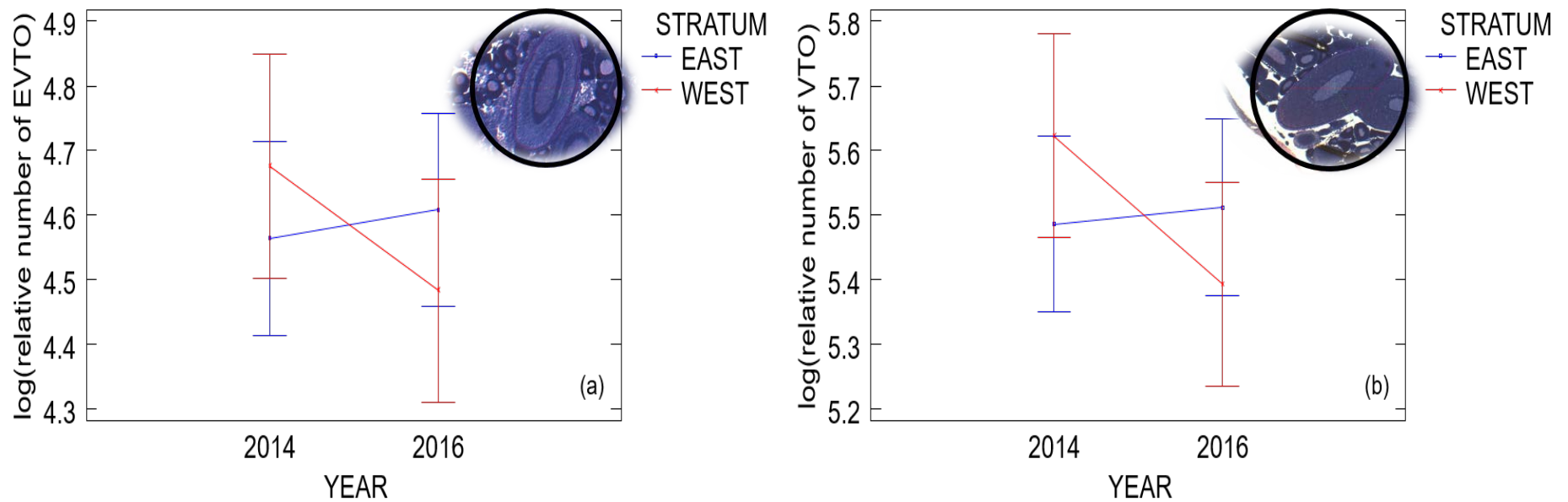
Όσον αφορά στον σχετικό αριθμό των ωοκυττάρων με κυστίδια λεκίθου (CA), η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα έτη ($F = 0.06$, $p = 0.813$), στις υποπεριοχές ($F = 1.06$, $p = 0.306$) και στην μεταξύ τους αλληλεπίδραση ($F = 0.01$, $p = 0.936$) (Σχήμα 3.13)



Σχήμα 3.13. Διάγραμμα αλληλεπίδρασης (με διορθωμένα κατά Bonferroni διαστήματα εμπιστοσύνης) για την επίδραση των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM) στους σχετικούς αριθμούς ωοκυττάρων με κυστίδια λεκίθου (CA).

Figure 3.13. Interaction plot (with Bonferroni-corrected confidence intervals) for the effect of YEAR and STRATUM on relative numbers of oocytes with yolk vehicles (CA).

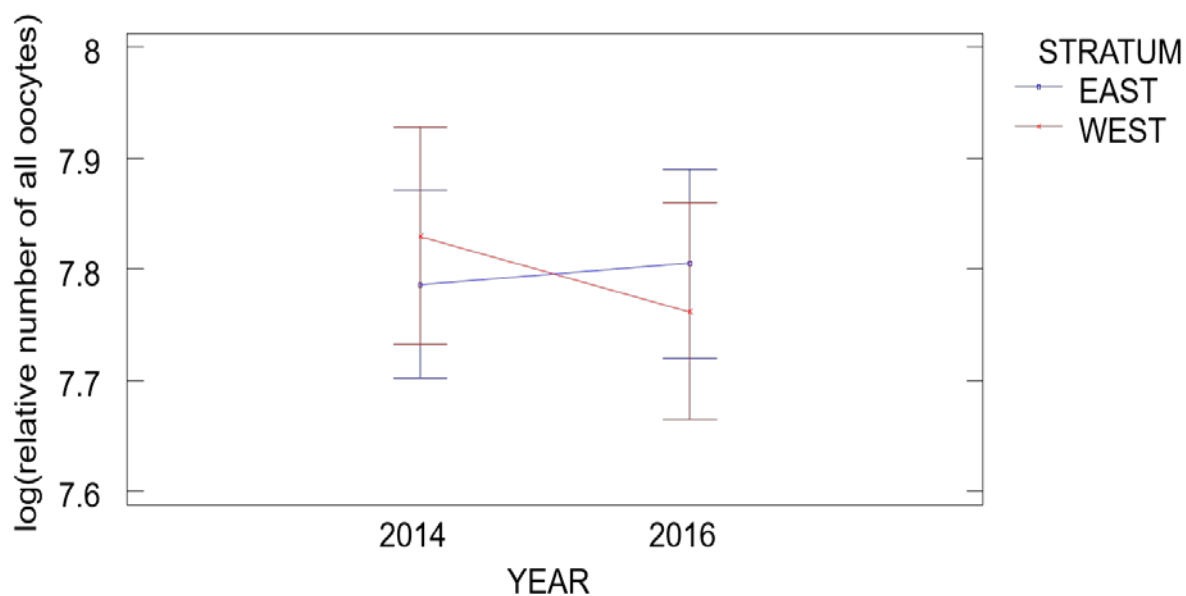
Οι σχετικοί αριθμοί των λεκιθικών ωοκυττάρων, επίσης, δεν εμφάνισαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ετών (για τα πρώιμα λεκιθικά (EVTO) [$F = 0.77$, $p = 0.813$] και για τα -λεκιθικά ωοκύτταρα (VTO) [$F = 1.76$, $p = 0.190$]), των υποπεριοχών ((EVTO) [$F = 0.01$, $p = 0.943$] και (VTO) [$F = 0.01$, $p = 0.911$]) και της μεταξύ τους αλληλεπίδρασης ((EVTO) [$F = 1.98$, $p = 0.164$] και (VTO) [$F = 2.77$, $p = 0.101$]) (Σχήμα 3.14).



Σχήμα 3.14. Διαγράμματα αλληλεπίδρασης (με διορθωμένα κατά Bonferroni διαστήματα εμπιστοσύνης) για την επίδραση των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM) στους σχετικούς αριθμούς λεκιθικών ωοκυττάρων: (a) πρώιμα λεκιθικά (EVTO) και (b) λεκιθικά (VTO).

Figure 3.14. Interaction plots (with Bonferroni-corrected confidence intervals) for the effect of YEAR and STRATUM on relative numbers of vitellogenic oocytes: (a) early vitellogenic oocytes (EVTO) and (b) vitellogenic oocytes (VTO).

