

ALMA MATER STUDIORIUM - UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in Biologia Marina

Struttura di età di nasello (*Merluccius merluccius*, Linnaeus, 1758) in alto-medio Adriatico mediante analisi degli otoliti e frequenza di taglia

Tesi di laurea in

Biologia delle risorse alieutiche

Relatore

Prof. Fausto Tinti

Presentata da

Paolo Maurizio Maria Angileri

Correlatore

Dott. Marco Stagioni

III sessione

Anno Accademico 2013-2014

INDICE

1 INTRODUZIONE	6
1.1 Caratteristiche generali del mare Adriatico	6
1.1.1 Circolazione.....	8
1.1.2 Caratteristiche chimico-fisiche.....	9
1.1.3 Ecologia e risorse demersali.....	9
1.1.4 Pesca a strascico	10
1.2 Cenni della biologia del nasello (<i>Merluccius merluccius</i> Linnaeus, 1758).....	10
1.2.1 Descrizione	11
1.2.2 Distribuzione	11
1.2.3 Habitat	12
1.2.4 Migrazioni stagionali.....	12
1.2.5 Riproduzione	13
1.2.6 Maturità sessuale e lunghezza totale	13
1.2.7 Alimentazione.....	13
1.2.8 Gestione	14
1.3 Otoliti.....	15
1.3.1 Descrizione e funzione	15
1.3.2 Incrementi periodici.....	20
1.3.3 Regolazione dei depositi incrementali.....	26
1.3.4 Validazione del rapporto di deposizione incrementale dell'otolite.....	26
1.3.5 Tecniche di preparazione.....	31
1.3.6 Acquisizione delle immagini digitali.....	38
1.3.7 Stima di età.....	40
1.3.8 Tecniche di preparazione per microscopio: <i>oiling, etching, staining, burning</i> ..	44
2 SCOPO E ORGANIZZAZIONE DEL LAVORO	46
3 MATERIALI E METODI	47
3.1 Area di studio, campionamento e analisi biologiche: Campagna Medits.....	47
3.2 Preparazione degli otoliti.....	51
3.2.1 Estrazione	51
3.2.2 Pulizia	52
3.2.3 Inclusione degli otoliti.....	53
3.2.4 Levigatura.....	57
3.2.5 Acquisizione delle immagini.....	59
3.3 Analisi dati.....	62
4 RISULTATI	67
4.1 Analisi otoliti interi.....	67
4.2 Analisi delle sezioni frontali e sagittali	80
5 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	85
6 LAVORI FUTURI.....	89
7 BIBLIOGRAFIA	90
ALLEGATO	104

ABSTRACT

L'obiettivo del presente lavoro di tesi è di delineare un quadro generale della struttura della popolazione di *Merluccius merluccius*, di stimare il tasso di accrescimento e di conoscere maggiormente le dinamiche di reclutamento dei giovanili dell'alto-medio Adriatico, attraverso le analisi degli otoliti.

Gli otoliti appartenenti ad esemplari di nasello catturati durante la campagna sperimentale di pesca a strascico MedITS 2012 nella GSA 17, sono stati puliti e 102 sono stati sottoposti ad inclusione, sezionamento e levigatura per l'ottenimento di sezioni frontali e sagittali. L'intero campione è stato analizzato allo stereoscopio e al microscopio ottico con telecamera e collegato ad un PC fornito di programma di analisi di immagine.

Dall'analisi di frequenza su classi di taglia e di età, dominano naselli < 200 mm di LT e <1 anno di età. La taglia media raggiunta dal *M. merluccius* alla fine del primo anno è di circa 199mm di LT. Le analisi allometriche tra le LT degli individui e Feret (diametro maggiore), MiniFeret (diametro minore), Area, Perimetro, hanno mostrato una proporzionalità diretta tra le lunghezze. Delle 88 sezioni di otoliti analizzati, il numero di incrementi letti è stato tra i 86 e i 206 anelli, con LT pari a 55 e 175 mm. L'età stimata varia da circa 2-3 a poco meno di 9 mesi e il tasso di crescita dai 20.99 ai 27.15 mm di LT al mese. Infine dalla distribuzione delle date di schiusa, determinate dal retrocalcolo (*back-calculation*), è risultato che la schiusa è avvenuta tra Novembre-Marzo.

In conclusione, è necessario applicare una notevole protezione degli adulti, perché il successo della specie sembra essere legata alla protezione delle zone profonde in cui i grandi riproduttori risiedono.

1 INTRODUZIONE

La determinazione dell'età del nasello *Merluccius merluccius* (inglese: European hake) in Mediterraneo è difficoltoso, e non può essere applicato un comune criterio di interpretazione per gli otoliti (Oliver et al., 1989), in quanto la soggettività aumenta con la complessità del pattern strutturale dell'otolite. Ma essere capaci di fornire delle conoscenze sul significato biologico dei patterns di crescita e lo sviluppo di un quadro quantitativo, è stato utile per definire una procedura oggettiva per l'interpretazione, permettendo la riduzione della soggettività. Nonostante le problematiche, la determinazione dell'età costituisce un importante strumento per la stima della crescita, e per la valutazione della struttura, della longevità e della mortalità di una popolazione. In particolare, la conoscenza dell'età e della crescita nella fase giovanile è fondamentale per segnalare gli effetti dei cambiamenti ambientali sulla crescita e sulla sopravvivenza, e può risultare utile per migliorare la conoscenza dei fattori che influenzano il reclutamento. Queste informazioni contribuiranno all'identificazione dei dati essenziali per capire i fattori che determinano il reclutamento dei giovanili di questa importante specie.

1.1 Caratteristiche generali del mare Adriatico

L'Adriatico è un bacino semichiuso e allungato del Mediterraneo centrale che, a causa della sua scarsa profondità delle acque, è descritto come un mare continentale (Jardas et al., 2008). Si estende per circa 800 km da NW verso SE, la sua ampiezza varia tra 90 e 220 km. E' collegato con il resto del Mediterraneo attraverso il canale di Otranto, che riveste un ruolo fondamentale nella circolazione e scambio delle masse d'acqua (Tescic 1968, 1969; Buljan & Zore-Armanda 1971, 1976).

L'Adriatico è un mare poco profondo, con profondità media stimata di 252 metri (Tescic, 1968). Gran parte dei fondali (circa il 74%) è meno profondo di 200 metri, l'Adriatico settentrionale è caratterizzato da un'estesa piattaforma continentale raggiungendo una profondità massima di 50 metri, mentre l'Adriatico centrale raggiunge la massima profondità nella Fossa di Pomo (238 metri). La profondità massima di 1200 metri si rileva però nella parte meridionale del bacino al largo di Bari (Piccinetti et al., 2012).

Le coste si presentano basse, regolari e sabbiose su gran parte del versante italiano mentre su quello orientale si ha una costa alta, frastagliata e rocciosa.

Gran parte del fondale marino è ricoperto principalmente da sedimenti fangosi e sabbiosi di diversa composizione minerale e granulometria (sabbie, limi e argille), il cui trasporto dipende in larga misura dalle correnti marine di tipo ciclonico. Quindi, in rapida successione dalla costa verso il mare aperto, troviamo sabbie che si arricchiscono progressivamente di frazioni pelitiche (limo e argille) via via crescenti fino a 5–6 km dalla costa. Da questa distanza fino a 45-50 km la componente sabbiosa scompare per lasciare il posto ai soli fanghi.

L'area più estesa occupata dalle peliti si trova nella zona prospiciente al delta del Po' e continua poi parallelamente alla costa, per buona parte della lunghezza dell'Adriatico. Superata la fascia occupata dai fanghi, sempre procedendo lungo la direttrice verso il versante orientale, ritroviamo ancora sedimenti pelitico-sabbiosi per una larghezza di diversi chilometri e quindi sabbie fino ad arrivare alla costa croata (Fig. 1) (Piccinetti et al., 2012; Rinaldi, 2008).

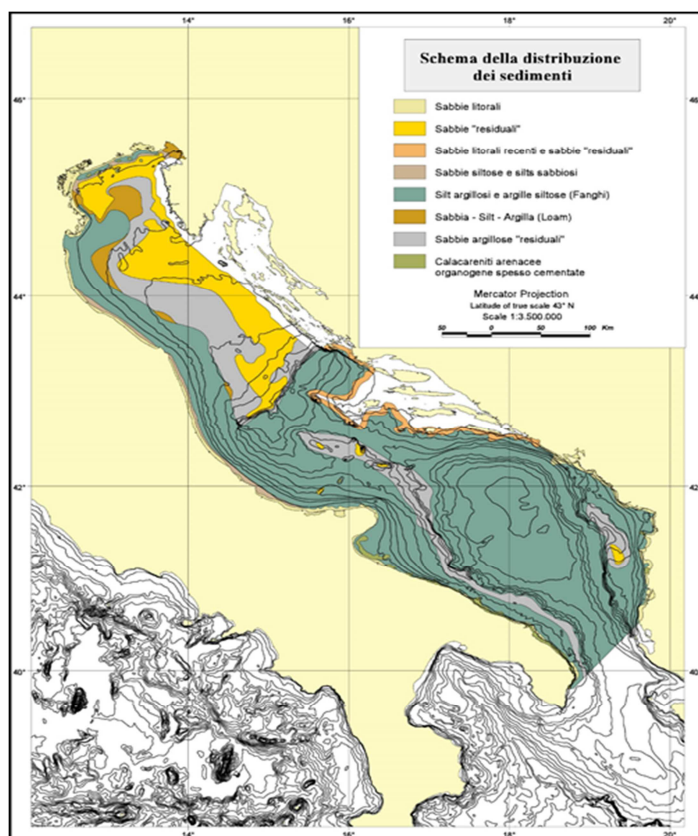


Figura 1 - Distribuzione dei sedimenti dell'Adriatico.

1.1.1 Circolazione

Le correnti marine dominanti tendono ad assumere una circolazione con senso antiorario il cui flusso in entrata risale lungo il versante orientale per poi discendere da quello italiano. Vortici e diramazioni dal flusso generale, in genere, si formano all'altezza del medio e alto Adriatico. Le caratteristiche della corrente risalente orientale, differiscono profondamente, in senso fisico-chimico, da quelle della corrente discendente occidentale. Dallo Ionio si immettono acque con elevata salinità, povere di nutrienti, con bassi livelli di biomassa fitoplanctonica in sospensione e, conseguentemente, con elevate trasparenze. Quelle discendenti tendono a subire un rilevante calo nei valori di salinità per i contributi di origine fluviali (Po' e altri fiumi minori), sono in genere ricche di sali nutritivi, con livelli di trofia medio alti (abbondante presenza di biomassa fitoplanctonica in sospensione) e più torbide (Fig. 2). Su questo modello di circolazione generale agiscono variabili stagionali dipendenti dalla forza e direzione dei venti dominanti e dallo stato fisico delle masse d'acqua in termini di temperatura, salinità e stratificazione (Rinaldi, 2008).

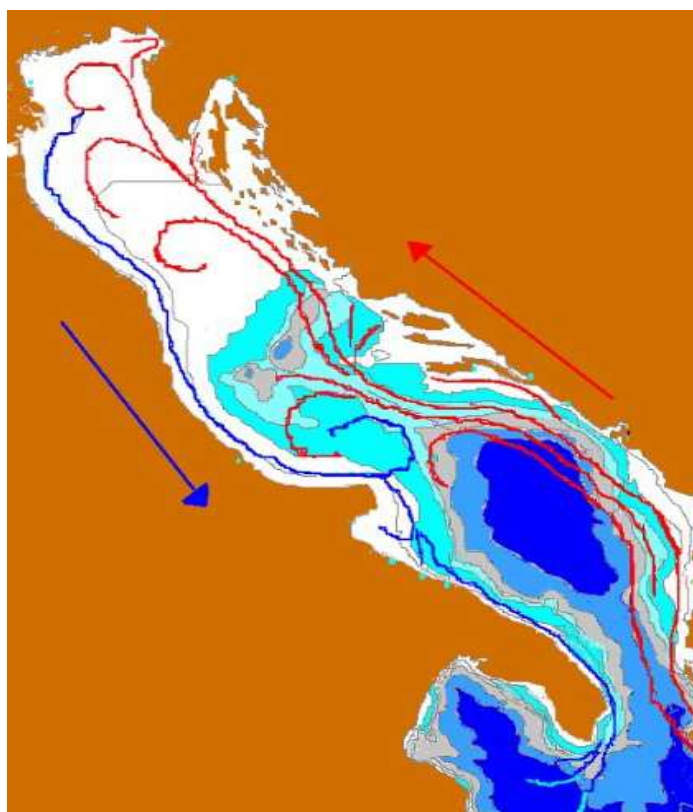


Figura 2 - Rappresentazione batimetrica e della circolazione delle correnti dominanti in Adriatico (Rinaldi, 2008).

1.1.2 Caratteristiche chimico-fisiche

Le acque superficiali sono sottoposte a un evidente ciclo stagionale, grazie allo scambio di calore con l'atmosfera, le escursioni stagionali di temperatura superano i 10°C (Artegiani et al., 1997a).

In estate, la temperatura superficiale è piuttosto uniforme nell'intero Adriatico con valori di circa 22-25°C in mare aperto; la temperatura sul fondo (Fossa di Pomo) è di 11.5°C.

In primavera-estate, è presente un termoclino ben sviluppato che separa nettamente le acque più calde dello strato superficiale dalle acque sottostanti.

In inverno, nella regione settentrionale e lungo la costa occidentale si evidenzia un marcato sistema frontale, mentre nella rimanente parte, la temperatura è piuttosto uniforme.

Infine, la salinità è abbastanza alta con valore medio di circa 38.3‰, inferiore alla salinità del Mediterraneo orientale ma superiore all'occidentale, e in generale, diminuisce da Sud verso Nord e dal mare aperto verso la costa (Buljan & Zore-Armanda, 1971, 1976).

1.1.3 Ecologia e risorse demersali

Il mare Adriatico riceve, dall'apporto fluviale, una grande quantità di nutrienti che determinano un'elevata produzione primaria (Buljan, 1964); l'eutrofizzazione riguarda principalmente le coste dell'alto-medio Adriatico, influenzandone tutti i livelli della catena trofica e determinando un'elevata produzione ittica (Piccinetti et al., 2012).

Negli ultimi decenni sono stati documentati diversi cambiamenti nella struttura della comunità demersale (Vrgoc, 2000). In primo luogo, a causa dell'impatto della pesca, in aumento fino al 2002, c'è stata una diminuzione della biomassa nel tempo, osservata in particolare per le specie demersali commerciali (Vrgoc et al., 2006; Coll et al., 2009; Krstulovic-Sifner et al., 2009).

L'abbondanza delle risorse (Jukic-Peladic et al., 2001; Coll et al., 2009), la distribuzione delle singole specie (Jukic-Peladic et al., 2001) e le fluttuazioni di biomassa dei livelli trofici bassi e medi (come piccoli pelagici, invertebrati e pesci demersali di taglia piccola e media) (Coll et al., 2009), potrebbero essere influenzati dai

cambiamenti temporali dei parametri ambientali e delle anomalie climatiche così come degli effetti diretti e indiretti della pesca (Jukic-Peladic et al., 2001; Coll et al., 2009).

1.1.4 Pesca a strascico

Le basse profondità e i fondi mobili che ricoprono gran parte dell'area, rendono l'Adriatico particolarmente adatto alla pesca a strascico per la cattura delle specie demersali (Piccinetti et al., 2012).

