

**ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΓΟΝΙΜΟΤΗΤΑΣ ΟΜΑΔΑΣ ΣΕ ΜΗ ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΑ
ΑΤΟΜΑ ΓΑΥΡΟΥ, *Engraulis encrasicolus*, ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗΜΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΑΣ
ΑΥΤΟΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

Ορφανίδης Γ. *, Γκάνιας Κ.

Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Βιολογίας, Θεσσαλονίκη, 54124

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τη χρησιμότητα ενός λογισμικού ψηφιακής ανάλυσης εικόνας στη μέτρηση της F σε μη ενυδατωμένα άτομα γαύρου, *Engraulis encrasicolus*. Η αυτοματοποιημένη μέτρηση της F βασίζεται στην ικανότητα του λογισμικού να αναλύει εικόνες και να μετρά μερίδια ανάλογα με το μέγεθος τους. Η ομάδα ωοκυττάρων ωοτοκίας ήταν σαφώς αναγνωρίσιμη σε όλες τις ωοθήκες που αναλύθηκαν. Ωστόσο, οι χαμηλότερες τιμές μεγεθών της ομάδας αυτής σχεδόν πάντα επικαλυπτόταν με το προηγούμενο στάδιο, ενώ ο βαθμός της επικάλυψης εξαρτιόταν από το στάδιο ανάπτυξης της ωοθήκης. Ο αριθμός και το μέσο μέγεθος των ωοκυττάρων του σύνθετου σταδίου τα οποία χρησίμευσαν για τον υπολογισμό της F υπολογίστηκαν μέσω της αποσύνθεσης σύνθετων OSFDs με τη μέθοδο Bhattacharya. Η εκτιμώμενη σχέση της F με το βάρος του σώματος, W, ήταν $F = 854.77W - 7498.2$ ($R^2=0.61$) ενώ η μέση σχετική γονιμότητα ήταν 318 ωοκύτταρα/g (τιμή εντός ορίων για το συγκεκριμένο απόθεμα).

Λέξεις κλειδιά: Γονιμότητα, *Engraulis encrasicolus*.

*Συγγραφέας επικοινωνίας: Ορφανίδης Γεώργιος (gorfanid@bio.auth.gr)

**USING AN AUTOMATED METHOD TO MEASURE BATCH FECUNDITY IN
NON-HYDRATED ANCHOVY (*Engraulis encrasicolus*), OVARIES**

Orfanidis G.*, Ganias K.

Aristotle University of Thessaloniki, School of Biology, Thessaloniki, 54124, Greece

Abstract

In the present work we tested the utility of digital particle analysis in the measurement of F in non hydrated anchovies, *Engraulis encrasicolus*. The automated measurement of F based on the ability of image-analysis software to count objects and measure their size in binary or thresholded. The most advanced mode that corresponded to the spawning batch was clearly identifiable in all analysed ovaries. However, the lower tail of the advanced mode always overlapped in size with the previous mode, the degree of overlapping being dependant on the developmental stage of the ovary. The number and the average size of the oocytes of the advanced mode which served in estimating F were calculated through decomposing composite OSFDs using the Bhattacharya's method. The estimated relationship of F versus somatic weight, W, was $F = 854.77W - 7498.2$ ($R^2=0.61$) whilst average relative fecundity was 318 oocytes/g (value within the range for the specific anchovy).

Key words: Fecundity, *Engraulis encrasicolus*

*Corresponding author: Orfanidis Georgios (gorfanid@bio.auth.gr)

1. Εισαγωγή

Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος για τον υπολογισμό της γονιμότητας ομάδας, F, τόσο στο γαύρο όσο και σε άλλα είδη της οικογένειας των Clupeidae είναι η μέθοδος των ενυδατωμένων ωοκυττάρων. Ωστόσο, το στάδιο της ενυδάτωσης είναι ξεχωριστό και εφήμερο γεγονός το οποίο κάνει την παρουσία ενυδατωμένων θηλυκών στα δείγματα σπάνια ή ακόμη και αδύνατη. Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε τη

γονιμότητα (F) του γαύρου, *Engraulis encrasicolus*, σε μη ενυδατωμένα άτομα με τη χρήση ενός λογισμικού ψηφιακής ανάλυσης εικόνας. Η ικανότητα αυτού του λογισμικού να αναλύει εικόνες και να μετρά μερίδια ανάλογα με το μέγεθος και το σχήμα τους, επιτρέπει την ανάπτυξη μιας αυτοματοποιημένης μεθόδου για τον υπολογισμό της F.