Τέλος, η ανάλυση διακύμανσης έδειξε ότι δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στους σχετικούς αριθμούς των ωοκυττάρων σε όλα τα στάδια συνολικά (PVOS, PVOL, CA, EVTO & VTO) ανάμεσα στα έτη ($F = 0.27, p = 0.605$), στις υποπεριοχές ($F = 0.00, p = 0.994$) και στην μεταξύ τους αλληλεπίδραση ($F = 0.83, p = 0.367$) (Σχήμα 3.15).



Σχήμα 3.15. Διάγραμμα αλληλεπίδρασης (με διορθωμένα κατά Bonferroni διαστήματα εμπιστοσύνης) για την επίδραση των ετών (YEAR) και των υποπεριοχών (STRATUM) στους σχετικούς αριθμούς ωοκυττάρων και στα πέντε στάδια συνολικά (PVOS, PVOL, CA, EVTO και VTO).

Figure 3.15. Interaction plot (with Bonferroni-corrected confidence intervals) for the effect of YEAR and STRATUM on relative numbers of total oocytes in the five stages (PVOS, PVOL, CA, EVTO and VTO).

4. Συζήτηση

Ο συνδυασμός της θεωρίας πακεταρίσματος των ωοκυττάρων και της στερεολογίας είναι μέθοδος αιχμής για τον ακριβή υπολογισμό του ανά-σταδίου αριθμού των ωοκυττάρων στην ωοθήκη (Korta et al. 2010, Schismenou et al. 2012). Η αυτοδιαμετρική μέθοδος από την άλλη (Thorsen and Kjesbu 2001) επιτρέπει τη γρήγορη και με μεγάλη ακρίβεια μέτρηση των διαμέτρων ενός μεγάλου αριθμού ωοκυττάρων, ιδιαίτερα δε και σε είδη με ελλειψοειδή αβγά μετά τη τροποποίησή της από τους Schismenou et al. (2012).

Η ισχυρή συσχέτιση του αριθμού λεκιθικών ωοκυττάρων, όπως εκτιμήθηκαν από τις δύο ανεξάρτητες μεθόδους στα ίδια άτομα, αποδεικνύει την ακρίβεια της στερεολογικής μεθόδου η οποία και επιτρέπει τον ανά-στάδιο υπολογισμό του αριθμού των ωοκυττάρων.

Η πρόσφατη εργασία των Schismenou et al. (2012) που ανέπτυξε τις μεθόδους αυτές στον Ευρωπαϊκό γαύρο έδειξε ότι οι σχετικοί αριθμοί (αναλογίες) ωοκυττάρων στα στάδια πρωτογενούς ανάπτυξης, ‘εσωτερικής’ λεκιθογένεσης (CA) και πραγματικής (‘εξωτερικής’) λεκιθογένεσης (West 1990) είναι σταθεροί (η γονάδα βρίσκεται σε ισορροπία) εκτός από μια σύντομη περίοδο, όταν πραγματοποιείται η ενυδάτωση και ελευθερώνονται τα αβγά (θηλυκά Ημέρας-0). Στα θηλυκά Ημέρας-1, η ισορροπία της γονάδας έχει αποκατασταθεί πλήρως, με σταθερές αναλογίες ωοκυττάρων στις τρεις παραπάνω κατηγορίες.

Οι κατανομές συχνοτήτων των μέσων διαμέτρων των ωοκυττάρων στα θηλυκά Ημέρας-1 έδειξαν ότι η επόμενη ομάδα (batch) ωοκυττάρων που θα ολοκληρώσει την ανάπτυξη, θα ωριμάσει και θα απελευθερωθεί (αρχίζει ήδη να διακρίνεται στις κατανομές συχνοτήτων 24 ώρες μετά την ωοτοκία). Το ίδιο διαπίστωσαν και οι Schismenou et al. (2012) που είχαν δούλεψι με δείγματα που συλλέχθηκαν τον Απρίλιο, δηλαδή σε θερμοκρασίες πολύ χαμηλότερες σε σχέση με την παρούσα μελέτη. Η ανάπτυξη των ωοκυττάρων στον Ευρωπαϊκό γαύρο κατά την αναπαραγωγική περίοδο είναι συνεπώς πολύ γρήγορη και επηρεάζεται από τη θερμοκρασία, όπως έχει παρατηρηθεί και στο Βισκαϊκό κόλπο (Uriarte et al. 2012), όπου οι θερμοκρασίες είναι πολύ χαμηλότερες σε σχέση με την ανατολική Μεσόγειο αλλά η συχνότητα ωοτοκίας είναι εξίσου μεγάλη (ωοτοκία κάθε 2-4 μέρες).

Μέγεθος ωοκυττάρων

Τα μεγαλύτερα ωοκύτταρα των ατόμων Ημέρας-1 βρίσκονται στο ίδιο στάδιο ανάπτυξης (περίπου 24 ώρες μετά την ωοτοκία) και συνεπώς το μέσο μέγεθός τους (L20) αντανακλά το

μέγεθος που αναλογικά θα έχουν τα ωοκύτταρα αυτά κατά την τελική ωρίμανση και απελευθέρωσή τους, όταν δηλαδή γίνουν αβγά. Η ανάλυση πολλαπλής παλινδρόμησης έδειξε ότι το L20 μειώνεται με τη θερμοκρασία και αυξάνεται με το μέγεθος των γεννητόρων και τη διαθεσιμότητα τροφής, παράγοντες που είναι γνωστό ότι επηρεάζουν το μέγεθος των αβγών.

Γενικά, τα ψάρια εμφανίζουν έντονες διακυμάνσεις στο μέγεθος αβγών που συνήθως αποδίδονται στο μέγεθος ή την ηλικία των γεννητόρων (Nikolsky 1963, Bagenal 1971) και τη θερμοκρασία (π.χ. Southward and Demir 1974). Συχνά παρατηρούνται εποχιακές διαφορές. Για παράδειγμα, στο *Scomber scombrus* ο όγκος του αβγού στην αρχή της αναπαραγωγικής περιόδου (αρχές Ιουνίου) είναι περίπου διπλάσιος απ' αυτόν στο τέλος (μέσα Αυγούστου) (Ware 1977). Στο *Engraulis mordax*, ο όγκος αβγού το Μάρτιο είναι περίπου 20% μεγαλύτερος απ' τον ελάχιστο, που συναντάται το Σεπτέμβριο-Οκτώβριο (Hunter and Leong 1981).

Οι Imai & Tanaka (1987) έδειξαν πειραματικά ότι το μέγεθος αβγού στο *Engraulis japonicus* μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Άλλα πειραματικά δεδομένα στο ίδιο είδος (Kawaguchi et al. 1990) δείχνουν ότι το μέγεθος του αβγού μειώνεται με τη αύξηση της θερμοκρασίας, επηρεάζεται όμως (ανεξάρτητα) κι από τη διατροφική κατάσταση των ενηλίκων. Άλλες μελέτες (Chambers and Leggett 1996, Solemdal 1997) δείχνουν ότι το μέγεθος του αβγού επηρεάζεται από το μέγεθος των γεννητόρων, ανεξάρτητα από τη θερμοκρασία και κυμαίνεται ανάλογα με την ηλικία των γεννητόρων.