La pesca demersale in Adriatico, così come nel Mar Mediterraneo, in generale, è una pesca multispecifica con numerose specie bersaglio.

Lo sfruttamento della pesca si concentra su specie a ciclo vitale corto e sugli individui giovani sotto i due-tre anni di età, per cui l'abbondanza di molte specie risente più delle fluttuazioni del reclutamento piuttosto che variare in risposta allo sforzo di pesca (Bombace, 1992; Piccinetti & Piccinetti Manfrin, 1994; Arneri, 1996; Vrgoc et al., 2004).

Nel 1994, l'Unione Europea ha dato inizio ad una nuova ricerca sulle risorse demersali nell'ambito del programma MedITS. Il MedITS (Mediterranean International Trawl Survey) è un programma di ricerca di pesca a strascico internazionale, che si effettua sia sulla platea continentale che sulla scarpata, da 10 a 800 metri di profondità, ideato per fornire le informazioni di base sulle risorse demersali nel Mar Mediterraneo, in termini di distribuzione e di struttura demografica delle popolazioni. Attualmente, vi partecipano 11 nazioni (Relini et al., 2008).

1.2 Cenni della biologia del nasello (*Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758)

Il nasello è uno degli stock di pesci demersali più importanti delle acque europee; può vivere fino a 20 anni circa, e raggiungere la taglia massima di 130 cm e un peso di 15 kg. In accordo con Jardas (1996), la lunghezza media dello stock catturato in Adriatico con lo strascico è riscontrata tra i 10 e i 60 cm, composto da individui di 0+, 1+ e 2+ anni di età (FAO 2010-2014).

1.2.1 Descrizione

Il corpo del nasello è lungo e cilindrico; presenta una testa ampia, lunga e depressa dorso-ventralmente, mentre, il muso è conico; la parte superiore presenta una depressione delimitata da due basse creste ossee a forma di V (Tortonese, 1975). La bocca, ampia e prominente, presenta due/tre serie di denti acuminati, di cui quelli della serie esterna sono fissi corti e appuntiti, mentre quelli interni sono più lunghi e pieghevoli all'indietro (Bini, 1968). L'occhio è rotondo e non molto grande.

Le pinne sono sprovviste di raggi spinosi. La pinna dorsale è corta e triangolare, mentre la seconda è lunga fino al peduncolo caudale. La pinna anale è simile, per dimensioni e simmetria, alla seconda dorsale. La pinna caudale è a spatola e le ventrali, in posizione giugulare, hanno dimensioni simili alle pettorali (Bombace & Lucchetti, 2011) (Fig. 3).

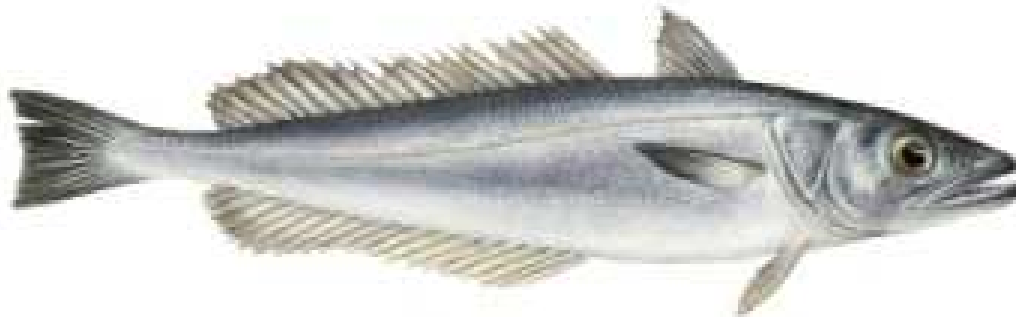


Figura 3 - *Merluccius merluccius*. Regno: Animalia, Phylum: Chordata, Classe: Actinopterygii, Ordine: Gadiformes, Famiglia: Merlucciidae, Classificazione: Linnaeus 1758 (www.ec.europa.eu).

1.2.2 Distribuzione

In accordo ai dati disponibili, il nasello è distribuito in tutto l'Adriatico (Fig. 4).

La distribuzione batimetrica è dai pochi metri, nelle aree costiere, fino agli 800 metri nella fossa del Adriatico meridionale (Kirinčić & Lepetić, 1955; Županović & Jardas, 1986; Ungaro et al., 1993; Jukić et al., 1999).

Ci sono solo delle aree ristrette a nord del Delta del Po' dove non sono registrate catture (Jukić & Arneri, 1984; Frattini & Paolini, 1995; Frattini & Casali, 1998).

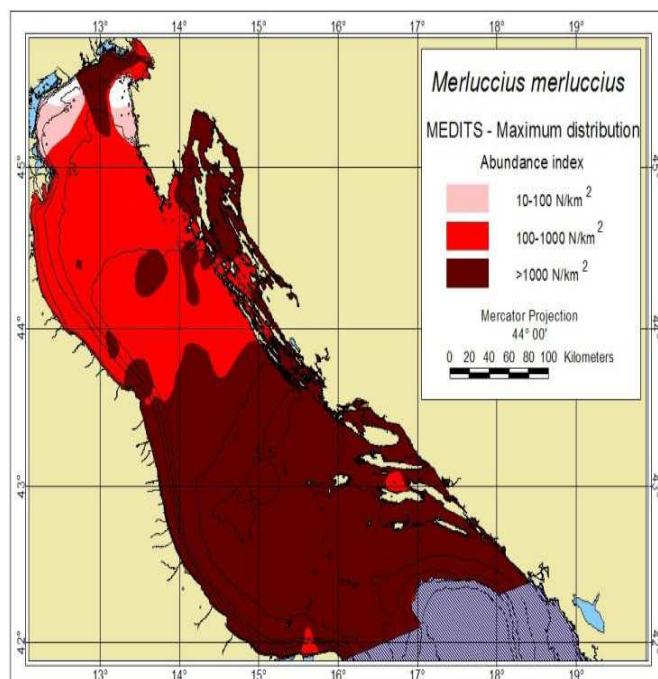


Figura 4 - Mappa della distribuzione del nasello nell'alto-medio Adriatico (Piccinetti et al., 2012).

1.2.3 Habitat

Questa specie nectobentonica è molto abbondante in fondali fangosi, sabbiosi o fangosi-sabbiosi tra 100 e i 200 metri, dove le catture sono principalmente composte da giovanili (Ghirardelli, 1959b; Županović, 1968; Jukić & Arneri, 1984; Flamigni, 1984; Giovanardi & Rizzoli, 1984; Bello et al., 1986; Županović & Jardas, 1989; Ungaro et al., 1993; Vrgoč, 2000).

Durante il giorno, il nasello rimane sul fondo, ma nella notte si muove verticalmente negli strati superiori (Jardas, 1996). In aggiunta alle migrazioni circadiane, effettuano anche migrazioni orizzontali per la ricerca del cibo.

1.2.4 Migrazioni stagionali

Nei mesi primaverili, ci sono dei locali movimenti dei naselli giovanili, sessualmente immaturi, nelle acque del fondale dell'Adriatico centrale e delle isole Croate. Gli adulti del nasello migrano nel fondale dalle acque costiere per la deposizione delle uova.

Durante il periodo invernale, dopo aver deposto le uova, i pesci adulti migrano dagli strati profondi insieme ai giovanili (Županović & Jardas, 1989).

1.2.5 Riproduzione

Nell'Adriatico, le femmine di nasello depongono le uova durante tutto l'arco dell'anno, ma con differenti intensità, per 4 o 5 volte nel loro ciclo vitale. I picchi di deposizione sono massimi nei periodi estivi e invernali, mentre il reclutamento ha due differenti picchi, primavera e autunno, e sono principalmente distribuiti tra i 40 e i 200 metri (Karlovac, 1965; Županović, 1968; Županović & Jardas, 1986, 1989; Jukić & Piccinetti, 1981; Ungaro et al., 1993).

Le aree di nursery sono localizzate nelle fosse di Pomo/Jakuba, tra i 150 e 200 metri, nella parte superiore dello slope (Županović, 1968; Jukić & Arneri, 1984; Županović & Jardas, 1986; 1989; Frattini & Paolini, 1995; Frattini & Casali, 1998).

1.2.6 Maturità sessuale e lunghezza totale

Gli individui maschi hanno differenti tassi di crescita rispetto alle femmine, raggiungendo taglie più grandi rispetto ai maschi, che crescono più lentamente dopo l'età di maturazione tra i 3/4 anni di vita. Conseguentemente, la proporzione di maschi all'interno della popolazione è più alta nelle classi di lunghezza minore.

Nell'alto-medio Adriatico, le femmine risultano dominanti nella popolazione, con lunghezze dai 30 ai 33 cm. La cattura degli individui, con le reti da strascico, al di sopra dei 38 cm sono per la maggior parte femmine (Vrgoč, 2000).

1.2.7 Alimentazione

Il nasello, nel primo anno di vita, si nutre principalmente di crostacei (Euphasiacea, Mysidacea e Amphipoda). Durante questo periodo, vivono prevalentemente nelle fosse di Pomo/Jakuba e nella regione della fossa dell'Adriatico meridionale.

La loro migrazione, dalle aree di nursery (Pomo/Jakuba) verso le coste orientali dell'Adriatico, è legata al cambiamento dell'alimentazione, prediligendo una dieta composta da piccoli pelagici: sardine (*Sardina pilchardus*), sfratti (*Sprattus sprattus*), acciughe (*Engraulis encrasicolus*), e piccoli cefalopodi (Kirinčić & Lepetić, 1955, Karlovac, 1959; Županović, 1968; Piccinetti & Piccinetti Manfrin, 1971a; Jukić, 1972; Froglija 1973; Jardas, 1976; Ungaro et al., 1993; Stagioni et al., 2011).

1.2.8 Gestione

In accordo con le statistiche della FAO, i dati raccolti dalle campagne MedITS dal 1996 al 2012 suggeriscono delle fluttuazioni di *Merluccius merluccius* in termini di indici di abbondanza, biomassa, frequenza e peso medio (Fig. 5) (Piccinetti et al., 2012).

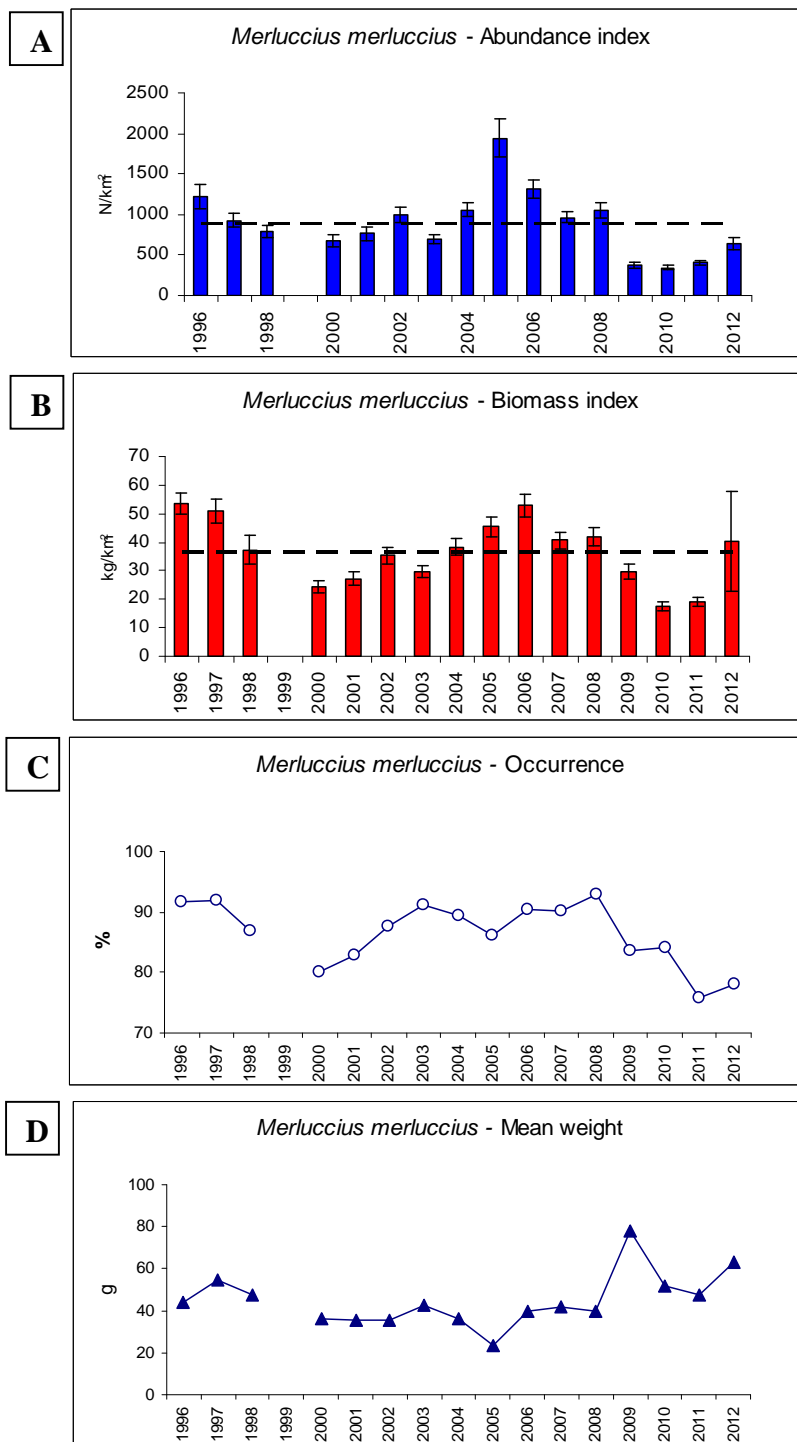


Figura 5 – Statistiche FAO (A) Indice di abbondanza; (B) Indice di biomassa; (C) Indice di frequenza; (D) Indice di peso medio (Piccinetti et al., 2012).

1.3 Otoliti

1.3.1 Descrizione e funzione

L'orecchio interno dei pesci è localizzato nella parte posteriore del cranio ed è una struttura complessa composta da canali, sacche e dotti, riempiti da emolinfa.

I Teleostei hanno tre canali semi-circolari disposti ortogonalmente l'un l'altro e si aprono all'interno di camere estese interconnesse o sacchi otici che contengono un tessuto sensoriale, la macula, che rileva il suono e l'accelerazione angolare (Tab. 1) (Panfili et al., 2002). Ognuna di queste tre sacche otiche, il sacco, l'utricolo e la lagena, contiene una coppia di otoliti, rispettivamente le sagitte, i lapilli e gli asterischi. In generale, gli otoliti funzionano come meccanorecettori quando vengono stimolati dalle chinocilia della macula (Cordier & Dalcq, 1954; Weichert & Prech, 1981; Hildebrand, 1988; Jobling, 1995).

Ogni otolite è fissato sulla macula dalla membrana otolitica, all'interno della quale sporgono le ciglia sensoriali (Tab. 1).

Descrizione

Gli otoliti, inoltre, si differenziano per funzione, dimensione, forma e microstruttura (Fig. 6 a-b) (Secor et al, 1992).