2. Υλικά και Μέθοδοι

Δείγματα ενηλίκων ατόμων γαύρου συλλέχθηκαν από το Θερμαϊκό Κόλπο (Β. Αιγαίο) κατά την περίοδο του αναπαραγωγικού τους μέγιστου, τον Ιούλιο. Αμέσως μετά τη σύλληψη τα δείγματα τοποθετούνταν σε δοχεία με διάλυμα φορμαλίνης 4% και μεταφέρονταν στο εργαστήριο όπου γινόταν προσδιορισμός του φύλου και βιομετρικές αναλύσεις (μήκος & βάρος σώματος, βάρος γονάδας).

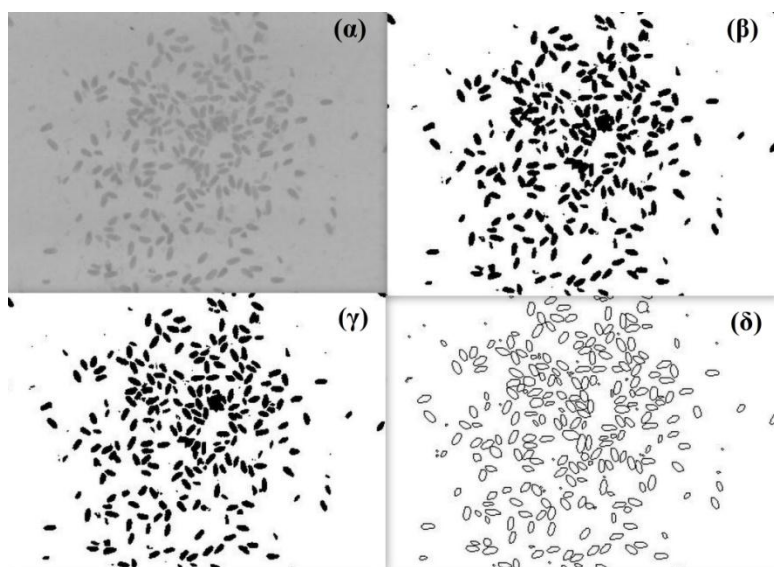
Αρχικά, ελέγχθηκε η αξιοπιστία της χρησιμοποίησης ενός απλού επιτραπέζιου σαρωτή εικόνων για την εκτίμηση της γονιμότητας. Για τον έλεγχο της αξιοπιστίας χρησιμοποιήθηκαν 20 μη ενυδατωμένα θηλυκά.

Για κάθε ένα από τα 20 δείγματα ωοθήκης λήφθηκαν υποδείγματα, τα οποία αφού ζυγίζονταν τοποθετούνταν σε ένα τριβλίο με διάλυμα γλυκερόλης 33% και στη συνέχεια υποβάλλονταν σε μέτρια ανάδευση έως ότου ξεχωρίσουν τα ωοκύτταρα αναμεταξύ τους. Στη συνέχεια, το κάθε τριβλίο τοποθετούνταν σε στερεοσκόπιο (ZEISS Stemi 2000C) με προσαρμοσμένη κάμερα μικροσκοπίας (AXIO-cam) και σε ένα σαρωτή εικόνων (hp G4050) και φωτογραφίζονταν ψηφιακά κατά ένα τέτοιο τρόπο ώστε στο πλαίσιο της εικόνας να βρίσκονται όλα τα ωοκύτταρα του υποδείγματος (Εικόνα 1α). Προκειμένου η ποιότητα των φωτογραφιών να είναι η καλύτερη δυνατή και να περιλαμβάνει μόνο ωοκύτταρα, πριν τη φωτογράφιση γίνονταν καθαρισμός του δείγματος από τις μεμβράνες της ωοθήκης. Η διαδικασία αυτή οδήγησε τελικά στη δημιουργία ενός ψηφιακού αρχείου με μικροφωτογραφίες από το σύνολο των ενυδατωμένων θηλυκών που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση.