Διητήσιες και χωρικές διακυμάνσεις στη γονιμότητα ομάδας και τους αριθμούς ωοκυττάρων

Βασικός σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθούν διαφορές στη γονιμότητα και τους σχετικούς αριθμούς ωοκυττάρων που να οφείλονται στην επίδραση περιβαλλοντικών παραμέτρων ή σε μηχανισμούς πυκνοεξάρτησης.

Η περιοχή μελέτης είναι μεγάλη και ετερογενής και δέχεται την επίδραση του νερού της Μαύρης Θάλασσας το οποίο τροποποιείται, ως προς τα χαρακτηριστικά του, καθώς κινείται από ανατολικά προς δυτικά (αυξάνεται η αλατότητα και η θερμοκρασία, καταναλώνονται τα θρεπτικά και ο οργανικός άνθρακας [Siokou-Frangou et al. 2002, Somarakis et al. 2002]), ενώ τα ψάρια έχουν συνήθως μικρότερο μέσο μέγεθος στην δυτική (STRATUM II) σε σχέση με την ανατολική (STRATUM I) περιοχή (Somarakis et al. 2012).

Στην παρούσα εργασία παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις περιβαλλοντικές συνθήκες μεταξύ 2014 και 2016 και μεταξύ των υποπεριοχών τόσο στη θερμοκρασία (υψηλότερη στη δυτική περιοχή [Θερμαϊκό, Ευβοϊκό]), όσο και στην αλατότητα (μεγαλύτερη επίδραση του νερού της Μαύρης Θάλασσας ή/και των εκροών ποταμών στην Ανατολική περιοχή το 2014). Ο φθορισμός ήταν μεγαλύτερος το 2014, αλλά η διαθέσιμη ποσότητα τροφής (μεσοζωοπλαγκτό) δεν παρουσίαζε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα έτη και στις περιοχές. Ωστόσο, το απόθεμα του γαύρου ήταν σημαντικά μεγαλύτερο το 2016 (40000 t) σε σχέση με το 2014 (14000 t) που σημαίνει ότι η κατά κεφαλήν (per capita) διαθεσιμότητα τροφής ήταν πολύ μεγαλύτερη το 2014 σε σχέση με το 2016.

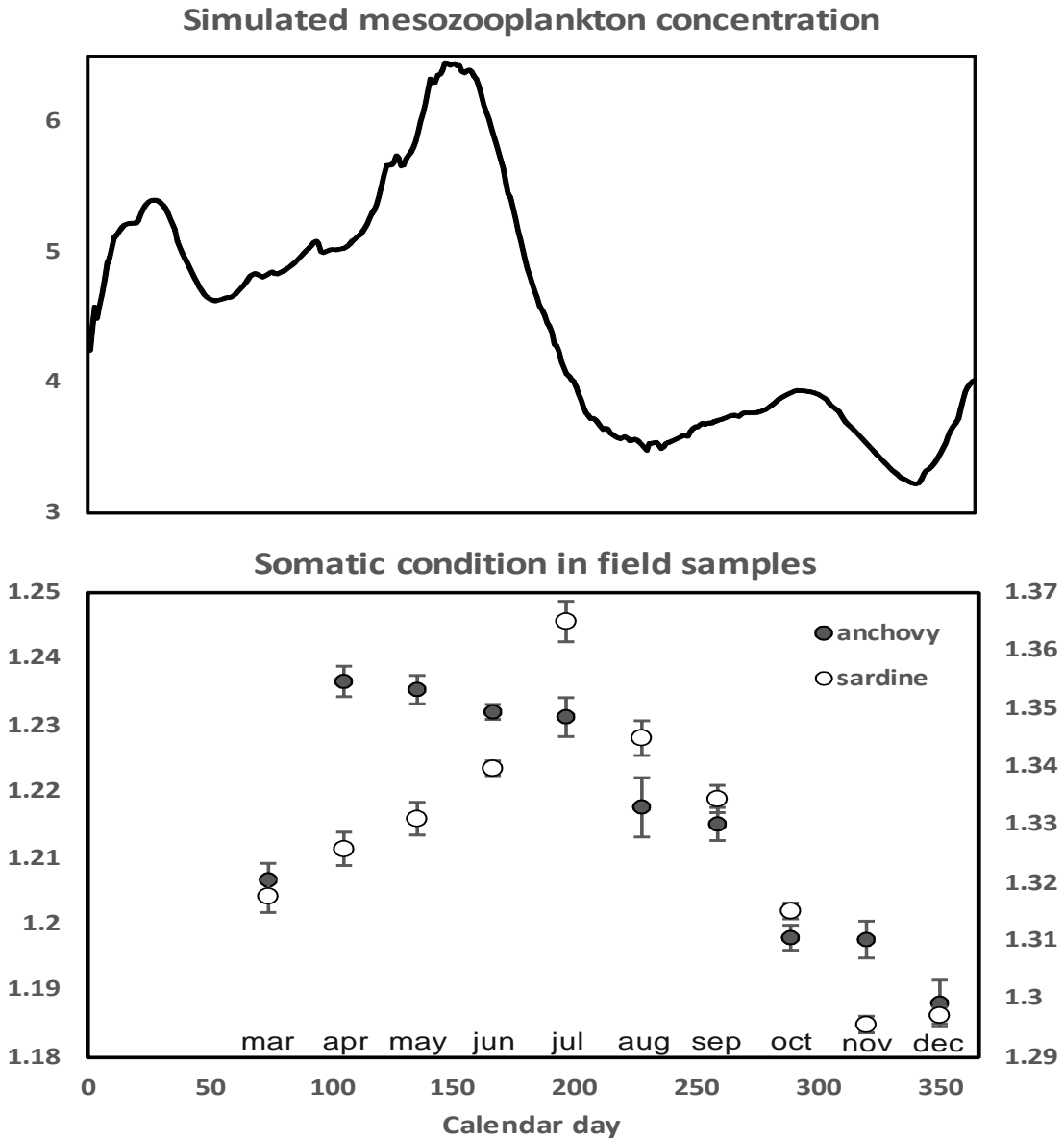
Όσον αφορά στο μέγεθος των ψαριών, αυτά ήταν μεγαλύτερα το 2016 σε σχέση με το 2014 και μεγαλύτερα και πιο εύρωστα στην ανατολική περιοχή (Θρακικό, Στρυμωνικός) σε σχέση με τη δυτική (Θερμαϊκός, Ευβοϊκός). Οι διαφορές αυτές στο μέγεθος και την ευρωστία των ψαριών μεταξύ ανατολικής και δυτικής περιοχής μπορεί να οφείλονταν στις αυξημένες θερμοκρασίες της δυτικής περιοχής και τις ενδεχόμενες αυξημένες μεταβολικές ανάγκες των ψαριών (Politikos et al. 2011, 2015).