Le differenze delle loro caratteristiche principali (taglia, specificità morfologica, accessibilità, composizione chimica, microstrutture, stadio ontogenico) riflettono la filogenesi e il differenziamento, tenendo in considerazione la variazione intraspecifica, a causa della genetica e delle influenze ambientali (Lombarte & Leonart, 1993; Nolf, 1995; Torres et al., 2000), e interspecifica determinata dal differenziamento delle forme. La morfometria dell'otolite è stata utile nella tassonomia (Hecht, 1979), e quindi nell'identificazione delle specie e negli studi delle variazioni geografiche nelle popolazioni (Messieh et al., 1989; Castronguay et al., 1991; Campana & Casselman, 1993; Friedland & Reddin, 1994). Inoltre, la crescita degli otoliti è relazionata con la crescita del pesce e ai cambiamenti ambientali dell'habitat (Morales-Nin, 1987a).

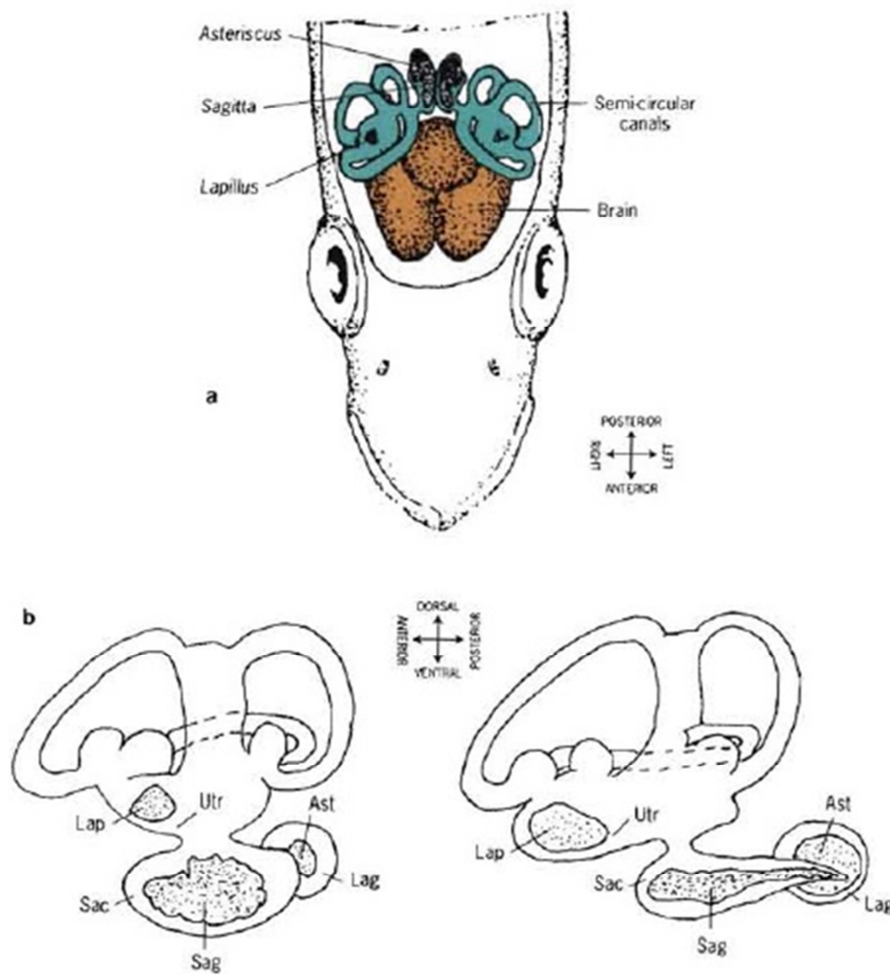


Figura 6 - Localizzazione degli otoliti nell'orecchio interno dei Teleostei; a) Visione dorsale dell'apparato vestibolare; b) Gli otoliti all'interno del sistema del labirinto (Secor et al., 1992).

In particolare, le sagitte sono gli otoliti con la più ampia variabilità morfologica e per questo motivo sono le più studiate dalla comunità scientifica per la stima di età (Assis, 2005).

In letteratura, il termine "otolite" è spesso usato per descrivere una delle tre paia, generalmente la sagitta, ma è importante definirlo in ogni studio.

L'otolite ha tre piani di orientamento: sagittale, frontale e trasverso (Fig. 7). Questo orientamento deve essere definito attentamente nella descrizione delle preparazioni di ogni otolite, e le referenze devono essere sempre fatte per la terminologia standardizzata (es. sezione trasversale, sagittale o frontale).

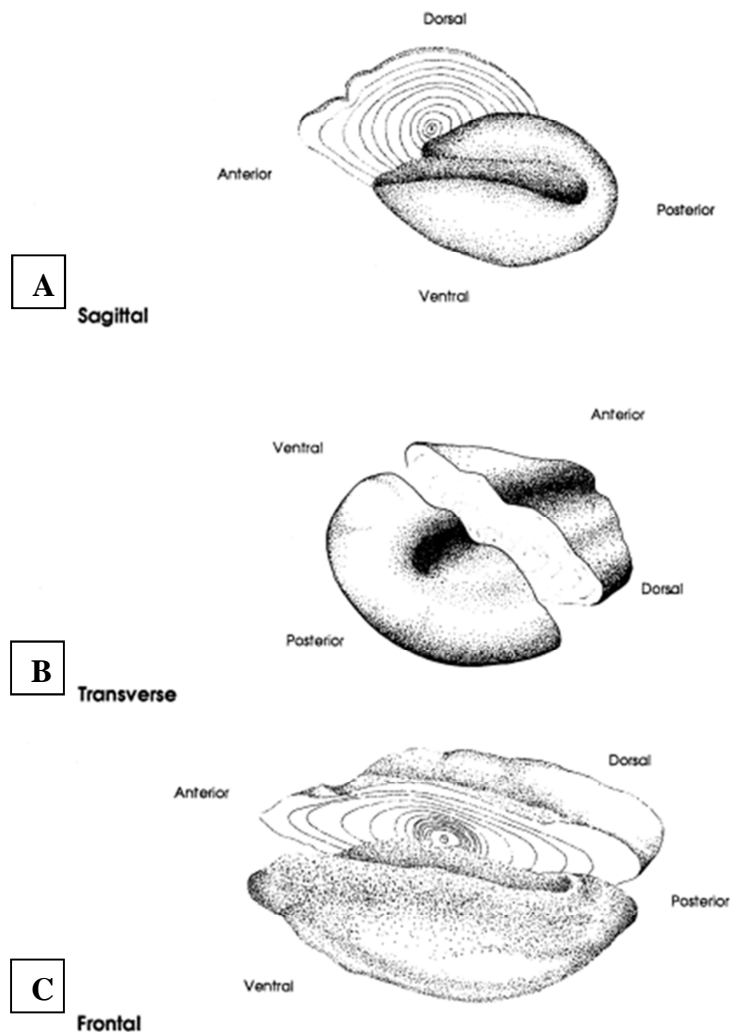


Figura 7 - Mostra dei piani di sezionamento tipici della sagitta. (A) Piano sagittale; (B) Piano trasverso; (C) Piano frontale (Secor et al. 1991).

Forme delle sagitte

In molti pesci epipelagici, pelagici e di profondità, la parte dorsale e ventrale degli otoliti è asimmetrica, il che rende la sagitta a forma di farfalla.

Le sagitte, generalmente di forma ellittica, sono caratterizzate da una zona prossimale convessa ed una distale concava, con un asse di accrescimento orientato lungo la direzione antero-posteriore. Il lato convesso o prossimale è diviso in due aree da un solco profondo, il solco acustico (Tab. 1), che comunica con l'epitelio sensoriale (la macula) e sul quale si inseriscono le fibre nervose provenienti dalle pareti del sacculo (Panfili et al., 2002).

Il solco acustico è una delle caratteristiche più importanti delle sagitte, spesso è molto utile per l'identificazione delle specie.

L'otolite è comunemente diviso in due sezioni, l'ostium e la cauda, limitati da evidente margine orlato, la crista, frequentemente sollevata dalla superficie (o culliculum.). L'ostium è anteriore e generalmente raggiunge il margine anteriore della sagitta; la cauda è posteriore, frequentemente ottusa e con la punta curvata ventralmente, ma non raggiunge il margine posteriore (Fig. 8).

Tre strutture potrebbero essere identificate nella regione anteriore: il rostrum, l'antirostrum e l'excisura ostii. Il rostrum è una protuberanza nel margine anteriore; l'antirostrum è una prominenzza più piccola rispetto al rostrum (Tab. 1). La forma di entrambi potrebbe essere descritta come delle punte rotondeggianti o acuminati. L'excisura ostii è la porzione del margine anteriore dove si apre l'ostium, localizzata tra il rostrum e l'antirostrum, quando entrambe sono ben differenziate.

Nella regione posteriore dello stesso otolite potrebbero essere sviluppate un gruppo di strutture simili, chiamate, il postrostrum, il postantirostrum e il excisura caudalis (Tab. 1) (Tuset et al., 2008).

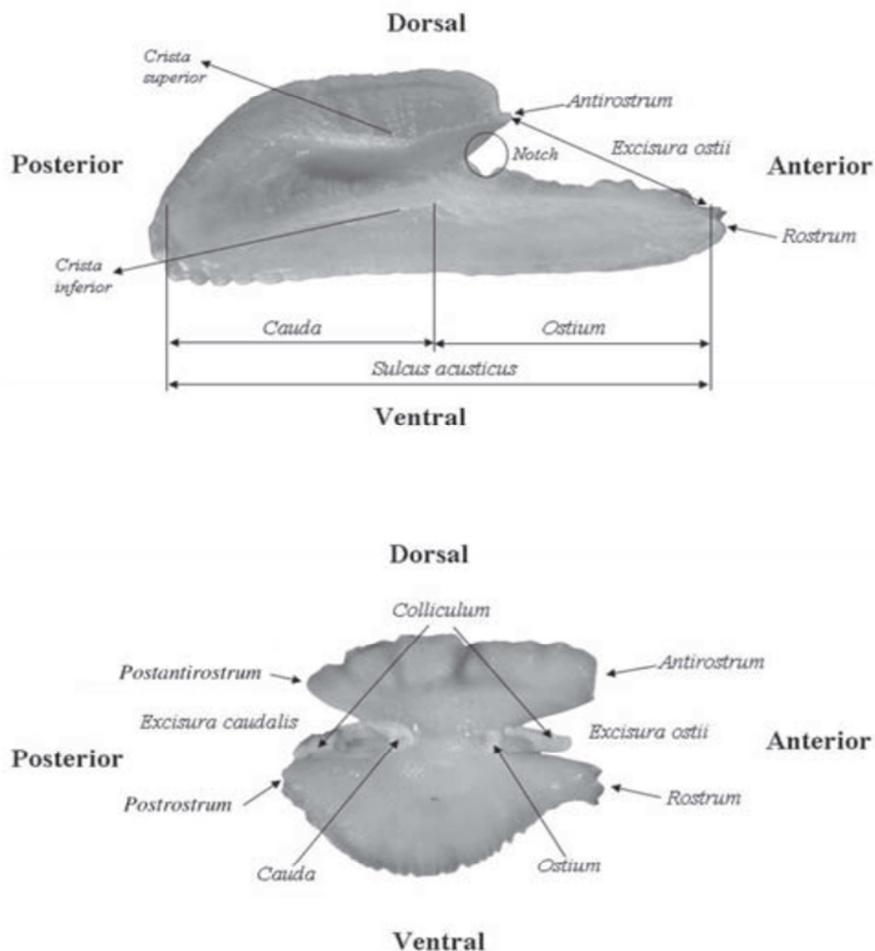


Figura 8 – Visione della superficie della sagitta con le caratteristiche più rilevanti (Tuset et al., 2008).

Caratteristiche della forma di otolite del *Merluccius merluccius* (Fig. 9)

Forma: lanceolata, margini dorsali e posteriori da lobati a dentati.

Solco acustico: omosulcoide, mesiale anche se potrebbe apparire ostio-caudale, sopramediale, delicatamente concavo dorsalmente.

Ostium: ellittico, ampio, più corto della cauda, si chiude con il margine anteriore.

Cauda: ellittica, ampia, separata dall'ostium e finendo con il margine postero-dorsale.

Regione anteriore: da rotondo a obliquo.

Margine posteriore: da appuntito a lanceolato (Tuset et al., 2008).

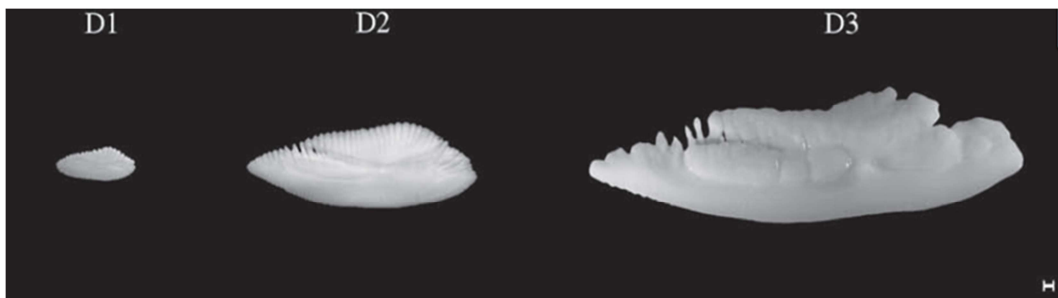


Figura 9 – Otoliti di *Merluccius merluccius*. Lunghezza totale: D1= 154 mm (NEA); D2= 530 mm (WM); D3= 988 mm (CEA). Scala= 1 mm (Tuset et al., 2008).

Gli otoliti sono formati, extracellularmente, dalla cristallizzazione di aragonite (carbonato di calcio) su una matrice organica composta da proteine cheratiniche, ricca in residui di aspartato e glutammato (Degens et al., 1969; Watabe et al., 1982; Morales-Nin, 1987a), crescono o si accrescono dall'aggiunta di strati concentrici di proteine e carbonato di calcio, risultando una struttura simile ad una cipolla.

Funzioni

I labirinti dei pesci sono coinvolti nel mantenimento dell'equilibrio e sono costituiti da cellule nervose sensibili alla pressione, alla gravità, ai movimenti angolari e alle vibrazioni del suono (Grassè, 1958; Lowenstein, 1971; Blacker, 1974).

Gli otoliti svolgono due fondamentali funzioni:

1. Percezione dei suoni (funzione acustica);
2. Percezione dell'accelerazione angolare e di gravità (funzione di equilibrio).

Queste due funzioni, morfologicamente, corrispondono a due differenti parti dell'orecchio interno dei pesci Teleostei. La parte superiore dell'orecchio interno, formato da utricolo e dal canale semicircolare, controlla principalmente la funzione di equilibrio, la parte inferiore costituito dal sacculo e dalla lagena, è specializzata nella ricezione del suono (Panfili et al., 2002).

Gli otoliti sono coinvolti nella meccanorecezione, sono dei trasduttori elettromeccanici di suono e di dislocamento, in grado di convertire le forze in impulsi elettrici attraverso il movimento delle chinocilia (Popper & Hoxter, 1981).

Il relativo movimento tra l'epitelio sensoriale e l'otolite piega il gruppo ciliare e stimola i nervi craniali. Inoltre, gli otoliti aggiungono volume nello strato gelatinoso dei tre sacchi otici, incrementando la loro sensibilità alla gravitazione e altre forze di accelerazione lineare (Ross & Pote, 1984).

1.3.2 Incrementi periodici

Le variazioni delle proporzioni di calcio e di proteine che costituiscono l'otolite, causano la formazione di anelli, di incrementi o in generale di patterns di crescita di varie periodicità (da giornaliera a stagionale) (Dannavig, 1956; Morales-Nin, B., 1987a).