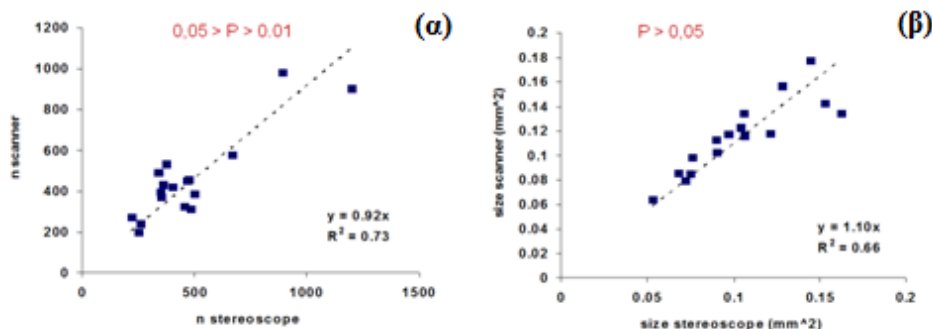
Η επεξεργασία των ψηφιακών αρχείων εικόνας έγινε με την ανάπτυξη μιας αυτοματοποιημένης διαδικασίας μέσω του ImageJ για την αναγνώριση, το διαχωρισμό και την καταμέτρηση σε κάθε μικροφωτογραφία των ωοκυττάρων (Εικόνα 1) βασισμένη στη μέθοδο κατά Thorsen & Kjesbu (2001). Οι τιμές των παραμέτρων σε καθεμία από τις παραπάνω επιμέρους διαδικασίες (π.χ. φωτεινότητα, thresholding, κτλ.) επιλέχθηκαν έτσι ώστε να δίνουν το βέλτιστο αριθμό και μέγεθος ωοκυττάρων.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων του σαρωτή εικόνων συγκρίθηκαν με αυτά του στερεοσκοπίου για να ελεγχθεί η αξιοπιστία του πρώτου στις εκτιμήσεις γονιμότητας (Σχ. 1). Μετά από τον παραπάνω έλεγχο αξιοπιστίας λήφθηκαν 68 υποδείγματα ωοθήκης και φωτογραφήθηκαν μόνο με το σαρωτή εικόνων. Η επεξεργασία των 68 αυτών υποδειγμάτων, αλλά και των ψηφιακών εικόνων τους πραγματοποιήθηκε με τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω.

Στη συνέχεια, υπολογίστηκε ο αριθμός και το μέσο μέγεθος των ωοκυττάρων του σύνθετου σταδίου, τα οποία χρησίμευσαν στον υπολογισμό της F, μέσω της αποσύνθεσης σύνθετων OSFDs με τη μέθοδο Bhattacharya μέσω του λογισμικού FiSAT II (<http://www.fao.org/>). Μετά από τη μέτρηση του μεγέθους των ωοκυττάρων και την παραγωγή κατανομής συχνοτήτων μεγεθών για κάθε ωοθήκη ξεχωριστά, όλα τα ιστογράμματα συχνοτήτων απεικονίστηκαν μαζί κατά αύξουσα σειρά μέσου μεγέθους ωοκυττάρων. Τέλος, το γράφημα που προέκυψε ελέγχθηκε οπτικά προκειμένου να καθοριστεί τότε η ομάδα ωοτοκίας χωρίζει από τις υπόλοιπες ομάδες (Σχ. 2).



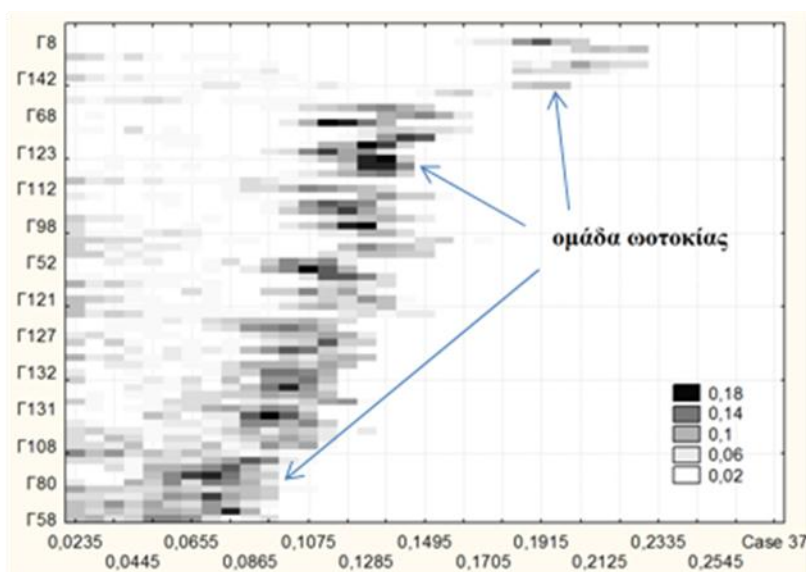
Εικόνα 1: Διαδοχικές φάσεις επεξεργασίας των μικροφωτογραφιών ωθηκών γάυρου, *E. encrasicolus*, για τη μέτρηση του αριθμού των μη ενυδατωμένων ωοκυττάρων με το λογισμικό ImageJ. (α) μετατροπή της εικόνας σε αρχείο 8bit, (β) περιορισμός του χρωματικού φάσματος (thresholding), (γ) διαχωρισμός των μεριδίων (segmentation) και (δ) επιλογή των μεριδίων ως προς το μέγεθος και τη σφαιρικότητα για τη μέτρηση τους.