Παρά τις παρατηρούμενες διειρήσεις και χωρικές διαφορές στις περιβαλλοντικές συνθήκες και τα χαρακτηριστικά των ενηλίκων, η σχετική γονιμότητα (εκτιμώμενη με τη μέθοδο των ενυδατωμένων ωοκυττάρων) δεν παρουσίαζε διαφορές ανάμεσα στα έτη και στις περιοχές. Ομοίως και ο σχετικός αριθμός ωοκυττάρων $>300\mu\text{m}$, από την αυτοδιαμετρική μέθοδο, καθώς οι σχετικοί αριθμοί ωοκυττάρων, συνολικών και ανά στάδιο από το συνδυασμό θεωρίας πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων και στερεολογίας (στερεολογική μέθοδος) δεν παρουσίαζαν διαφορές. Τα παραπάνω αποτελέσματα ήταν μη αναμενόμενα και υποδηλώνουν ότι οι σχετικοί αριθμοί των ωοκυττάρων στην ωοθήκη καθώς και η σχετική γονιμότητα παρέμεναν σταθεροί και συντηρητικοί απέναντι στις μεταβολές στις περιβαλλοντικές συνθήκες και τις διαφορές στην κατά κεφαλήν διαθεσιμότητα τροφής.

Πρόσφατη μελέτη των ενεργειακών ισοζυγίων του γαύρου και της σαρδέλας στο Βόρειο Αιγαίο με τη χρήση βιοενεργητικού μοντέλου (Gkanasos et al. submitted), έδειξε ότι, σε αντίθεση με ότι πιστεύαμε μέχρι σήμερα, βασισμένοι σε παρατηρήσεις της δεκαετίας του '90 (Somarakis 2005, Somarakis et al. 2004, 2018), η αναπαραγωγή του γαύρου, και όχι της σαρδέλας όπως θα αναμενόταν, βασίζεται κατά κύριο λόγο σε αποθηκευμένα ενεργειακά αποθέματα στο Βόρειο Αιγαίο παρά στην άμεση τροφοληψία, δηλαδή ο γαύρος του Βορείου Αιγαίου είναι πιο κοντά στη στρατηγική capital breeder. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.1, η συγκέντρωση

μεσοζωοπλαγκτού στο Βόρειο Αιγαίο αυξάνεται από τον Ιανουάριο έως τα μέσα Ιουνίου και στη συνέχεια πέφτει απότομα (όταν η θερμοκρασία των επιφανειακών υδάτων ξεπεράσει κατά μέσο όρο τους 20°C) και αντίστοιχα η σωματική ευρωστία του γαύρου σύντομα αρχίζει να πέφτει μετά την απότομη πτώση της συγκέντρωσης ζωοπλαγκτού παρά του ότι η παραγωγή αβγών συνεχίζεται μέχρι και το Σεπτέμβριο. Το βιοενεργητικό μοντέλο προβλέπει ότι περίπου 70% της ενέργειας που απαιτείται για την παραγωγή αυγών μέσα στην παρατεταμένη καλοκαιρινή αναπαραγωγική περίοδο προέρχεται από αποθηκευμένα αποθέματα.

Στους πληθυσμούς μικρών πελαγικών ψαριών που βρίσκονται πιο κοντά σε στρατηγική capital, η επικάλυψη αναπαραγωγικής περιόδου και παραγωγής τροφής είναι μικρότερη (McBride et al. 2015, Gatti et al. 2017) με τη γονιμότητα (και κατ' επέκταση τις σχετικές αναλογίες ωοκυττάρων διαφορετικών σταδίων στην ωοθήκη) να είναι εξαιρετικά συντηρητική (Hunter and Leong 1981, Ganias et al. 2014). Για παράδειγμα, η σαρδέλες που ακολουθούν στρατηγική capital έχουν την ίδια σχετική γονιμότητα ομάδας (αβγά g^{-1}) σε όλο τον κόσμο ανεξαρτήτως γένους, είδους ή υποείδους (Somarakis et al. 2006).



Σχήμα 4.1. Μέση συγκέντρωση μεσοζωοπλαγκτού στη στήλη του νερού (mgC m^{-3}) σε σχέση με την ημερολογιακή ημέρα από την προσομοίωση ενός υδροδυναμικού-βιογεωχημικού μοντέλου (POM-ERSEM) στην περιοχή του Βόρειου Αιγαίου, για το διάστημα 2003-2008. Για την ίδια περίοδο (2003-2008) εκτιμήθηκε και η μέση μηνιαία σωματική ευρωστία για το γάυρο και τη σαρδέλα από δείγματα ψαριών που αλιεύτηκαν από το στόλο των γρι-γρι (Gkanasos et al. submitted).

Figure 4.1. Mean mesozooplankton concentration in the water column (mgC m^{-3}) against calendar day from the simulation of a hydrodynamic-biogeochemical model (POM-ERSEM) in the North Aegean Sea in the period 2003-2008. For the same period (2003-2008), the mean monthly somatic condition of anchovy and sardine was also estimated from fish samples collected onboard the purse seine fleet (Gkanasos et al. submitted).

5. Συμπεράσματα

- Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις περιβαλλοντικές συνθήκες μεταξύ των ετών (2014 και 2016) και των υποπεριοχών τόσο στη θερμοκρασία (υψηλότερη στη Δυτική περιοχή [Θερμαϊκό, Ευβοϊκό]), όσο και στην αλατότητα (μεγαλύτερη επίδραση του νερού της Μαύρης Θάλασσας ή/και των εκροών ποταμών στην Ανατολική περιοχή το 2014). Ο φθορισμός ήταν μεγαλύτερος το 2014, αλλά η διαθέσιμη ποσότητα τροφής (μεσοζωοπλαγκτό) δεν παρουσίαζε σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα έτη και στις περιοχές. Ωστόσο, το απόθεμα του γούρου ήταν σημαντικά μεγαλύτερο το 2016 (40000 t) σε σχέση με το 2014 (14000 t) που σημαίνει ότι η κατά κεφαλήν (per capita) διαθεσιμότητα τροφής ήταν μεγαλύτερη το 2014 σε σχέση με το 2016.
- Όσον αφορά στο μέγεθος των ψαριών, αυτά ήταν μεγαλύτερα το 2016 σε σχέση με το 2014 και μεγαλύτερα και πιο εύρωστα στην ανατολική περιοχή (Θρακικό, Στρυμωνικός) σε σχέση με τη δυτική (Θερμαϊκός, Ευβοϊκός). Οι διαφορές αυτές μεταξύ ανατολικής και δυτικής περιοχής στα χαρακτηριστικά των ενηλίκων μπορεί να οφείλονται στις αυξημένες θερμοκρασίες της περιοχής αυτής και τις ενδεχόμενες αυξημένες μεταβολικές ανάγκες, οι οποίες αυξάνονται με τη θερμοκρασία.
- Το μέγεθος της προωθημένης ομάδας ωοκυττάρων (advanced batch), όπως εκφράζεται από τη μέση διάμετρο των 20 μεγαλύτερων ωοκυττάρων στην ωοθήκη (L20) μειώνεται με τη θερμοκρασία και αυξάνεται με το μέγεθος των γεννητόρων και τη διαθεσιμότητα τροφής.
- Οι εκτιμήσεις των αριθμών ωοκυττάρων στην ωοθήκη με δύο ανεξάρτητες μεθόδους (συνδυασμός θεωρίας πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων και στερεολογίας και αυτοδιαμετρική μέθοδος) ήταν ισχυρά συσχετισμένες υποδηλώνοντας την ακρίβεια της στερεολογικής μεθόδου.
- Η σχετική γονιμότητα (αβγά g^{-1}) ομάδας, με τη μέθοδο των ενυδατωμένων ωοκυττάρων, δεν παρουσίαζε διαφορές ανάμεσα στα έτη και στις περιοχές. Ομοίως και ο σχετικός αριθμός ωοκυττάρων $>300\mu m$, από την αυτοδιαμετρική μέθοδο, καθώς οι σχετικοί αριθμοί ωοκυττάρων, συνολικών και ανά στάδιο, από το συνδυασμό θεωρίας πυκνότητας πακεταρίσματος ωοκυττάρων και στερεολογίας.