Gli otoliti mostrano un range di strutture incrementali che spesso sono formati da anelli giornalieri, nella parte più interna, fino agli accrescimenti annuali. La stima dell'età dei pesci dipende dalla visibilità dei cambiamenti nella crescita degli otoliti.

I patterns di crescita di maggiore interesse sono:

- Incrementi primari o giornalieri, permettono la risoluzione dei giorni;
- Zone stagionali, risoluzione dei mesi o della crescita stagionale;
- Incrementi annuali, risoluzione degli anni;
- Discontinuità delle ultra-strutture, corrispondenti a vari tipi di stress non necessariamente presenti durante la vita dell'individuo (Panfili et al., 2002).

1.3.2.1 Incrementi primari

Gli incrementi primari sono formati da deposizioni successive di minerale e di matrice, attorno al *core* (Watabe et al, 1982; Morales-Nin, 1987a; Mugiya, 1987; Zhang & Runham, 1992a).

Diversi nomi sono stati attribuiti a questi incrementi primari. In una review, sono stati proposti i termini L-and-D-zones (Kalish et al., 1995), rispettivamente per gli strati di minerale e di matrice, e riferiti al loro aspetto bipartito (chiaro e scuro) osservato sotto luce trasmessa. Inoltre, la differenza nella composizione chimica può donare un aspetto differente al SEM (microscopio a scansione elettronica) dopo l'etching acido. La zona L ricca in carbonato di calcio appare come solchi, mentre la zona D ricca in proteine e povera di calcio appare come in rilievo.

Pannella (1971; 1974), il primo a scoprire gli incrementi primari negli otoliti, ha suggerito l'ipotesi che si trattassero di depositi giornalieri. L'ampia letteratura sugli incrementi giornalieri ha guidato i ricercatori nel dedurre che gli incrementi giornalieri potrebbero essere formati giornalmente dopo un po' di tempo dopo la schiusa. Comunque, un'assunzione così non è valida per numerose ragioni, e infatti, gli incrementi giornalieri degli otoliti potrebbero non essere giornalieri o facilmente distinguibili in tutte le specie (Geffen, 1982; McGurk, 1984; Al-Hossaini & Pitcher, 1988; Morales-Nin, 1992). La comparazione tra gli operatori ha mostrato che le strutture degli otoliti sono spesso interpretate differentemente da differenti lettori (Campana & Moksness, 1991).

La deposizione giornaliera degli incrementi, generalmente, sembra cessare nello stadio adulto (Pannella, 1971; 1980). In alcuni casi, questa apparente cessazione potrebbe essere relazionata alla formazione di un vero restringimento degli incrementi di crescita sotto la risoluzione limite del microscopio ottico (Morales-Nin, 1988; Morales-Nin & Ralston, 1990).

Gli incrementi primari sono solo visibili ad alto ingrandimento (microscopio ottico o elettronico). Variano in taglia dal 1 a 12 μm (Pannella, 1974). La larghezza della zona D- è sempre inferiore a 1 μm (circa dai 200 a 500 nm) rispetto alla larghezza della zona L- che è molto variabile (dai 0.4 ai 10 μm).

Infine, a causa della crescita non uniforme degli otoliti, la larghezza degli incrementi dipenderà dall'asse, il quale sarà misurato nella sezione.

Primordium

L'otolite sviluppa i primordia, strutture parzialmente calcificate esocitati dalle cellule epiteliali dell'orecchio interno (Mann et al., 1983). Questi, definiti anche *core* (Tab.1) sono dei granuli primordiali, di forma circolare allungata, e il loro numero dipende dalla specie.

In molti casi, i primordia si fondono a formare un unico *core* dell'otolite.

Nelle sagitte, i granuli potrebbero essere composti dalla vaterite, mentre il resto del primordium è tipicamente aragonite.

Primo anello

Gli otoliti, sviluppano il primo anello di accrescimento nella parte finale dello stadio di uovo. Questo primo incremento (Tab. 1) potrebbe non avere alcune basi fisiologiche in tutte le specie, ma comunque, le procedure di conteggio sono facilitate, in quanto è utile come punto di riferimento (Neilson & Geen, 1982).

In alcune specie, sono stati osservati gli incrementi, formati prima della schiusa, ma non è ancora stato dimostrato in maniera conclusiva se questi incrementi sono delle vere strutture o solamente degli artefatti ottici. L'opacità degli incrementi pre-schiusa è differente rispetto i primi incrementi post-schiusa. Queste strutture sono molto visibili nelle larve che presentano otoliti molto piccoli.

In diverse specie, il primo incremento potrebbe essere formato del giorno della schiusa, e quindi può essere definito come *hatch-ring*.

Centri di crescita accessoria

Durante la fase larvale, molti otoliti continuano ad accrescersi intorno al primordium. Negli otoliti di molte specie, oltre ai piani di crescita, si formano degli stadi di sviluppo tardivi che danno origine a nuove serie di incrementi, definiti come centri di crescita accessoria.

La formazione dei centri di crescita accessoria potrebbe essere collegata alla combinazione di fisiologia, habitat e comportamento.

Queste strutture sono state ritrovate in molte specie che subiscono un marcato cambiamento di habitat durante il passaggio da stadio larvale a quello giovanile.

1.3.2.2 Incrementi stagionali e annuali

Gli incrementi stagionali sono anche definiti zone stagionali, o *seasonal-checks* (Tab.1), e spesso sono distinguibili sugli otoliti. Queste zone possono essere visibili sia in otoliti interi (non trattati) e/o dopo essere sottoposti a una determinata preparazione.

In aggiunta al loro aspetto macroscopico, le due zone stagionali differiscono in larghezza, spessore, taglia dei cristalli di aragonite (Morales-Nin, 1987a), in frequenza delle discontinuità di crescita (Mugiya et al., 1985), al rapporto tra carbonato di calcio e strati organici (Casselman, 1974; 1982; 1987; Mugiya, 1984), e ai rapporti elementari (Casselman, 1982; 1983; Kalish, 1989; 1991a), rispetto gli incrementi primari. E' la combinazione di questi fattori che conduce alla differenza in densità ottica delle due zone.

Le zone stagionali possono raggiungere la larghezza di poche centinaia di micron e quindi, possono essere visibili ad occhio nudo o basso ingrandimento.

Discontinuità strutturali

Le strutture di discontinuità sono degli intervalli all'interno dell'irraggiamento degli incrementi primari (Tab. 1) (Pannella, 1980; Campana & Neilson, 1985; Gauldie, 1987; Morales-Nin, 1987a; Gauldie & Nelson, 1988).

Sono tipiche in tutte le specie e sono probabilmente indotte da disturbi o stress che affliggono gli individui nel loro biotopo.

Queste potrebbero interrompere la successione degli incrementi stagionali o giornalieri in maniera ciclica o aciclica, e possono essere distinguibili sotto alto, o alcune volte a basso ingrandimento, comunemente dopo opportuna preparazione.

Le discontinuità riguardano i pattern di crescita o la direzione di crescita, e generalmente appaiono, dopo l'*etching* acido, come delle scanalature nella superficie dell'otolite in quanto ricche di materia organica (Morales-Nin, 1986b).

Molti studi hanno dimostrato la relazione tra la formazione delle discontinuità e gli eventi di sviluppo di molte specie, come il cambiamento dalla vita pelagica a quella demersale (*settlement*), oppure in relazione ai cambiamenti ambientali, in quanto molto sensibili alla temperatura e alle sue fluttuazioni (Pannella, 1980). In altri casi, rappresenta un interruzione di crescita non conosciuta, e l'interpretazione nella stima di età giornaliera potrebbe essere ambigua (Campana & Neilson, 1985).

Quando la durata della formazione della discontinuità è nota, per esempio con un anello di stress invernale, le strutture possono essere utili per la stima dell'età annuale.

Zone di crescita secondarie

In diverse specie, la stima degli incrementi annuali è reso difficoltoso dalla presenza di zone “secondarie”, termine applicato ad una serie di zone non-stagionali di differente opacità e spessore. Due rilevanti tipologie di zone secondarie sono i falsi anelli e gli anelli frazionati.

I falsi anelli appaiono come zone traslucenti all’interno di una zona opaca e sono particolarmente comuni nel primo anno di età, e in molti casi è facile confonderli con il primo incremento annuale.

Gli anelli frazionati, invece, appaiono come strutture doppie, quasi come se fossero composti da due inusuali bande sottili traslucenti separate da una vera banda opaca.

I problemi nella distinzione tra le zonazioni secondarie e le stagionali è una delle maggiori cause di errori nella lettura dell’età. Non ci sono dei criteri oggettivi per l’identificazione delle strutture secondarie, nonostante estese reviews.

Le cause di queste strutture secondarie sono poco conosciute, sebbene numerosi fattori, che includono la temperatura, il consumo di cibo e gli stadi di sviluppo, sono implicati in queste formazioni (Panfili et al., 2002).

Tabella 1. Glossario di nomenclatura e dei termini microstrutturali degli otoliti

Zone di accrescimento	Zone costituite da incrementi giornalieri formati principalmente da carbonato di calcio aragonitico come dimostrato da Dunkerlmerger et al., (1980), Watabe et al., (1982), e Mugiya (1987). L'esaminazione ultrastrutturale ha mostrato in questa zona dei cristalli allungati perpendicolari al perimetro dell'otolite.
Antirostrum	Come un pollice a protezione della sagitta. E' localizzato dorsalmente al rostro.
Core	Area calcificata esistente all'interno dei primi incrementi (prima zona di discontinuità) depositati. Termini relazionati come "nucleo" e "kernel" sono ambigui e non comunemente usati negli studi di microstrutture (Wilson et al., 1987).
Zone di discontinuità	Zone costituite da incrementi giornalieri formati principalmente da carbonato di calcio aragonitico come dimostrato da Dunkerlmerger et al., (1980), Warabe et al., (1982), e Mugiya (1987). Zone preferibilmente disciolte quando acidi deboli (es. basse concentrazioni di HCl o EDTA) sono applicati a formare dei solchi, osservabili con il SEM.
Asse di crescita	Asse interno lungo l'otolite che cresce proporzionalmente al rapido rapporto di deposizione (Pannella, 1980a). Asse interno alle microstrutture dove le larghezze degli incrementi sono più grandi. Gli otoliti possono avere più di un asse di crescita, in ogni caso sono riferiti come maggiore o minore.
Incremento	Anello concentrico bipartito compreso zone di accrescimento di carbonato di calcio e zone di discontinuità organica.
Larghezza incrementale	Misura lineare dell'incremento, compreso tra una zona di accrescimento e una zona di discontinuità. Spesso misurati lungo l'asse di crescita maggiore.
Macula	Epitelio sensoriale costituito da cellule ciliari sensoriali e cellule di supporto. Lo spostamento delle ciglia della macula agisce come meccanorecettore dell'udito. Nel vestibolo sacculare è localizzato lungo il solco della sagitta.
Membrana otolitica	Membrana non cellulare che aderisce all'otolite.
Primordia	Sito di iniziale deposizione di matrice organica e carbonato di calcio. Tipicamente posizionato nel <i>core</i> , il primordia potrebbe fondersi o rimanere separato, formando molteplici <i>core</i> .
Postrostrum	Porzione posteriore dell'otolite. Può anche essere riferito all'intero margine posteriore della sagitta.
Rostrum	Porzione anteriore dell'otolite.
Solco	Solco scolpito lungo la superficie distale della sagitta.
Vestibolo	Sacca strutturale in cui è contenuto l'otolite. Costituito da tessuto epiteliale. Il vestibolo lagenario contiene i lapilli, il vestibolo sacculare le sagitte, e il vestibolo utricolare contiene l'asteriscii.

1.3.3 Regolazione dei depositi incrementali

Le influenze esogene sugli incrementi periodici primari

Parecchi studi hanno esaminato le relazioni tra la formazione degli incrementi e i fattori ambientali. Pannella (1980) ha suggerito che, in alcune specie, gli incrementi periodici potrebbero essere relazionati al numero di picchi massimi durante l'attività di alimentazione.

Brothers (1981) ha indicato come la crescita sia sensibile alle fluttuazioni delle temperature e come l'induzione termica marca gli otoliti e riduce la crescita a improvvise e drastiche variazioni di temperature (Volk et al., 1994).

La regolazione esogena degli incrementi periodici annuali

Al momento, la regolazione degli incrementi formati annualmente negli otoliti non è ben conosciuta, sebbene sia assodato che le zone stagionali sono relazionate alla stagionalità della crescita somatica e dei fattori ambientali. Le variazioni stagionali sono relazionate ai cambiamenti fisiologici nei pesci come, ad esempio, l'inizio dell'attività riproduttiva o dell'accelerazione della crescita somatica, che occorrono in primavera.

La formazione delle zone in relazione all'attività riproduttiva è molto controversa, ed è difficile immaginare come potrebbe direttamente influenzare la composizione dell'otolite, in quanto le femmine durante la fase pre-riproduttiva presentano elevate concentrazioni di calcio nel plasma (Kalish, 1991a).

1.3.4 Validazione del rapporto di deposizione incrementale dell'otolite

Wilson et al. (1983) definisce la validazione come “la conferma del significato temporale degli incrementi”. È usata per definire l'accuratezza della stima di età. La validazione della deposizione degli anelli giornalieri può essere verificata con o senza il conteggio degli incrementi, invece, la somma potrebbe essere verificata senza la validazione del loro rapporto di formazione. Esistono quattro diverse tipologie di validazione del deposito di crescita incrementale dell'otolite, ognuno con appropriati requisiti e tecniche validate:

1. Rapporto di deposito, ad esempio, come la struttura dell'anello può essere usata per documentare la cronologia giornaliera e/o annuale, e quanto bene le informazioni applicate agli individui oltre al livello di popolazione;
2. Tempo di formazione dell'incremento iniziale, ad esempio, a quale età una larva inizia la deposizione continua e quanto bene la stessa è relazionata, all'incubazione, alla schiusa, e all'alimentazione;
3. Relazione della crescita somatica dell'otolite per retrocalcolo (*back-calculation*);
4. Meccanismi fisiologici di deposizione, ad esempio, i processi fisiologici e biochimici della formazione degli incrementi e degli effetti dei cambiamenti ambientali su essi.

In diverse specie, è spesso possibile validare gli incrementi giornalieri dalla schiusa o dalla prima alimentazione, in altre invece, non è possibile validarlo in maniera conclusiva, spesso il fallimento è attribuibile alla scarsa preparazione e all'affidamento del microscopio ottico (Campana & Neilson, 1985; Karakiri et al., 1991). Comunque, i ritmi giornalieri risultati nella formazione dei continui incrementi potrebbero non essere sviluppati prima della fine della fase larvale (Geffen, 1982; Rè et al., 1985; Mosegaard et al., 1988; Maillet & Checkley, 1990).

Idealmente, la validazione dovrebbe implicare il monitoraggio della popolazione marcata e degli individui marcati dalla schiusa attraverso la metamorfosi (o qualunque punto d'arrivo che sarà studiato in campo); in questo modo, l'informazione sia della popolazione che degli individui sarebbe ottenuta simultaneamente. Il pesce dovrebbe essere allevato sotto condizioni che contribuiscono ad una buona crescita, attività di alimentazione, e comportamento nuotatorio (includendo le migrazioni verticali).