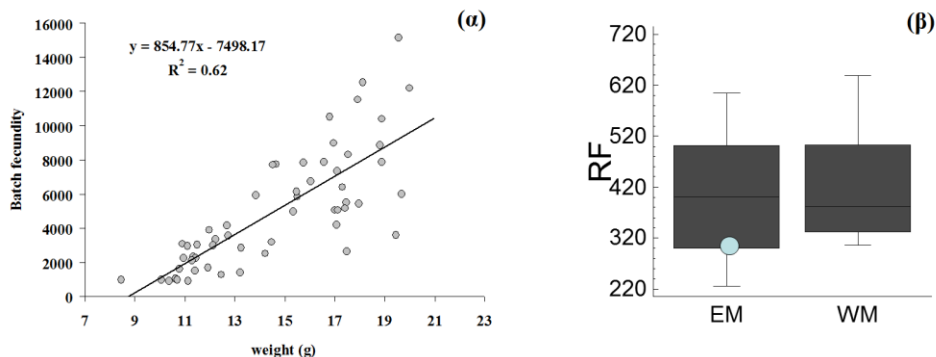
Σχήμα 1. Σύγκριση αποτελεσμάτων μεταξύ σαρωτή εικόνων και στερεοσκοπίου. (α) αριθμός ωοκυττάρων σαρωτή εικόνων-στερεοσκοπίου, (β) μεγέθη ωοκυττάρων σαρωτή εικόνων-στερεοσκοπίου. Οι P τιμές υποδεικνύουν τη σύγκριση της κλίσης της ευθείας με τη διαγώνιο.

3. Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα του ελέγχου αξιοπιστίας της χρησιμοποίησης του κοινού σαρωτή εικόνων στις εκτιμήσεις γονιμότητας επιβεβαίωσαν την αξιοπιστία των μετρήσεων του (Σχ. 1). Από την άλλη, στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν για τα 68 θηλυκά η ομάδα ωοκυττάρων ωοτοκίας ήταν αναγνωρίσιμη σε όλες τις ωθήκες που αναλύθηκαν. Ωστόσο, υπήρχε μια επικάλυψη μεταξύ των χαμηλότερων τιμών μεγέθους της ομάδας αυτής και του προηγούμενου σταδίου. Ο βαθμός της επικάλυψης αυτής εξαρτιόταν από το στάδιο ανάπτυξης της ωθήκης. Η εκτιμώμενη σχέση της F με το βάρος του σώματος, W, ήταν $F = 854.77W - 7498.2$ ($R^2=0.61$) ενώ η μέση σχετική γονιμότητα υπολογίστηκε στα 318 ωοκύτταρα/g (Σχ. 3α).



Σχήμα 2. Κατανομές συχνοτήτων μεγέθους ωοκυττάρων σε 68 ωοθήκες γαύρου μεταξύ του αρχικού σταδίου και του μεταγενέστερου σταδίου με τη μετανάστευση του πυρήνα κατά αύξουσα σειρά του μέσου μεγέθους ωοκυττάρων.



Σχήμα 3. (α) σχέση μεταξύ γονιμότητας ομάδας και σωματικού βάρους, (β) θηκόγραμμα τιμών σχετικής γονιμότητας (RF) για διάφορα αποθέματα γαύρου, *E. encrasicolus*, αποθέματα Ανατολικής (EM) και Δυτικής (WM) Μεσογείου.
Μπλε κύκλος : η εκτιμώμενη τιμή της σχετικής γονιμότητας της παρούσας εργασίας

4. Συζήτηση

Η χρήση του κοινού σαρωτή εικόνων για εκτιμήσεις γονιμότητας έχει πολλά πλεονεκτήματα. Αρχικά, ο σαρωτής εικόνων είναι πιο εύκολος στη χρήση του από το στερεοσκόπιο και οι μετρήσεις γίνονται πολύ γρήγορα. Ακόμη, το κόστος ενός απλού σαρωτή εικόνων είναι πολύ χαμηλό γεγονός που καθιστά πιο εύκολη την απόκτηση και τη χρήση του. Οι εκτιμώμενες τιμές της F δεν σχετίζονταν σημαντικά ούτε με το μέσο όρο μεγέθους των ωοκυττάρων ούτε με το μέγεθος των ωοκυττάρων της ομάδας ωοτοκίας, γεγονός που υποδηλώνει ότι F δεν είναι υποτιμημένη για τα προηγούμενα στάδια του αναπαραγωγικού κύκλου και δεν είναι υποτιμημένη λόγω ατρησίας. Επίσης,

τα αποτελέσματα της εκτιμώμενης σχετικής γονιμότητας είναι εντός του εύρους των τιμών που έχουν αναφερθεί για το συγκεκριμένο απόθεμα γαύρου, το οποίο υποδηλώνει την εγκυρότητα της αυτοματοποιημένης μεθόδου (Σχ. 3β).

Βιβλιογραφία

Thorsen A., Kjesbu O.S. (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.