- Η μικρή μεταβλητότητα της σχετικής γονιμότητας και των σχετικών αριθμών ωοκυττάρων στην ωοθήκη παρά τις διαφορές στις περιβαλλοντικές συνθήκες και την μεγάλη διαφορά στην κατά κεφαλήν διαθεσιμότητα τροφής μεταξύ 2014 και 2016 αποδίδεται σε στρατηγική αναπαραγωγής βασισόμενη κυρίως στα αποθηκευμένα ενεργειακά αποθέματα (capital breeding) που καθιστά τη γονιμότητα ιδιαίτερα συντηρητική.

6. Βιβλιογραφία

- Alder J, Campbell B, Karpouzi V, Kaschner K, Pauly D (2008). Forage fish: From ecosystems to markets. *Annual Review of Environment and Resources* 33: 153-166.
- Alheit J, Roy C and Kifani S (2009). Decadal-scale variability in populations. In: Checkley, D. et al. (Eds) *Climate change and small pelagic fish*. Cambridge University Press, pp. 64-87.
- Bagenal TB (1971). The inter-relation of the size of fish eggs, the date of spawning and the production cycle. *Journal of Fish Biology* 3: 207-219.
- Basilone G, Guisande C, Patti B, Mazzola S, Cuttitta A, Bonanno A, Vergara AR, Maneiro I (2006). Effect of habitat conditions on reproduction of the European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the Strait of Sicily. *Fisheries Oceanography* 15:271–280.
- Branch TA, Watson R, Fulton AE, Jennings S, McGilliard RC, Pablico TG, Ricard D & Tracey RS (2010). The trophic fingerprint of marine fisheries *Nature*, 468, 431.
- Brown-Peterson NJ, Wyanski DM, Saborido-Rey F, Macewicz BJ, Lowerre-Barbieri SK (2011). A standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries* 3: 52–70.
- Chambers RC, Leggett WC (1996). Maternal influence on variation in egg sizes in temperate marine fishes. *American Zoologist* 36: 180-196.
- Coll M and Libralato S (2011). Contributions of food web modelling to the ecosystem approach to marine resource management in the Mediterranean Sea. *Fish and Fisheries* 13: 60-88.
- Cury P, Shannon L and Shin Y-J (2003). The Functioning of Marine Ecosystems: a Fisheries Perspective. In: *Responsible Fisheries in the Marine Ecosystem* (eds Sinclair M and Valdimarsson G). Cabi Publishing and FAO, Wallingford, pp. 103–124.
- Fréon P, Cury P, Shannon L, Roy C (2005). Sustainable exploitation of small pelagic fish stocks challenged by environmental and ecosystem changes: A review. *Bulletin of Marine Science* 76:385–462.

- Ganias K (2009). Linking sardine spawning dynamics to environmental variability. *Estuarine Coastal and Shelf Sciences* 84:402–408.
- 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, Nunes C, Stratoudakis Y (2014). Reproductive potential. In: Ganias K (ed) *Biology and ecology of sardines and anchovies*. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, p 79–121.
- Gatti P, Petitgas and P, Huret M (2017). Comparing biological traits of anchovy and sardine in the Bay of Biscay: A modelling approach with the Dynamic Energy Budget. *Ecological Modelling* 348:93–109.
- Gkanasos A, Somarakis S, Tsiaras K, Kleftogiannis D, Giannoulaki M, Schismenou E, Sofianos S and Triantafyllou G submitted. Development, application and sensitivity tests of a 1-D full life cycle anchovy and sardine model for the North Aegean Sea (Eastern Mediterranean).
- Hunter JR and Leong RJH (1981). The spawning energetics of female northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fishery Bulletin* 79: 215-230.
- Hunter JR, Lo NCH and Leong RJH (1985). Batch fecundity in Multiple Spawning Fishes. In: Lasker R (ed) *An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, Engraulis mordax*. NOAA Technical Report NMFS 36: 67-77.
- Imai C and Tanaka S (1987). Effect of sea water temperature on egg size of Japanese anchovy. *Nippon Suisan Gakkaishi* 53: 2169-2178.
- Isari S, Ramfos A, Somarakis S, Koutsikopoulos C, Kallianiotis A, Fragopoulou N. (2006). Mesozooplankton distribution in relation to hydrology of the Northeastern Aegean Sea (eastern Mediterranean). *Journal of Plankton Research* 28: 241-255.
- Isari S, Psarra S, Pitta P, Mara P, Tomprou MO, Ramfos A, Somarakis S, Tselepides A, Koutsikopoulos C, Fragopoulou N (2007). Differential patterns of mesozooplankton's distribution in relation to physical and biological variables of the northeastern Aegean Sea (eastern Mediterranean). *Marine Biology* 151: 1035-1050.

- Jons GD and Miranda LE (1997). Ovarian weight as an index of fecundity, maturity, and spawning periodicity. *Journal of Fish Biology* 50: 150–156.
- Kawaguchi K, Yamashita Y and Hayashi A (1990). Some aspects of spawning of the reared Japanese anchovy (*Engraulis japonicus* H.) in relation to the photoperiod, water temperature and starvation. *Bulletin of the Japanese Society of Fisheries Oceanography* 54: 364-372.
- Korta M, Murua H, Kurita Y, Kjesbu OS (2010). How are the oocytes recruited in an indeterminate fish? Applications of stereological techniques along with advanced packing density theory on European hake (*Merluccius merluccius* L.). *Fisheries Research* 104:56–63.
- Kurita Y and Kjesbu OS (2009). Fecundity estimation by oocyte packing density formulae in determinate and indeterminate spawners: Theoretical considerations and applications. *Journal of Sea Research* 61:188–196.
- Magoulas A, Tsimenides N and Zouros E (1996). Mitochondrial DNA Phylogeny and the Reconstruction of the Population History of a Species: The Case of the European Anchovy (*Engraulis encrasicolus*). *Molecular Biology and Evolution* 13: 178-190.
- McBride RS, Somarakis S, Fitzhugh GR, Albert A, Yaragina NA, Wuenschel MJ, Alonso-Fernández A, Basilone G (2015). Energy acquisition and allocation to egg production in relation to fish reproductive strategies. *Fish and Fisheries* 16:23–57.
- Nikolioudakis N, Isari S, Somarakis S (2014). Trophodynamics of anchovy in a non-upwelling system: direct comparison with sardine. *Marine Ecology Progress Series* 500: 215–229.
- Nikolsky GV (1963). *The ecology of fishes*. Academic Press, Lond and NY.
- Palomera I, Olivar MP, Salat J, Sabatés A, Coll M, García A, Morales-Nin B (2007). Small pelagic fish in the NW Mediterranean Sea: An ecological review. *Progress in Oceanography* 74:377–396.
- Pecquerie L, Petitgas P and Kooijman SALM (2009). Modeling fish growth and reproduction in the context of the Dynamic Energy Budget theory to predict environmental impact on anchovy spawning duration. *Journal of Sea Research* 62: 93-105.