In generale, i metodi preferiti per gli studi di validazione sono quelli che mantengono il pesce in natura o sotto condizioni controllate di laboratorio, ma che forniscono buona crescita e comportamento naturale (es. mesocosmo), evitandone gli effetti della cattività. Le condizioni di laboratorio, spesso, influenzano la crescita larvale, dei giovanili e del pesce adulto, e le differenze sono state osservate dalla natura ottica degli incrementi dell'otolite prodotti dalle larve allevate nel laboratorio da quelle catturate in natura (Campana & Neilson, 1985; Rice et al., 1985; Hovenkamp, 1990). Per queste ragioni, le deviazioni dai tassi giornalieri della deposizione incrementale sono attribuibili ad artefatti di laboratorio (Collins et al., 1989).

Probabilmente, per la validazione degli studi, l'ambiente ottimale potrebbe essere all'interno di grandi gabbie esterne, dove fotoperiodo e temperatura riflettono le condizioni naturali. Dall'altra parte, i cicli di deposizioni incrementali osservati sotto condizioni manipolate di luce, temperatura, alimentazione, etc. mostrano sensibilità nella crescita dell'otolite.

I metodi di validazione possono essere organizzati in accordo al tipo di studio che si vuole implementare.

1.3.4.1 Rapporto di deposizione

Possono essere usate diverse tecniche per validare il rapporto di deposizione incrementale, ed è un prerequisito per gli studi di analisi degli otoliti di ogni specie, e talvolta è necessario per stock con differenti aree di riproduzione o località geografiche.

Le tecniche di validazione includono il monitoraggio dell'età delle larve, la marcatura degli otoliti, le inferenze statistiche, le inferenze da pesci più adulti, e le analisi degli incrementi marginali (Panfili et al., 2002).

Marcatura degli otoliti

L'unico metodo diretto disponibile per la validazione del rapporto di deposito di un individuo è dato dal conteggio degli anelli definiti da otoliti sottoposti alla marcatura all'inizio del periodo sperimentale, e ad intervalli successivi. I dati generati da questo metodo includono, per ogni individuo, il numero degli anelli depositati tra date conosciute. La marcatura degli otoliti è probabilmente il miglior metodo per la validazione nelle specie in cui non è possibile l'allevamento in laboratorio. Comunque, lo sforzo richiesto per la cattura, la marcatura e la ricattura di un numero sufficiente di individui potrebbe essere davvero troppo costoso in termini di tempo e costi.

1. Marcatura con componenti chimiche

Un grande numero di embrioni, larve, giovanili e adulti possono essere marcati in sicurezza, in modo da garantire sia la sopravvivenza, ma anche l'incorporazione e il mantenimento della marcatura stessa.

Il miglior metodo per la validazione del rapporto di deposizione degli incrementi sia nelle larve che nei giovanili di età non conosciuta, è attraverso le iniezioni o immersioni con tetraciclina o altri fluorescenti. Dopo marcatura, i pesci dovrebbero essere

campionati periodicamente per determinare il numero di depositi incrementali dalla data di inizio.

Tre sono i composti raccomandati per la marcatura con componenti chimiche: gli antibiotici tetracicline (includono le tetracicline (TC) e l'oxitetracicline (OTC)), la calceina verde fluorescente, e i complessi alizarinici. Sono tutti composti fluorescenti in grado di essere incorporati all'interno della struttura dell'otolite, in un solo giorno di contatto, e saranno visibili usando la luce ultravioletta (UV).

2. Marcatura da stress

La crescita dell'otolite può essere manipolata da fattori esterni per produrre marcature permanenti e identificabili (Boehlert & Yoklavich 1985, Volk et al., 1984). La fluttuazione di temperatura, per larve ed embrioni, è la tecnica con più alto successo (Brothers, 1985).

Inferenza statistica

La validazione della formazione degli incrementi giornalieri potrebbe essere difficoltosa in alcune specie. I requisiti indiretti dell'inferenza statistica includono:

- 1) Dovrebbero essere esaminati un grande numero di larve;
- 2) Le larve dovrebbero provenire da popolazioni o siti di deposizione diversi e dovrebbero essere tutti soggetti alle stesse fluttuazione o eventi, e non devono esserci migrazioni di età o taglia-dipendenti all'interno o fuori dell'area di studio durante il periodo in questione;
- 3) Dovrebbe essere evitata l'estrapolazione dei risultati di un unico anno o per una singola popolazione.

➤ Regressioni delle lunghezze di cattura sulla somma degli incrementi

La relazione tra lunghezza e numero di anelli è qualche volta usato direttamente come una curva di crescita della popolazione. Sebbene, estremamente limitata come tecnica di validazione, questo metodo, se applicato in maniera corretta, è spesso usato per dedurre la deposizione degli incrementi giornalieri (Cowan, 1988; Ntiba & Jaccarini, 1988; De Vries et al., 1990).

➤ Conteggio a ritroso da eventi specifici (*Back-calculation*)

Le marcature rilevanti sugli otoliti sono relazionati agli eventi specifici di sviluppo o fenomeni ambientali. Il numero degli incrementi tra tempo di cattura e di marcatura, o tra la regione del *core* e un *hatch-check* o *settlement-check*, con un evento di data conosciuta, sono usati per la stima di età delle larve.

Il conteggio a ritroso può fornire un supporto alla validazione degli esperimenti.

Inferenza da pesci più adulti

È possibile utilizzare tecniche migliorate per la preparazione dell'otolite, per esaminare l'area del *core* dei pesci catturati come adulti (Secor et al., 1991).

La somma degli incrementi primari tra i vari annuli dovrebbe essere controllato al SEM (microscopio elettronico a scansione) (Morales-Nin, 1988).

Gli incrementi primari nei pesci più adulti sono spesso sottili e l'analisi al microscopio ottico può condurre a degli errori di conteggio, e ad una scarsa validazione.

In generale, questa tecnica non è una sostituzione per la diretta validazione su pesci giovani, specialmente dove gli operatori sono interessati nella determinazione di età delle larve per gli studi sul reclutamento.

1.3.4.2 Analisi dell'incremento marginale

L'analisi dell'incremento marginale è una tecnica diffusa usata per determinare i tempi della formazione dell'incremento annuale nei pesci adulti (Wenner et al., 1986; Maceina et al., 1987), ma nonostante l'analisi effettuata con il SEM non si ha sempre una definitiva conclusione (Withell & Wankowski, 1987).

Considerate le difficoltà nel discernere gli incrementi vicino al margine degli otoliti, questa tecnica potrebbe non essere presa in considerazione a meno che la crescita dell'otolite sia rapida e le larghezze degli incrementi siano ampie.

1.3.4.3 Tempi della formazione dell'incremento iniziale

Diversi metodi possono essere usati per validare il tempo necessario alla deposizione del primo anello in relazione agli eventi di schiusa o prima alimentazione.

Presenza degli anelli embrionici

Gli anelli formati prima della schiusa o della prima alimentazione potrebbero essere differenti da quelli definiti come incrementi primari.

In alcune specie, gli anelli embrionici sono assenti o oscurati dalla schiusa, in altre sono chiari e distinguibili, ma è fondamentale poter identificare questi anelli come pre-schiusa (Geffen, 1983; Dabrowski & Tsukamoto, 1986; Bailey & Stehr, 1988; Karakiri et al., 1991).

1.3.5 Tecniche di preparazione

Molti otoliti, con diametro minimo di 300-400 μm , hanno bisogno di alcune tecniche di preparazione, al fine di esporre il *core* e gli incrementi (Tabella 1 per le definizioni dei termini microstrutturali).

Le fasi di estrazione, pulizia e conservazione sono importanti per il successo delle analisi di stima di età, microchimica, etc. (Panfili, 2002).

1.3.5.1 Metodi di estrazione

L'estrazione degli otoliti è relativamente semplice per pesci grandi, dipendente dalla morfologia, dalla capsula uditoria, e dalla taglia del pesce, ma è più difficoltoso per larve o individui giovanili. Ovviamente la conoscenza a priori dell'anatomia craniale e vestibolare delle specie faciliterà l'estrazione (Secor et al., 1992).

Estrazione da pesci grandi

Gli otoliti possono essere estratti senza il bisogno di stereoscopio, in quanto superiori a 300 μm di lunghezza. Esistono 4 principali tecniche di estrazione:

1. Sezione frontale della testa: è universale e può essere usata per alcune categorie di pesci. La sezione deve essere effettuata attentamente per evitare di danneggiare gli otoliti. Usata per specie compresse lateralmente e pesci piatti;
2. Sezione trasversa della testa: principalmente adottata per pesci di dimensione più grandi (es. tonni, pesce spada e anguilliformi);
3. Sezione sagittale della testa: questo metodo è tipicamente usato per specie con cranio grande, è semplice l'estrazione delle tre paia di otoliti;

4. Sezione ventrale del cranio, attraverso le branchie: è adatto per conservare l'aspetto iniziale della testa dopo l'estrazione dell'otolite (es. specie commerciali);

Estrazione da pesci piccoli

L'estrazione degli otoliti da pesci di dimensioni ridotte, può essere semplice perfino nelle larve più piccole, basta usare un microscopio ottico per il dissezionamento. Si utilizza per tutte le specie di dimensione inferiore a 2 cm (giovanile e larve) e con otoliti di lunghezza inferiori a 300 µm. L'estrazione deve essere fatta in immersione di etanolo al 95% (altri operatori usano anche acqua, glicerina o xilene), in grado di prevenire l'erosione delle strutture dell'otolite.

Secor et al., (1992) descrive altri due metodi per l'estrazione: sbiancamento ed inglobamento, ma sono tecniche più difficili da mettere in pratica e il loro successo non è scontato:

- I. Sbiancamento: immersione del materiale nell'ipoclorito di sodio, l'estrazione avviene dopo la lisi dei tessuti;
- II. Inglobamento: esige il pesce completamente disidratato e in seguito viene incluso in resina sintetica.

1.3.5.2 Pulizia e conservazione

La pulizia degli otoliti è eseguita per migliorare la visibilità degli anelli sulla superficiale distale degli otoliti. Consiste nella rimozione di alcuni tessuti maculari e/o vestibolari rimasti adesi, dopo l'estrazione, che potrebbero interferire con l'osservazione o con la buona riuscita dell'inclusione nel materiale sintetico.

La via più semplice è quella di pulire gli otoliti immediatamente dopo la loro estrazione. La pulizia meccanica degli otoliti è fatta togliendo i tessuti con strumenti fini come pinzette ed aghi immersi in un liquido, ad esempio alcool o acqua (Secor et al., 1992).

Gli otoliti possono essere semplicemente puliti con carta assorbente, oppure tramite l'immersione in un sbiancante diluito (da 10 a 100% di ipoclorito di sodio) per un lasso di tempo (da pochi minuti fino ad alcune ore).

Il miglior metodo di conservazione degli otoliti è mantenerli completamente essiccati oppure riposti nelle eppendorf (Williams & Bedford, 1974).

Inoltre, per poter essere mantenuti integri nel tempo hanno bisogno, preferibilmente, di un luogo fresco e buio.

1.3.5.3 Montaggio

Il termine montaggio fa riferimento alla procedura di fissare l'otolite sul vetrino con del materiale sintetico adatto. I materiali di montaggio, possono servire per due propositi:

- I. Per l'adesione tra otolite e vetrino;
- II. Per migliorare la risoluzione delle caratteristiche microstrutturali.

Materiale di fissaggio

Gli otoliti possono essere montati con diversi materiali di fissaggio: Permout, balsamo Canada, Euparal, Spurr, Epon; LR White, resina epossidica, colla cianacrilica, colla termoplastica (CrystalBond); dove ognuno di esso ha determinati vantaggi e svantaggi, derivanti della loro viscosità e dai tassi di indurimento (Tab. 2).

Il Balsamo Canada, l'Euparal, lo Spurr, l'Epon e resina epossidica hanno bisogno di alcune ore per l'indurimento, mentre il LR White, la colla cianacrilica, la colla termoplastica (CrystalBond) induriscono in pochi minuti.

Il Balsamo Canada, la resina epossidica e la colla termoplastica (CrystalBond) sono materiali molto viscosi, e potrebbero formare delle bolle durante il mescolamento, che possono essere ridotte riscaldandoli tra 40-60°C.

I materiali viscosi, inoltre, tendono a formare una cupola sopra l'otolite che potrebbe limitare la distanza del piano focale, interferendo con l'osservazione al microscopio.

I materiali poco viscosi come Spurr, Epon e colla cianacrilica tendono ad espandersi da una parte all'altra del vetrino causando l'esposizione di una porzione di otolite, che potrebbe rivelarsi inadatto alla levigatura o causandone la perdita.

La resina epossidica e il balsamo Canada possono formare una superficie translucida che oscura le microstrutture dell'otolite (Panfili et al. 2002).

Tabella 2. Materiali di fissaggio più utilizzati (da Mosegaard et al., 1998).

Materiale	Utilità	Vantaggi	Svantaggi
Resina poliesterica (PR)	Alta qualità, fissaggio permanente; Inclusione e superficie levigabile	Scopi molteplici; Buona trasparenza; Buona levigatura/ lucidatura.	Irreversibile; Variabilità qualitativa Indurimento lento (12-24h); Tossico; Richiesto catalizzatore Bassa concentrazione
Resina epossidica	Alta qualità, fissaggio permanente; Inclusione e superficie levigabile.	Il più duro dopo il PR; Buona trasparenza; Bassa contaminazione chimica; Minima concentrazione; Ampio range applicativo Setting veloce (minuti); Facilmente rimovibile;	Irreversibile; Richiesto catalizzatore Tossico; Costoso; Moderato/lento setting.
Termoplastica (CrystalBond)	Alta qualità, fissaggio permanente; Inclusione e superficie levigabile.	Non tossico; Buona trasparenza; Buona levigatura/ lucidatura.	Punto di fusione alto (70-160°C); Sviluppo di bolle; Bassa concentrazione; Alto contenuto di Si.
Super Glue® (cianoacetato)	Setting veloce; Alta forza di fissaggio; Superficie levigabile.	Facile da usare; No calore o agenti chimici indurenti.	Alto contenuto S e Pb; Può staccarsi dal vetrino
UV dental glue	Setting veloce; Alta forza di fissaggio; Superficie levigabile.	No calore o agenti chimici indurenti; Non tossico.	Molto caro; Trasparenza ottica non conosciuta
Cera	Veloce fissaggio temporaneo; Solo inclusione.	Veloce; Economico; Facile da rimuovere.	Morbido; Povero di proprietà ottiche; Non permanente.
Nail varnish	Veloce fissaggio temporaneo; Superficie levigabile.	Economico; Facilmente rimovibile	Morbido; Disciolto in olii,
Eukitt®	Buona qualità di materiale Solo inclusione	Facile da usare; No indurenti; Facilmente rimovibile; Buona trasparenza.	Setting lento; Rimane morbido; Instabile col tempo; Può staccarsi dal vetrino.

1.3.5.4 Inclusione

Gli otoliti sono inclusi all'interno di stampi prima delle fasi di sezionamento, levigatura e/o lucidatura. L'orientamento all'interno del blocco plastico dipenderà dal piano di sezionamento desiderato. I materiali di inclusione sono delle resine epossidiche o poliesteri, ad alta trasparenza, con viscosità e tempi di polimerizzazione che variano dai pochi minuti a poche ore. Dopo la polimerizzazione della resina non è più possibile rimuovere l'otolite integro dallo stampo.

L'inclusione, risulta essere anche un metodo di conservazione a lungo-termine per ripetere le osservazione in tempi futuri (Panfilì et al., 2002).

1.3.5.5 Sezionamento

Il sezionamento degli otoliti è il primo passo delle numerose tecniche di preparazione.

Gli scopi sono quelli di rimuovere la resina in eccesso, evidenziando le microstrutture (Tab. 1), e di ottenere una superficie piatta parallela al piano di sezione desiderato (es. sagittale, frontale, o trasverso) (Panfili et al., 2002).

Infatti, le sagitte sono spesse ed opache, e per osservare in chiaro tutti i microincrementi devono essere sottoposte a taglio, tramite specifica macchina da taglio per un'affidabile lettura. Non c'è solo una tecnica di taglio degli otoliti, e le procedure e i materiali usati dipendono dalla natura delle applicazioni (Mosegaard et al., 1998).

1.3.5.6 Levigatura e lucidatura

La parte più impegnativa e tediosa della preparazione è la levigatura. Gli otoliti possono essere direttamente levigati, o levigati dopo l'inclusione e il sezionamento.

Sia il sezionamento che la levigatura degli otoliti sono effettuati per:

- Migliorare la leggibilità di tutte le microstrutture;
- Raggiungere il piano contenente il *core*;
- Distinguere gli anelli non visibili su otoliti interi;
- Come precursore di altre tecniche di preparazione (es. *etching*, *burning*, *staining*, SEM).

Il processo di levigatura richiede un controllo attento del piano dell'otolite (trasverso, sagittale o frontale).

In base all'esigenze o alle preferenze individuali, gli otoliti possono essere levigati su pietre leviganti, carte abrasive ad acqua, panni lucidanti, o altri vari abrasivi. Le carte abrasive ad acqua più utilizzate presentano una granulometria compresa tra i 220 ai 2000 (da 100 a 1 μ), mentre per la lucidatura spesso si utilizzano dei panni lucidanti impregnati di Allumina (0.3 μ m) (Panfili et al., 2002).

È possibile ed è sempre più utilizzata la tecnica automatica, in quanto può aumentare l'efficienza della lavorazione degli otoliti. E' utilizzata una specifica macchina da levigatura composta da dischi leviganti (16% in letteratura), che sorreggono il blocco in un'unica posizione favorendo la levigatura in piano, al contrario della levigatura manuale.

Il vantaggio è quello di affidare un lavoro tedioso ad uno strumento meccanico in grado di eliminare rapidamente la resina in eccesso. Comunque, l'automazione ha degli svantaggi, infatti, può far diminuire la precisione della tecnica favorendo, in alcuni casi, l'eccessiva levigatura (*overgrinding*), aumentando la probabilità di compromettere il campione.

In generale, si preferisce la tecnica di levigatura manuale in quanto permette un miglior controllo sulla qualità della preparazione e una minore tendenza di sottostimare l'età, specialmente in organismi adulti con una crescita più lenta, causato dalla perdita della parte più esterna degli anelli (ICES, 2009).

Localizzazione del *core* e inversione della superficie

Non ci sono delle strategie facili e ben definite per trovare il *core* in una varietà di caratteristiche microstrutturali, dipende molto dall'esperienza dell'operatore.

In alcune sezioni, può essere localizzato come un punto scuro, il primordium, in altre, solo il primo incremento che circonda il *core* è visibile.

Dopo il raggiungimento, il blocco viene lucidato con i panni arricchiti di allumina, e solo a questo punto si può invertire la superficie e continuare la levigatura fino allo spessore ideale affinché vengano mostrati gli incrementi strutturali (Secor et al., 1992).

1.3.5.7 Osservazioni

La scelta dello strumento di osservazione è oggettivo e dipende dal tempo disponibile ma anche dai costi dello studio. Condizioni di illuminazione standardizzate sono importanti nell'analisi dell'immagine (Mosegaard et al., 1998), e la descrizione deve essere accurata.

Microscopio ottico

➤ Basso ingrandimento (stereoscopio)

Le strutture incrementali sono raramente abbastanza grandi da poter essere osservate accuratamente ad occhio nudo, e per questo motivo spesso è utilizzata la visualizzazione sotto ingrandimento. A questa scala, solo gli incrementi stagionali e annuali sono distinguibili e osservabili, risultando un metodo molto rapido con la possibilità di lettura di un grande numero di campioni.

È consigliato l'utilizzo di diversi liquidi o di materiali indurenti, con la stessa o quasi densità ottica degli otoliti, per permettere alla luce di penetrare più facilmente incrementando il contrasto ed evidenziando le strutture interne. Il più usato probabilmente è l'acqua, poi la soluzione salina, a seguire l'alcool, il mix di acqua e alcool (in varie percentuali), la glicerina, la glicerina e alcool (30-70%), l'immersione in olio. Altri materiali sono il creosoto, lo xilene, il benzoato di metile, ma adesso sono poco usati perché molti di loro sono dannosi per la salute (Panfili et al., 2002).

Ci potrebbero essere due principali fonti luminose per l'osservazione, la luce diretta dal basso (luce trasmessa) o da sopra direttamente sulla superficie dell'otolite (luce riflessa). Quest'ultima, è spesso usata per osservare gli incrementi stagionali, mentre per l'esame delle microstrutture degli otoliti (es. gli anelli giornalieri) è usata la luce trasmessa. L'aspetto degli incrementi stagionali dipenderà dal tipo di illuminazione impiegata: sotto luce trasmessa gli incrementi traslucidi saranno luminosi e gli incrementi opachi saranno scuri, mentre sotto luce riflessa gli incrementi traslucidi appaieranno scuri e gli opachi luminosi.

E' importante specificare la fonte di luce utilizzata, in quanto si potrebbe fare confusione per descrivere gli incrementi (Casselman, 1974; 1983; Williams & Bedford, 1974).

➤ **Alto ingrandimento (Microscopio ottico)**

Il microscopio ottico ad alti ingrandimenti è usato per l'esame delle microstrutture degli otoliti, principalmente per la lettura degli incrementi primari. Possono essere impiegati vari tipi di luce, la riflessa, la polarizzata, la fluorescente, il contrasto di fase, ma la luce trasmessa risulta la più usata. Un microscopio ottico deve essere costituito da: oculari, lenti oggettive con ingrandimenti di 2.5x, 10x, 25x, 40x, 100x, tavolino mobile, condensatore, regolatore di diaframma e intensità luminosa.

Inoltre, fornire di videocamera il microscopio facilita la visualizzazione dell'immagine. Il limite di risoluzione del microscopio ottico, perfettamente settato, è più basso rispetto al limite teorico (circa 0.3 μm), e spesso limita l'osservazione degli incrementi <1 μm (Campana, 1987; 1992; Morales-Nin, 1988). Separatamente dagli ingrandimenti e dagli oculari, un'ottimizzazione della fonte di illuminazione ha la più grande influenza per ottenere immagini di alta qualità (Campana, 1992).

Microscopio elettronico

In altri casi, l'uso del SEM è essenziale. Il microscopio elettronico è uno strumento di indagine della superficie topografica che è largamente usato negli studi degli otoliti. Questo strumento offre un miglioramento di 300 volte della profondità di campo rispetto ai microscopi ottici di più alta qualità, come è riflesso nell'immagine 3D fornita (Panfili et al., 2002).

1.3.6 Acquisizione delle immagini digitali

Il sistema *Computer-Assisted Age and Growth Estimation* (CAAGE, Fig. 10) consiste essenzialmente di tre unità:

- una fonte di immagine digitale (camera, scanner, tablet digitalizzato, SEM, microprobe, etc...);
- un'unità centrale di processamento per la visualizzazione dell'immagine e la conservazione;
- un'unità software che caratterizza il livello di assistenza offerto dal sistema CAAGE e da un supporto specializzato funzionalmente per l'identificazione, e possibilmente per l'interpretazione (Panfili et al., 2002).

Processamento dell'immagine digitale

L'immagine visualizzata sullo schermo è una rappresentazione completa o parziale:

- di un otolite, risultato di un processo di calcificazione che ha indotto l'alternarsi di zone ipercalcificate e proteiche;
- è comunemente osservata come una sottile sezione ottenuta dal processo di taglio, levigatura, lucidatura;
- ed è stata digitalizzata attraverso una serie di processi ottici, elettronici e digitali in cui loro stessi generano vari tipi di rumore.

Un'immagine digitale nella sua forma originale non è utilizzabile, ma richiede una regolazione del contrasto e il filtraggio di alcuni componenti. Un filtraggio digitale idoneo può dare un significativo miglioramento nella "leggibilità", ma se usato in maniera errata questo potrebbe comportare la delocalizzazione del bordo con l'introduzione di anelli doppi.

Una classica sequenza di processamento di un'immagine digitale consiste in tre stadi basilari:

- Pre-processamento (ottimizzazione delle dinamiche, miglioramento del contrasto, riduzione del rumore, localizzazione del bordo);
- Analisi (misurazioni oggettive e processamento dell'informazione simbolica);
- Interpretazione (comprensione dell'immagine) (Panfilì et al., 2002).

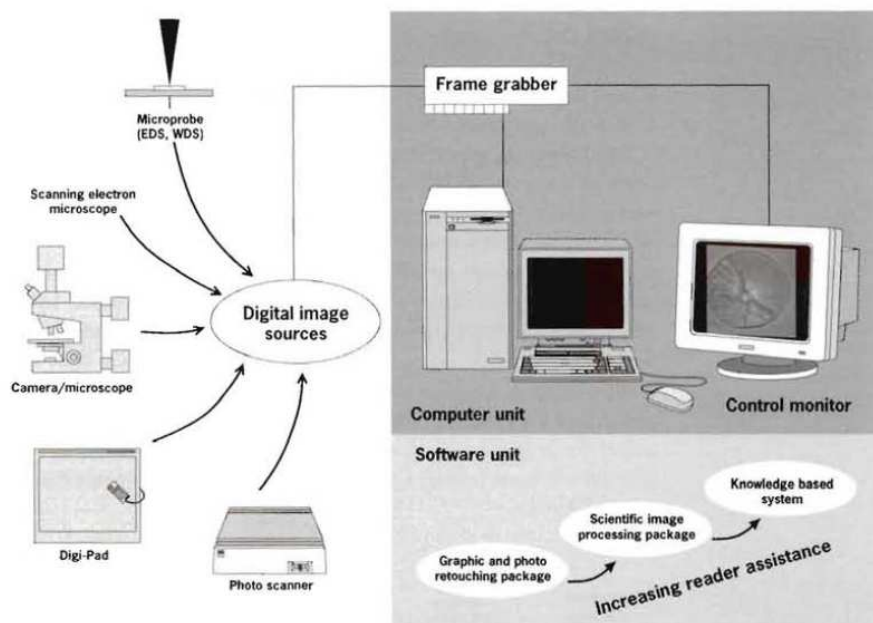


Figura 10 – Composizione tipica di un sistema CAAGE. Il range di fonti per l'immagine digitale vanno dalla classica immagine della telecamera, all'immagine prodotta chimicamente dai microprobi (es. in Casselman, 1983) (Panfilì et al., 2002).

Leggere o interpretare?

Sych (1974), ha proposto di distinguere due componenti nel processo di stima dell'età:

- **Lettura**, la quale è la stima di strutture certe mediante un principale alfabeto o una chiave;
- **Interpretazione**, il quale è il confronto delle strutture di eventi all'interno del ciclo vitale.

Il primo è basato esclusivamente sui criteri di identificazione visiva (anello di crescita, nucleo, primordio, etc...), e può spesso essere soddisfatto velocemente per un dato

otolite e metodo di preparazione. Il secondo è basato su schemi logici più o meno complessi, integrando informazioni delle specie studiate, stock o popolazioni, e/o zone di cattura, la combinazione individuale e l'informazione storica.

Sebbene potrebbero essere collegati, questi due processi richiedono informazioni di differente natura scientifica (Trodec, 1992):

- Pattern per la percezione visiva;
- Scienza cognitiva per l'interpretazione.

Sebbene, i sistemi di CAAGE attualmente disponibili sono basati esclusivamente sui sistemi di analisi di immagine, si può osservare un'interessante crescita negli stadi di interpretazione, che probabilmente costituiscono la migliore fonte di variabilità (Morison et al., 1998).

1.3.7 Stima di età

La stima di età prevede alcune importanti fasi, dalla scelta della struttura calcarea più vecchia fino al livello di precisione richiesto, per molti problemi tecnici come la preparazione e l'osservazione degli anelli di crescita.

La stima di età è un processo dinamico che può essere sintetizzato in una serie di passaggi:

- Selezione di una struttura di otolite;
- Riconoscimento dei patterns di crescita, includendo la periodicità sotto studio e il range della scala temporale ricoperta;
- Scelta del metodo di preparazione, in base a problemi tecnici di preparazione, e leggibilità;
- Conferma della compattezza e dell'intercalibrazione;
- Validazione dell'accuratezza dell'interpretazione;
- Conoscenza nell'interpretazione dei patterns di crescita;
- Applicazione dei risultati ottenuti (Panfili et al., 2002).

1.3.7.1 Criteri per la scelta delle strutture calcificate

Dalla tipologia di analisi prefissata ai fini dello studio, potrebbero essere selezionate differenti strutture calcificate. In base alla struttura selezionata, potrebbe essere necessaria l'uccisione del pesce, come nel caso degli otoliti.

Il grado di accuratezza richiesta, come gli incrementi giornalieri, è trovato solo negli otoliti. Delle tre paia di otoliti, la sagitta è quella più utilizzata.

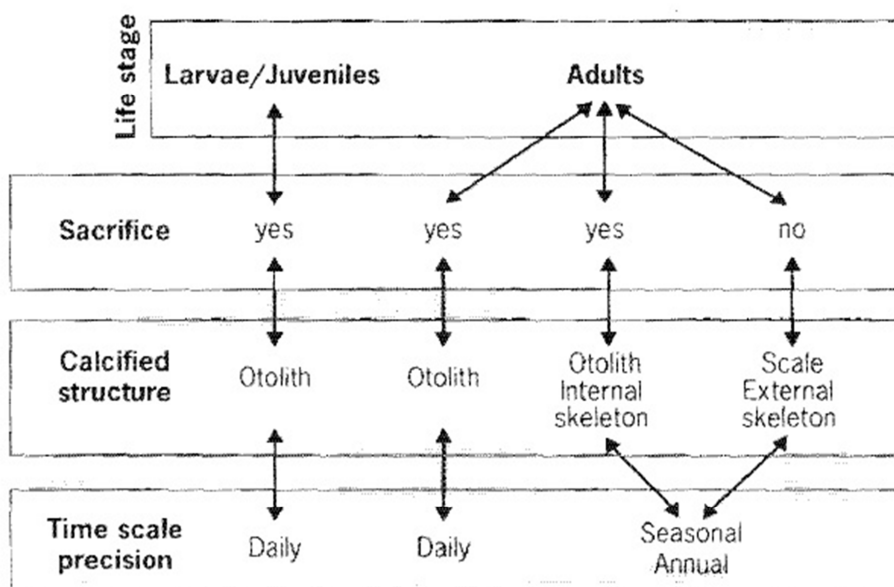


Figura 11 - La scelta della struttura calcificata dipende dall'accuratezza della scala temporale richiesta, dallo stadio vitale studiato e dalla possibilità di sacrificare l'individuo (Panfili et al., 2002).

I criteri di selezione per gli incrementi di crescita delle strutture calcificate sono:

- Distintività e facilità di identificazione sistematica;
- Costanza della loro periodicità;
- Sincronismo in una data popolazione.