- Politikos DV, Triantafyllou G, Petihakis G, Tsiaras K, Somarakis S, Ito S-I, Megrey BA (2011). Application of a bioenergetics growth model for European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) linked with a lower trophic level ecosystem model. *Hydrobiologia* 670:141–163.
- Politikos DV, Somarakis S, Tsiaras KP, Giannoulaki M, Petihakis G, Machias A, Triantafyllou G (2015). Simulating anchovy's full life cycle in the northern Aegean Sea (eastern Mediterranean): A coupled hydro-biogeochemical–IBM model. *Progress in Oceanography* 138:399–416.
- Schismenou E, Somarakis S, Thorsen A, Kjesbu OS (2012). Dynamics of de novo vitellogenesis in fish with indeterminate fecundity: an application of oocyte packing density theory to European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Marine Biology* 159:757–768.
- Siokou-Frangou I, Bianchi M, Christaki U, Christou ED, Giannakourou A, Gotsis O, Ignatiades L, Pagou K, Pitta P, Psarra S, Souvermezoglou E, Van Wambeke F, Zervakis V (2002). Carbon flow in the planktonic food web along a gradient of oligotrophy in the Aegean Sea (Mediterranean Sea). *Journal of Marine Systems* 33– 34: 335– 353.
- Smith ADM (2011). Impacts of fishing low-trophic level species on marine ecosystems. *Science* 334: 39.
- Solemdal P (1997). Maternal effects-a link between the past and the future. *Journal of Sea Research* 37: 213-227
- Somarakis S (1999). Ichthyoplankton of the NE Aegean with emphasis on anchovy, *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758) (June 1993, 1994, 1995, 1996). Ph.D. Thesis, University of Crete.
- Somarakis S (2005). Marked interannual differences in reproductive parameters and daily egg production of anchovy in the northern Aegean Sea. *Belgian Journal of Zoology* 135:247–252.
- Somarakis S, Nikolioudakis N (2007). Oceanographic habitat, growth and mortality of larval anchovy (*Engraulis encrasicolus*) in the northern Aegean Sea (eastern Mediterranean). *Marine Biology* 152:1143–1158.

- Somarakis S, Drakopoulos PG, Filippou V (2002). Distribution and abundance of larval fish in the Northern Aegean Sea -Eastern Mediterranean- in relation to early summer oceanographic conditions. *Journal of Plankton Research* 24:339–357.
- Somarakis S, Ganias K, Tserpes G, Koutsikopoulos C (2004a). Ovarian allometry and the use of the gonosomatic index: a case study in the Mediterranean sardine, *Sardina pilchardus*. *Marine Biology* 146:181–189.
- Somarakis S, Palomera I, Garcia A, Quintanilla L, Koutsikopoulos C, Uriarte A, Motos L (2004b). Daily egg production of anchovy in European waters. *ICES Journal of Marine Science* 61:944–958.
- Somarakis S, Tsianis DE, Machias A, Stergiou KI (2006). An overview of biological data related to anchovy and sardine stocks in Greek waters. In: Palomares MLD, Stergiou KI, Pauly D (ed) *Fishes in databases and ecosystems*. Fisheries Centre Research Reports, University of British Columbia, p 56–64.
- Somarakis S, Schismenou E, Siapatis A, Giannoulaki M, Kallianiotis A, Machias A (2012). High variability in the daily egg production method parameters of an eastern Mediterranean anchovy stock: Influence of environmental factors, fish condition and population density. *Fisheries Research* 117–118:12–21.
- Somarakis S, Tsoukali S, Giannoulaki M, Schismenou E, Nikolioudakis N (2018). Spawning stock, egg production and larval survival in relation to small pelagic fish recruitment. *Marine Ecology Progress Series*, <https://doi.org/10.3354/meps12642>.
- Southward AJ and Demir N (1974). Seasonal changes in dimensions and viability of the developing eggs of the Cornish pilchard (*Sardina pilchardus* Walb.) off Plymouth. In: Blaxter JHS (ed) *The Early Life History of Fish*. Springer-Verlag, New York, p 53-68.
- Stergiou KI, Christou ED, Georgopoulos D, Zenetos A, Souvermezoglou C (1997). The Hellenic Seas: physics, chemistry, biology and fisheries. *Oceanography and Marine Biology Annual Review* 35: 415-538.
- Takasuka A, Oozeki Y, Kubota H, Tsuruta Y, Funamoto T (2005). Temperature impacts on reproductive parameters for Japanese anchovy: Comparison between inshore and offshore waters. *Fisheries Research* 76:475–482.

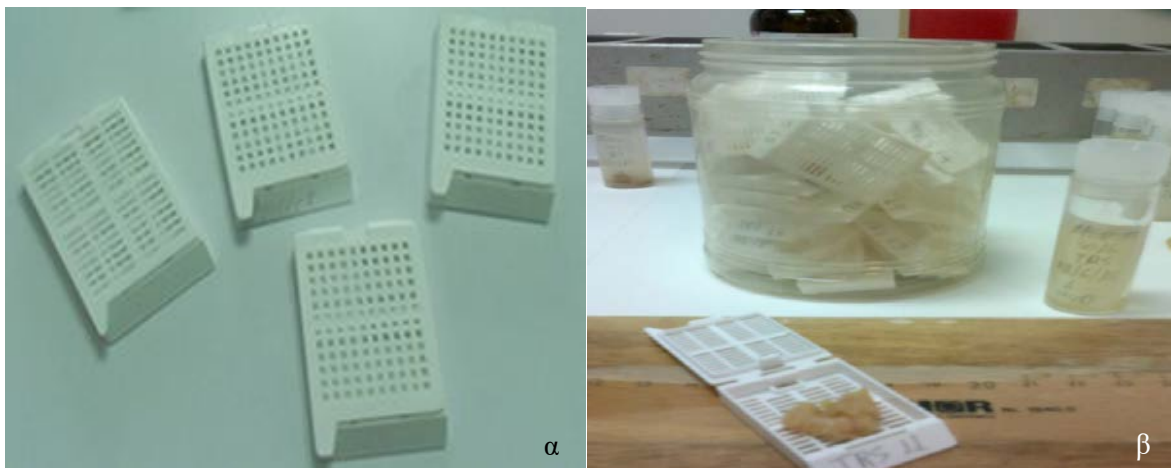
- Thorsen A and Kjesbu O (2001). A rapid method for estimation of oocyte size and potential fecundity in Atlantic cod using a computer-aided particle analysis system. *Journal of Sea Research* 46:295–308.
- Tsagarakis K, Giannoulaki M, Somarakis S, Machias A (2012). Variability in positional, energetic and morphometric descriptors of European anchovy *Engraulis encrasicolus* schools related to patterns of diurnal vertical migration. *Marine Ecology Progress Series* 446: 243–258.
- Uriarte A, Alday A, Santos M, Motos L (2012). A re-evaluation of the spawning fraction estimation procedures for Bay of Biscay anchovy, a species with short interspawning intervals. *Fisheries Research* 117–118:96–111.
- Ware DM (1977). Spawning time and egg size of Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*, in relation to the plankton. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 34: 2308-2315.
- West G (1990). *Methods of Assessing Ovarian Development in Fishes: A Review*. Australian Journal of Marine and Freshwater Research 41: 199-222.
- Zar JH (1999). *Biostatistical analysis*, 4th ed. Prentice-Hall, London.
- Zervakis V and Georgopoulos D (2002). Hydrology and circulation in the North Aegean (eastern Mediterranean) throughout 1997 and 1998. *Mediterranean Marine Science* 3:5–19.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Περιγραφή ιστολογικής τεχνικής