Molti degli studi sulla stima di età sono basati sugli incrementi stagionali, in particolare sugli incrementi annuali, che ben si riconoscono. In pesci adulti e/o in specie longeve, la presenza delle discontinuità di crescita e le complicazioni inerenti il conteggio degli incrementi giornalieri lo rende un metodo poco attendibile.

1.3.7.2 Il processo di determinazione dell'età

Il primo passo nel processo di determinazione dell'età è quello di segnare la struttura calcarea scelta con l'apposito pattern di crescita incrementale per gli obiettivi prefissati dallo studio; il successivo è dato dall'interpretazione dell'età. Alcuni inevitabili criteri di interpretazione per le popolazioni o/e per le specie devono per prima essere definiti: per esempio, la posizione dell'anello di schiusa e la natura del bordo. La ripetibilità della procedura di determinazione dell'età (errore interno), con gli altri esperti, deve essere definito e calibrato (errore esterno). Inoltre, l'esperienza del lettore è molto importante per definire un errore molto limitato, e infine, la lettura dell'età deve essere validata. L'importanza temporale nell'interpretazione degli otoliti deve essere determinata per valutare l'accuratezza dell'età del pesce.

1.3.7.3 La determinazione dell'età specifica

La determinazione dell'età sulla base degli incrementi giornalieri danno un diretto e preciso valore di età. E' calcolato dal numero degli incrementi giornalieri validati (numero delle zone D o L) più l'intervallo tra la schiusa e la formazione del primo anello. In contrasto, la stima degli anni specifici su base degli incrementi stagionali richiede alcuni calcoli addizionali: può essere calcolato, ad esempio, il numero dei mesi o degli anni. Una volta identificati, si potrebbe procedere nella stima di ulteriori e importanti periodi come:

- Data di cattura;
- Data di nascita dell'individuo (esatta o media o standard della popolazione);
- Periodi principali nella formazione degli incrementi stagionali;
- Natura del margine.

La vera data di nascita di un individuo, determinata da studi di riproduzione e/o analisi di anelli giornalieri, non è sempre conosciuta. La validazione degli studi fornisce un preciso periodo di formazione degli incrementi stagionali per essere determinato.

La conversione di un conteggio incrementale per la determinazione dell'età evolve considerando la relazione tra la data della formazione degli incrementi e la data di cattura e della data di nascita nominale. Se la data di cattura è nota, è possibile calcolare l'anno nella quale il pesce è stato depresso.

Come regola, se l'incremento marginale è traslucido non è contato perché non completamente formato. L'età del gruppo o della classe d'età per la quale il pesce sarà assegnato dipende dall'anno in cui è stato deposto e della data di cattura. Ad esempio, per la coorte recentemente deposta è costituita da individui con età compresa tra gli 0 e i 12 mesi, andando a costituire il gruppo di età 0+ e la classe di età I, mentre gli individui deposti durante l'anno precedente fanno parte del gruppo di età 1+ e con classe di età II (Fig. 12).

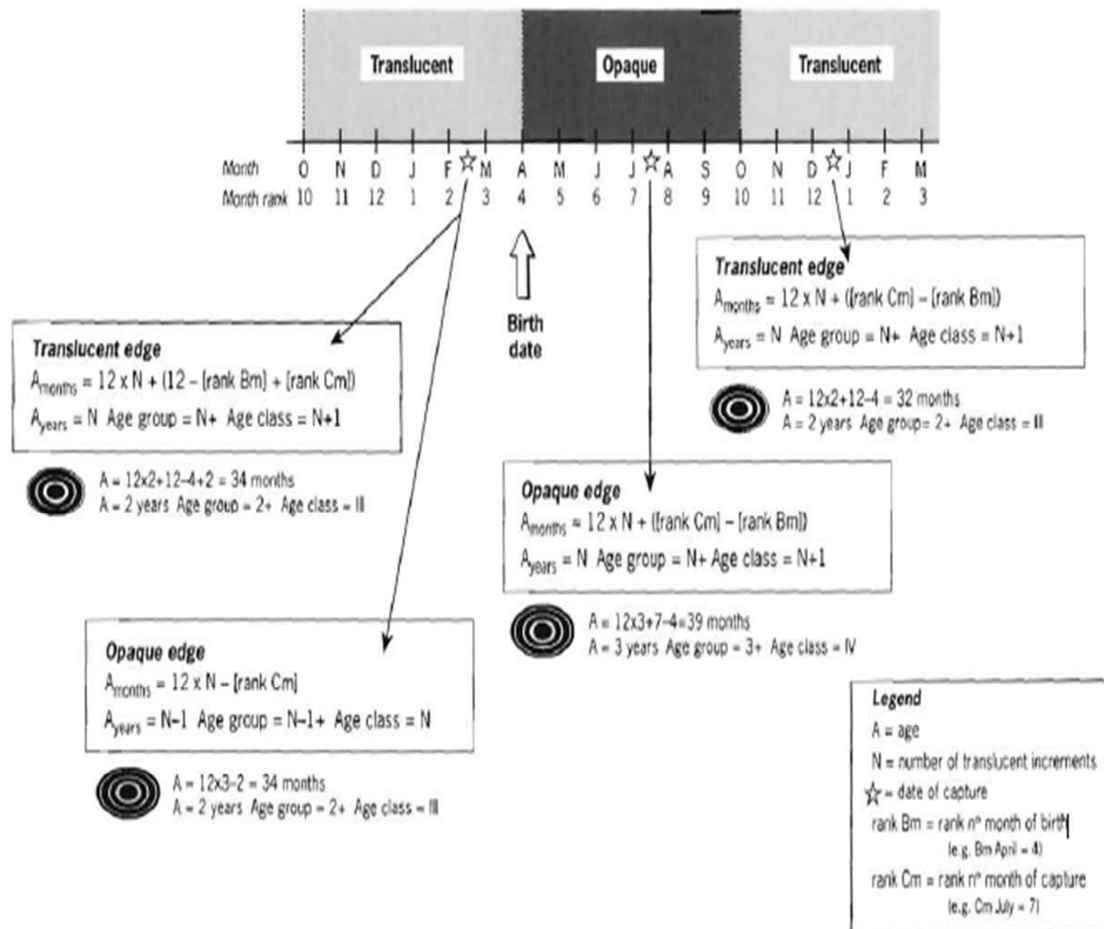


Figura 12 - Calcolo teorico dell'età (mesi, anni) e assegnazione del gruppo e classe di età agli otoliti. La validazione ha mostrato che ciascun anno di nascita prevede la presenza di due incrementi marginali: uno traslucido e uno opaco (Panfili et al., 2012).

1.3.8 Tecniche di preparazione per microscopio: *oiling*, *etching*, *staining*, e *burning*

Spesso per aumentare il contrasto delle caratteristiche microstrutturali a sezione finita, o tra l'accrescimento e le zone di discontinuità, possono essere alterate chimicamente o fisicamente, attraverso un'ulteriore preparazione degli otoliti.

In letteratura, si è riscontrato che la tecnica più utilizzata fosse l'*oiling*. L'*etching* risulta essere usato frequentemente (30%), per l'osservazione al microscopio ottico o al SEM. Il *burning* è stato usato largamente per aumentare il contrasto degli annuli, ma non per gli incrementi giornalieri.

1.3.8.1 *Etching*

Il termine *etching* si riferisce alla dissoluzione preferenziale della matrice organica o del carbonato di calcio. L'articolo di Haake et al. (1982), descrivendo questa procedura, è ancora la fonte più comprensibile delle informazioni disponibili mettendo in risalto gli effetti dei differenti agenti di decalcificazione.

Lo scopo è di fornire un rilievo tridimensionale alla superficie levigata, aumentando il contrasto tra le zone di discontinuità e di accrescimento per la lettura al microscopio luminoso, e/o per l'indagine al SEM (Panfili et al., 2002).

È molto difficoltoso predire quale tra i metodi di *etching* sia quella che fornirà dei buoni risultati, pertanto, bisogna provare una serie di agenti con differenti tempi di esposizione (Haake et al., 1982). Principalmente sono usati tre agenti: l'HCl diluito (pH=2.0-5.0), acido etilendiamminotetraacetico al 5-7% (EDTA), glutaraldeide (GA) acquoso classe EM al 2%. In aggiunta, la combinazione dell'EDTA con GA può essere efficace (Panfili et al., 2002). L'EDTA sembra essere il preferito perché attacca molto delicatamente e degrada la superficie dell'otolite poco velocemente (Campana & Neilson, 1985).

Occasionalmente, si usa una forte concentrazione di HCl (2-10%) su otoliti grandi (adulti) per evidenziare gli annuli. I range di pH dati per ogni agente, non sono gli unici range accettati, ma probabilmente quello che si ritiene più opportuno per le specifiche applicazioni (es. specie, stadio di sviluppo [larva, giovanile, adulto] tipo di otolite, tipo di sezione, otolite, etc.). Di conseguenza, il livello ottimale di pH e il tempo di esposizione avranno il bisogno di essere determinati con prove ed errori (Secor et al., 1992).

1.3.8.2 Staining o colorazione

La colorazione è un metodo di preparazione che mette in evidenza gli incrementi cromofili.

I coloranti più usati sono il viola metile (15%), colorante specifico per le cellule Kernels, ma potrebbe essere usato tutto il range di coloranti istologici come ad esempio, il blu anilino (1% anche chiamato blu light) e il blu di toluidina (1%), in quanto hanno dato degli ottimi risultati, colorando rispettivamente il collagene e la cartilagine. I coloranti potrebbero essere attratti da specifiche proteine adiacenti alle componenti organiche dell'otolite (Panfili et al., 2002).

Bouain & Siau (1988) hanno proposto l'immersione per 12-24h in acido fucsia, dopo la rottura dell'otolite e il passaggio nell'amido nero per diversi minuti (5%). Questo permette la comparsa degli incrementi di crescita blu scuro o sullo sfondo rosa.

Un altro metodo di trattamento, consiste nel passaggio dell'otolite in un bagno acido e colorante prima del sezionamento (Richter & McDermott, 1990), ma questo non è spesso impiegato.

Il tempo dell'attacco acido è molto variabile, dipenderà da specie e taglia dell'otolite.

1.3.8.3 Burning

L'età dei pesci può anche essere determinata usando il metodo "*Break-and-Burn*" (Christensen, 1964), dove la sagitta è letteralmente rotta in due metà attraverso il suo *core*, e in seguito esposto in una fiamma ad alcool. Questa tecnica ha come obiettivo l'aumento del contrasto tra le componenti organiche ed inorganiche della matrice, rendendo la zona di crescita invernale (traslucida) molto visibile.

Il tempo richiesto per il processo dipende da specie e taglia dell'otolite, ma non più di 10-15 secondi.

L'obiettivo è di produrre un uniforme sezione bruciata ma non troppo, in modo da far cambiare il colore degli anelli da traslucida a rossastro (C.A.R.E. Manual, 2006).

2 SCOPO E ORGANIZZAZIONE DEL LAVORO

Il seguente lavoro di tesi ha lo scopo di delineare la struttura della popolazione di *Merluccius merluccius*, di stimare l'età e il tasso di accrescimento e di conoscere maggiormente le dinamiche di reclutamento dei giovanili dell'alto-medio Adriatico, attraverso le analisi degli otoliti (sagitte). I dati utilizzati sono stati raccolti nella campagna MedITS effettuata in Adriatico nel 2012 nell'area delle acque nazionali italiane ed internazionali, al limite delle acque croate e slovene.

Le analisi preliminari condotte come le frequenze di taglia e di età, la distribuzione degli individui in base alla taglia, hanno definito una descrizione sintetica ma complessiva dello stock di *Merluccius merluccius*, fornendo utili stime delle relative età e crescita del pesce, delineando la struttura della popolazione dell'alto-medio Adriatico. Sono seguite le analisi di tipo allometrico tra lunghezze metriche, come Feret (diametro maggiore), MiniFeret (diametro minore), Area e Perimetro, e le taglie individuali di tutti i naselli permettendo di individuare la loro relazione

Inoltre, attraverso l'interpretazione degli anelli annuali degli otoliti è stata stimata la lunghezza media dei naselli all'età di un anno (un utile parametro per le analisi di dinamica di popolazione e gestione dello stock).

Le analisi delle microstrutture degli otoliti di giovanili sono state utili per stimare il tasso di crescita di *Merluccius merluccius* dell'alto-medio Adriatico e la loro data di nascita (*backcalculation*). La crescita dei giovanili di nasello è stata determinata usando la crescita incrementale degli otoliti e le analisi di frequenza di taglia (Morales-Nin & Aldebert, 1997). La natura giornaliera degli incrementi è stata validata per i giovanili di nasello nell'Adriatico (Arneri & Morales-Nin, 2000) e gli incrementi sono anche stati usati per determinare la distribuzione delle date di schiusa.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Area di studio, campionamento e analisi biologiche: Campagna MedITS

Il Mar Mediterraneo è stato suddiviso in 30 sub-aree geografiche, denominate GSA (Geographic Sub Areas) che vengono utilizzate come riferimento per le attività di gestione e di indagine scientifica. Tale suddivisione è stata stabilita dalla risoluzione 31/2007/2 della Commissione Generale per la Pesca nel Mediterraneo (General Fishery Commission for the Mediterranean – GFCM), su indicazioni del Comitato Scientifico Consultivo (Scientific Advisory Committee – SAC). Le 30 aree si distinguono per caratteristiche e dimensioni (Fig. 13).

1	Mare di Alboran settentrionale	16	Coste meridionali della Sicilia
2	Isole Alboran	17	Adriatico settentrionale
3	Mare di Alboran meridionale	18	Adriatico meridionale
4	Algeria	19	Ionio occidentale
5	Isole Baleari	20	Ionio orientale
6	Nord della Spagna	21	Ionio meridionale
7	Golfo del Leone	22	Mare Egeo
8	Corsica	23	Isola di Creta
9	Mar Ligure e Tirreno settentrionale	24	Mar di Levante settentrionale
10	Tirreno centro-meridionale	25	Isola di Cipro
11	Mari di Sardegna	26	Mar di Levante meridionale
	11.1 Sardegna Ovest		
	11.2 Sardegna Est		
12	Nord della Tunisia	27	Mar di Levante
13	Golfo di Hammamet	28	Mar di Marmara
14	Golfo di Gabes	29	Mar Nero
15	Isola di Malta	30	Mar d'Azov

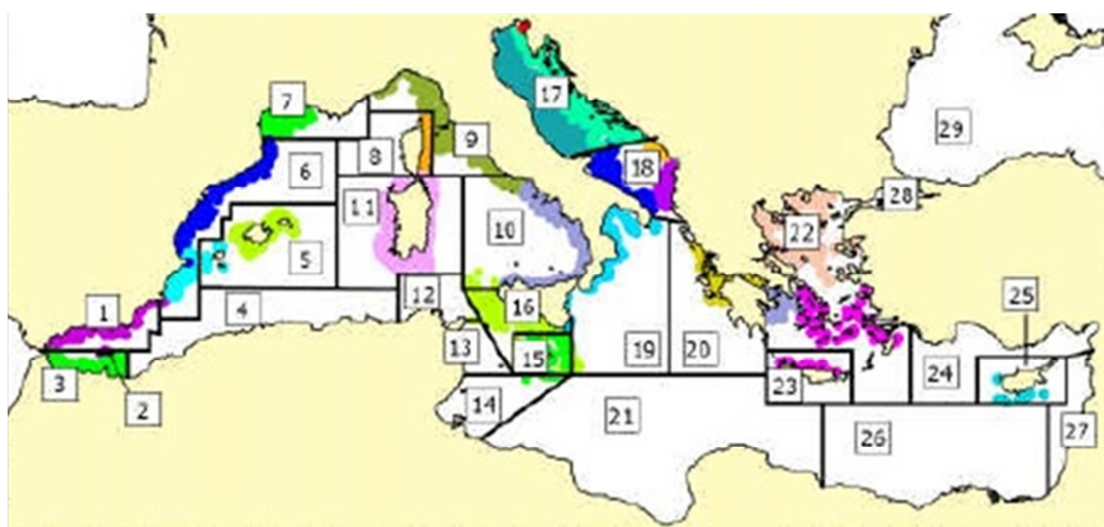


Figura 13 – Mappa generale dell'aree coperte (GSA) dal programma MedITS (Relini et al., 2008).