Η ιστολογική ανάλυση γονάδων προϋποθέτει μια συγκεκριμένη μεθοδολογία αποτελούμενη από πέντε διαδοχικά βήματα: την μονιμοποίηση, την αφυδάτωση, την ενσωμάτωση, την κοπή και την χρώση του ιστού.

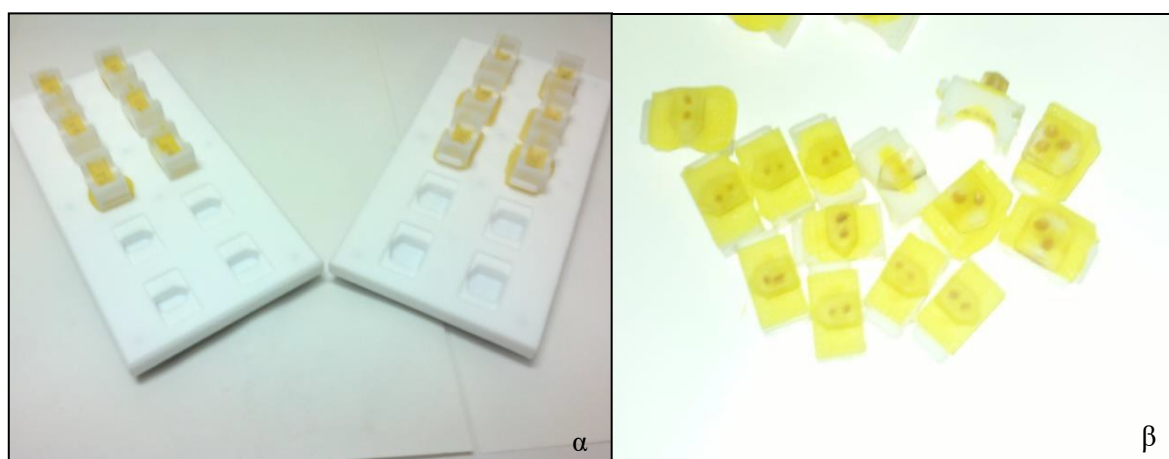
Οι ιστοί, στην προκειμένη περίπτωση οι γονάδες, τοποθετήθηκαν αμέσως μετά λήψη τους από άτομα του γαύρου σε κατάλληλες μονιμοποιητικές ουσίες (οργανικοί διαλύτες και δραστικές ανόργανες ουσίες) για να αποφευχθεί η αυτόλυση και η βακτηριακή μόλυνση, με την πιο γνωστή και πιο συχνά χρησιμοποιούμενη να είναι η φορμαλδεΰδη (10% ρυθμιστικό διάλυμα φορμόλης). Στην συνέχεια και αφού ζυγίστηκαν οι γονάδες διαχωρίστηκε ο ένας από τους δύο λοβούς, ο οποίος τοποθετήθηκε σε κασετίνα (συνήθως διαστάσεων 4 x 2,8 cm) μιας χρήσεως και ανά 40 κασετίνες σε ένα δοχείο με πάμα (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. α) Διάφορες κασετίνες και β) Τοποθέτηση του λοβού στην κασετίνα

Στο επόμενο βήμα οι γονάδες υπόκεινται σε αφυδάτωση προκειμένου να απομακρυνθεί από μέσα τους το νερό που περιέχουν με διαδοχικά υδατικά διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης (από 70% μέχρι 96%) και να αντικατασταθεί από διάλυμα ουσίας* που περιέχει 100 ml μεθακρυλικού 2-υδροξυαιθυλεστέρα (Technovit®7100 Basic Solution) με προσθήκη 1 gr υπεροξειδίου του βενζολίου (Technovit®7100 Hardener I) (Διείσδυση), όπου θα αποτελέσει την βάση για τον σχηματισμό της ρητίνης στο επόμενο βήμα της ενσωμάτωσης. Κατά την διαδικασία της

ενσωμάτωσης, ο κάθε λοβός της γονάδας, αφού αφαιρέθηκε από την κασετίνα, τεμαχίστηκε σε μικρότερα τμήματα, τα οποία τοποθετήθηκαν κάθετα από τον διαμήκη άξονα του λοβού, σε ειδικά καλούπια (Histoforms) τα οποία γεμίστηκαν με το πολυμερισμένο διάλυμα της μητρικής ουσίας με την προσθήκη ενός παραγώγου του βαρβιτουρικού οξέος σε συνδυασμό με χλωριούχα ιόντα και υπεροξείδιο του βενζολίου (διμεθυλοσουλφοξείδιο)** (6,67% κ.ο.) (Technovit®7100 Hardener II) (Πολυμερισμός), όπου παρέμεινε στα καλούπια για αρκετές ώρες έως ότου στερεοποιηθεί το περιεχόμενο και σχηματισθεί η ρητίνη (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Εγκλεισμένα τμήματα γονάδων α) στα καλούπια και β) αφού έχουν αφαιρεθεί.

Στα στερεοποιημένα τμήματα των γονάδων με ρητίνη τοποθετήθηκαν πάνω πλαστικά μπλοκ (Histobloc) μαζί με την προσθήκη υγρού πλαστικού*** (υπεροξείδιο του βενζολίου/Technovit®3040 με μεθακρυλικό μεθύλιο N N-διμεθυλο-p-τολουιδίνη/Technovit®UniversalLiquid σε αναλογία 2:1), το οποίο στερεοποιήθηκε μέσα σε 10 λεπτά ενσωματώνοντας την ρητίνη με το μπλοκ, προκειμένου να μπορούν να απομακρυνθούν από τα καλούπια τους (Εγκλειση). Οι στερεοποιημένοι ιστοί είναι έτοιμοι για να εισαχθούν στη διαδικασία κοπής ιστολογικών τομών.

Πίνακας 1. Περιγραφή πρωτοκόλλου της ιστολογικής τεχνικής που πραγματοποιήθηκε.

A/A	ΔΙΑΛΥΜΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ	ΣΤΑΔΙΑ
1	Ρυθμιστικό διάλυμα Φορμόλης 10%	∞	Μονιμοποίηση
2	Αλκοόλη 70%	1 h	
3	Αλκοόλη 70%	1 h 15 min	
4	Αλκοόλη 80%	1 h 15 min	Αφυδάτωση
5	Αλκοόλη 96%	1 h 15 min	
6	Αλκοόλη 96% - Technovit®7100(+Hardener I)* (1:1)	1 h	Προ-διείσδυση
7	Technovit®7100(+Hardener I)*	24 h	Διείσδυση Ενσωμάτωση
8	Technovit®7100+Hardener I(+Hardener II)**	16 h	Πολυμερισμός
9	Technovit®3040+Technovit®UniversalLiquid(2:1)***	10 min	Έγκλειση
10	Χρήση μικροτόμου	-	Κοπή
11	Polychrome I	2 min 20 sec	Εμβάπτιση
12	Απιονισμένο νερό (dH2O)	3 x 1 min	Έκπλυση
13	Polychrome II	1 min	Εμβάπτιση Χρώση
14	Απιονισμένο νερό (dH2O)	3 x 1 min	Έκπλυση
15	Στέγνωμα ιστολογικών τομών (~50 °C)	15 min	Στέγνωμα
16	DPX συνθετική ρητίνη	24 h	Επικάλυψη
17	Παρατήρηση ιστολογικών τομών στο μικροσκόπιο		

Τα σκευάσματα της ρητίνης με τα εγκλεισμένα τμήματα της γονάδας, τοποθετούνται και στερεώνονται στον ειδικό υποδοχέα της μικροτόμου, ο οποίος ρυθμίζεται έτσι ώστε το μπλοκ της ρητίνης να έρχεται μόλις σε επαφή με την λεπίδα. Στην συνέχεια, η μικροτόμος ρυθμίζεται σε πάχος κοπής 10 και 4 μm και κατόπιν, ξεκίνα το κόψιμο. Οι πρώτες τομές κόβονται με πάχος κοπής 10 μm, οι οποίες απορρίπτονται είτε επειδή τα άκρα του ιστού δεν είναι κατάλληλα για καλές τομές είτε επειδή συνήθως δεν περιέχουν ιστό, μέχρις ότου αρχίσει να εμφανίζεται το περίγραμμα της γονάδας όπου οι τομές από κει και έπειτα κόβονται με 4 μm. Μόλις πλέον είναι ορατό το περίγραμμα της γονάδας, επιλέγονται 3 ή 4 τομές ανά 70 ή 30 μm αντίστοιχα, ανάλογα με το μέγεθος του σκευάσματος και απομακρύνονται από την λεπίδα με μια λαβίδα. Οι τομές ρητίνης αφού εκπτυχθούν σε υδατόλουτρο, με θερμοκρασία 50 °C, επικολλώνται σε αντικειμενοφόρο πλάκα. Η επιπεδοποίηση των τομών γίνεται με την τοποθέτηση της αντικειμενοφόρου πλάκας με τις τομές, πάνω σε θερμασμένη επιφάνεια ώστε να εξατμιστεί το νερό για να επακολουθήσει η χρώση (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. α) Μικροτόμος και β) Υδατόλουτρο

Με λίγες εξαιρέσεις οι περισσότεροι ιστοί είναι άχρωμοι, γεγονός που δυσκολεύει την παρατήρησή τους στο φωτομικροσκόπιο. Για τον λόγο αυτόν έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για την χρώση των ιστών, που επιτρέπουν τόσο την παρατήρηση των επιμέρους συστατικών του ιστού, αλλά και την διάκριση ανάμεσά τους. Αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση μειγμάτων χρωστικών που έχουν την τάση να χρωματίζουν τα στοιχεία του ιστού περισσότερο ή λιγότερο εκλεκτικά. Οι περισσότερες χρωστικές συμπεριφέρονται σαν βασικές ή όξινες ενώσεις, και έχουν την τάση να σχηματίζουν άλατα με τις ιονίζουσες ρίζες των ιστών. Από όλες τις χρωστικές, ο συνδυασμός κυανό του μεθυλενίου και βασικής φουξίνης ήταν αυτός που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα ιστολογική ανάλυση. Το κυανό του μεθυλενίου (Polychrome I) βάφει μπλε το κυτταρόπλασμα ενώ η βασική φουξίνη (Polychrome II) βάφει ροζ τον πυρήνα και το κυτταρικό τοίχωμα. Εν προκειμένω, αφού εξατμίστηκε κάθε υπόλειμμα νερού πάνω από τις τομές και στέγνωσαν οι αντικειμενοφόρες πλάκες τοποθετήθηκαν σε θήκες εμφάπτισης με ειδικούς υποδοχείς (25 θέσεων). Αρχικά, ανά 20 πλάκες εμφαπτίζονται σε δοχείο με μείγμα χρωστικής Polychrome I (με βάση το κυανό του μεθυλενίου) για 2 λεπτά και 20 δευτερόλεπτα, έπειτα εκπλύνονται σε τρία διαδοχικά δοχεία που περιέχουν απιονισμένο νερό για 3 λεπτά (1 λεπτό/δοχείο), στην συνέχεια εμφαπτίζονται σε δοχείο με μείγμα χρωστικής Polychrome II (με βάση την βασική φουξίνη) για 1 λεπτό, μετά εκπλύνονται πάλι σε τρία διαδοχικά δοχεία που περιέχουν απιονισμένο νερό για 3 λεπτά (1 λεπτό/δοχείο) και τέλος τοποθετούνται οι πλάκες σε θερμασμένη επιφάνεια ώστε να εξατμιστεί το νερό.

Η επικάλυψη των ιστολογικών τομών, που αποτελεί και το τελευταίο στάδιο της ιστολογικής τεχνικής, πραγματοποιείται με κατάλληλο διάφανο υλικό. Οι ουσίες αυτές έχουν δείκτη διάθλασης παρόμοιο με αυτόν των τομών και είναι κολλώδεις συνθετικές ρητίνες ή πλαστικά διαλυμένα σε οργανικό διαλύτη, όπως για παράδειγμα το DPX που χρησιμοποιήθηκε στη παρούσα τεχνική. Αμέσως μετά την χρώση και αφού στεγνώσουν οι αντικειμενοφόρες πλάκες, απλώνεται η κολλώδης συνθετική ρητίνη (DPX) πάνω στις χρωματισμένες τομές της αντικειμενοφόρου με γυάλινη ράβδο και προσκολλώνται σε αυτές καλυπτρίδες διαστάσεων 24x50 mm για να καλύψουν την επιφάνεια που καταλαμβάνουν οι τομές (Σχήμα 4). Η επικάλυψη είναι απαραίτητη για να προστατευθεί το παρασκεύασμα και να διατηρηθεί, χωρίς να χάσει την ποιότητα του με την πάροδο του χρόνου.



Σχήμα 4. Χρωματισμένες ιστολογικές τομές.