I dati utilizzati per questo lavoro di tesi sono stati raccolti nell'ambito della campagna sperimentale di pesca a strascico effettuata nel 2012 nella GFCM-GSA 17.

La GSA 17 (Fig. 14), che si estende per 92.660 km², comprende l'Alto e Medio Adriatico, dal Golfo di Trieste fino alla congiungente Gargano – confine tra Croazia e Montenegro e rientra nella divisione statistica FAO 37.2.1 (Cataudella & Spagnolo, 2011). Tale area interessa le coste del Molise, Abruzzo, Marche, Emilia Romagna, Veneto, Friuli Venezia Giulia sul versante occidentale, e le coste della Bosnia, Croazia e Slovenia sul versante orientale (Relini et al., 2008).

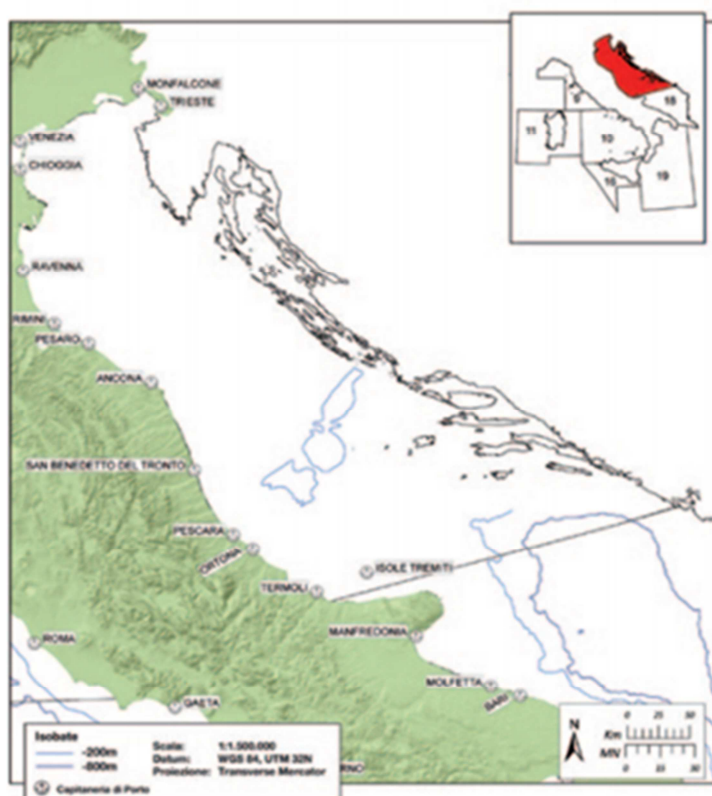


Figura 14 – Delimitazione geografica dell'area di campionamento della GSA 17 (Cataudella & Spagnolo, 2011).

Le campagne MedITS, in generale, sono effettuate una volta all'anno nel periodo primaverile-estivo applicando un protocollo standardizzato che definisce il piano di campionamento, la rete, le informazioni da raccogliere, la gestione e l'analisi dei dati (Bertrand et al., 2002; Relini et al., 2008). Questo protocollo rappresenta il documento di riferimento per gli Istituti di ricerca che ogni anno sono impegnati nella campagna MedITS, pesca a strascico sulla platea continentale.

Nella GSA17, partecipano all'azione del progetto il Laboratorio di Biologia Marina e Pesca di Fano (Italia), l'Istituto di Oceanografia e Pesca di Spalato (Croazia) e l'Istituto di Ricerca della Pesca della Slovenia.

Il campionamento è stato svolto in circa 30-40 giorni nella stagione primaverile-estiva (giugno-luglio) del 2012. Le cale sono state posizionate seguendo uno schema di campionamento casuale stratificato; gli strati sono stati identificati secondo la profondità e il numero di stazioni effettuate per ogni strato è proporzionale alla superficie dello strato stesso.

Sono stati esplorati quattro strati: 0-50 metri, 50-100 metri, 100-200 metri, 200-500 metri. Il numero delle stazioni di campionamento è stato di 130.

Le cale sono state effettuate sempre di giorno e hanno avuto una durata di 30 minuti sui fondali inferiori a 200 metri e di 60 minuti sui fondali maggiori di 200 metri, la velocità standard da tenere durante la cala, indifferentemente dalla profondità, è di 3 nodi.

È raccomandato tenere questa velocità per poter assicurare la geometria della rete, infatti, una riduzione della velocità (2.8 nodi) potrebbe avere degli effetti negativi, sulla verticalità e stabilità dei divergenti, i quali potrebbero cadere o infossarsi nel sedimento, mentre un aumento (3.2 nodi) potrebbe tenere la rete lontana dal fondo (Relini et al., 2008).

La rete di campionamento utilizzata è una rete a strascico sperimentale (GOC 73), appositamente progettata per la pesca scientifica. Per migliorare la cattura la rete è caratterizzata da un'ampia apertura verticale di circa 2.5 metri, maggiore all'apertura delle più comuni reti professionali usate nell'area; la maglia del sacco è di 20 mm (apertura di maglia) per catturare anche i pesci di piccole dimensioni (Relini et al., 2008).

In ciascuna cala sono state identificate, contate e pesate tutte le specie pescate alla macrofauna. In ogni stazione, per ciascuna specie appartenente alla lista di riferimento delle specie bersaglio MedITS, è stato conservato un sub-campione di 100 esemplari per effettuare le analisi biologiche.

Protocollo internazionale MedITS per il campionamento degli otoliti

Il monitoraggio dell'età tramite strutture ossee dei pesci, che implica il campionamento degli otoliti, esige un protocollo per armonizzare le tecniche di campionamento, la taglia del campione, e la registrazione delle informazioni.

Il campionamento degli otoliti può essere utilizzato per:

- 1) Stimare l'indice di abbondanza per età e il monitoraggio della struttura dello stock nel tempo;
- 2) Monitorare la distribuzione spaziale dei gruppi di età;
- 3) Uso delle lunghezze dai dati di età per stimare la curva di crescita;
- 4) Stimare i parametri di crescita e longevità usati nelle procedure di stock assessment.

Il numero ottimale di otoliti per ciascuna classe di taglia non può essere dato in forma universale.

Il campionamento avvenuto durante la campagna MedITS del 2012 nella GSA 17, ha tenuto in considerazione quanto specificato all'interno del protocollo internazionale.

La taglia del sub-campione per la specie *Merluccius merluccius* dipenderà dalla lunghezza media (L_m) di tutto il campione catturato:

- ($< L_m25\%$), la taglia del sub-campione sarà composta da 5 otoliti per ogni cm e per sesso;
- ($\geq L_m25\%$), la taglia del sub-campione sarà composta da 10 otoliti per ogni cm e per sesso (MEDITS, 2013).

In generale, per tutti gli esemplari catturati, appartenenti alle specie target, sono stati registrati i parametri biologici secondo questo protocollo internazionale: la lunghezza totale (LT, mm); il peso (g); il sesso (maschio, femmina, indeterminato); e lo stadio di maturazione delle gonadi (Relini et al., 2008).

Per comodità, le lunghezze totali di tutti i naselli inclusi all'interno del sub-campione utilizzato, sono stati suddivisi in classi di taglia con i seguenti range: >100 mm; 100-139 mm; 140-179 mm; 180-219 mm; 220-259 mm; 260-299 mm; 300-339 mm; 340-379 mm; ≥ 380 mm.

3.2 Preparazione degli otoliti

3.2.1 Estrazione

L'estrazione dagli esemplari di *Merluccius merluccius* delle 506 coppie di otoliti (sagitte) è stata effettuata operando un taglio trasversale del cranio in corrispondenza del pre-opercolo (Fig. 15 A-B). In alcuni casi, è stato spesso conveniente rompere la testa dopo il taglio (Fig. 15 C). Successivamente, è stato rimosso il cervello e il vestibolo utricolare dal resto del labirinto. Ogni otolite è trovato adagiato dietro il cervello, posto alla base del cranio (Fig. 15 D-E). Una volta estratti (Fig. 15 F), ogni coppia di otoliti richiede la pulizia. L'utilizzo di questo metodo di estrazione ha fornito un sufficiente controllo evitando il danneggiamento e/o la perdita degli otoliti.

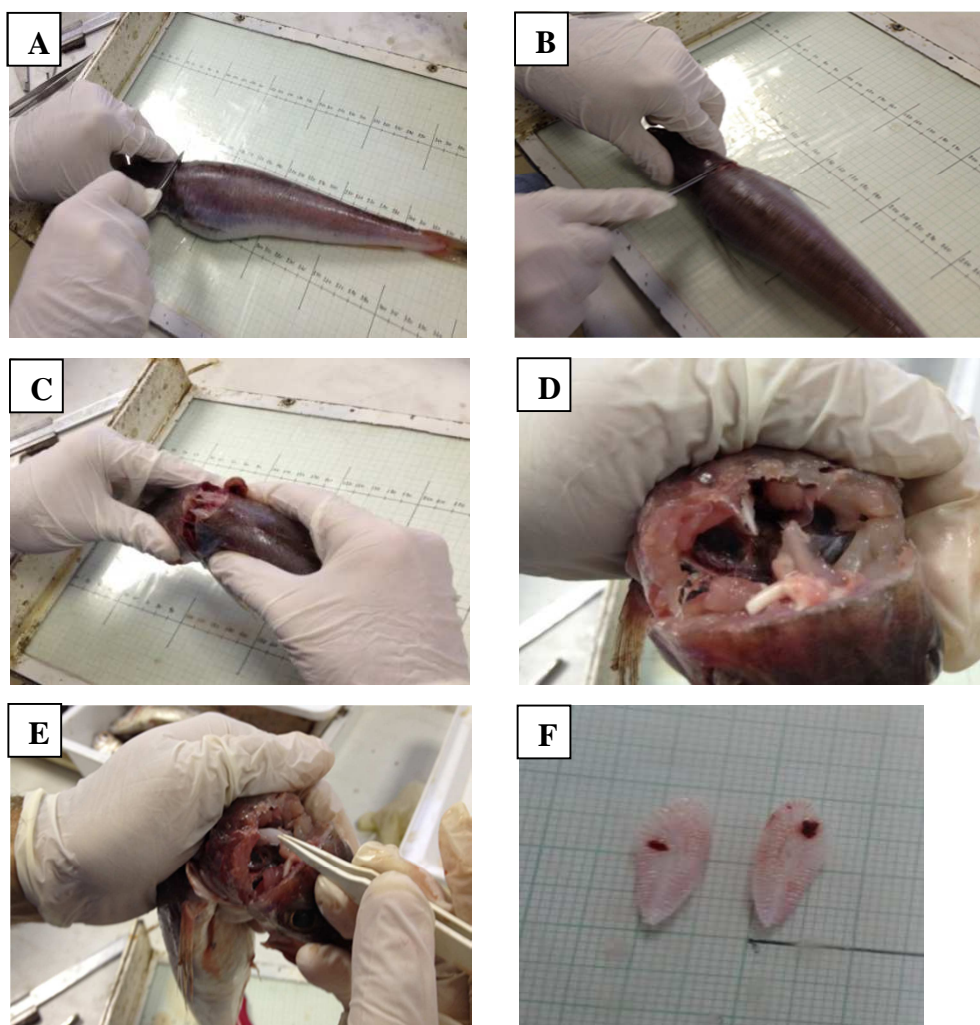


Figura 15 - Fasi della rimozione degli otoliti su esemplare di *Merluccius merluccius*. (A-B) Taglio trasversale pre-opercolo; (C) Rottura del cranio; (D) Individuazione degli otoliti dietro il cervello; (E) Estrazione degli otoliti dall'individuo; (F) Otoliti estratti.

3.2.2 Pulizia

A seguito dell'estrazione, gli otoliti necessitano di una profonda e accurata pulizia per eliminare le impurità, date da tessuti e/o altre componenti scheletriche che potrebbero interferire con le fasi di preparazione o compromettendone la leggibilità.

Gli otoliti sono stati idratati con acqua per qualche minuto all'interno di un eppendorf. Successivamente, è stato seguito un protocollo consistente in una serie di lavaggi:

- Il primo lavaggio è stato eseguito con H₂O₂ al 3% (acqua ossigenata) per 15 minuti per degradare i residui di sangue e di membrana eventualmente rimasti adesi;
- In seguito, dopo aver rimosso l'H₂O₂, i due successivi lavaggi sono stati fatti con acqua distillata filtrata con membrana da 0,45 µm con cicli di 5 minuti all'interno di uno strumento chiamato sonicatore (Fig. 16).

Il sonicatore è un apparecchio che genera vibrazioni meccaniche amplificate, sfruttando corrente elettrica ad elevata frequenza prodotta da un generatore. Gli ultrasuoni vengono trasmessi in una vasca contenente acqua, producendo una cavitazione sonora, che viene fondamentalmente sfruttata per permettere la completa eliminazione delle impurità.

Nel caso in cui non è stato ottenuto un otolite perfettamente pulito, si è proceduto alla ripetizione del protocollo.

Infine, prima di passare alla fase successiva, l'otolite è stato lasciato per qualche ora su una piastra riscaldata a bassa temperatura (35-40°C).



Figura 16 - Sonicatore ad ultrasuoni Elma-Seneco.

3.2.3 Inclusione degli otoliti

L'inclusione è il passo che precede il sezionamento, ed è fondamentale per sottoporre gli otoliti al taglio con macchina o alla levigatura. Questo passaggio è eseguito per conseguire tipologie di sezioni differenti, frontali e sagittali.

Dalla letteratura, è noto che la presenza e la visibilità delle strutture primarie e degli incrementi giornalieri è possibile soltanto in otoliti estratti da esemplari di nasello giovane inferiore ad un anno di vita, per questo motivo, l'inclusione è stata effettuata sulle sagitte appartenenti ad organismi inferiori di 180 mm di lunghezza totale.

La scelta di tale limite di taglia è stata dettata da lavori precedenti, rappresentando la lunghezza media al primo anno di età.

In totale, sono stati inclusi 102 otoliti appartenenti a giovanili di nasello di lunghezza totale compresa tra i 55 e i 180 mm (Tab. 3).

Tabella 3. Numero di sezioni frontali e sagittali analizzati in base alla classe di lunghezza.

Lunghezza totale (mm)	Sezione frontale	Sezione sagittale
<100	24	30
100-139	24	-
140-180	24	-
Totale	72	30

L'inclusione degli otoliti è avvenuta all'interno di uno stampo in plastica, dove sono stati disegnati delle linee per agevolare il posizionamento/orientamento degli otoliti su di esso.

Lo stampo è stato riempito per metà con resina epossidica, e dopo averla lasciata polimerizzare per circa 24h (Fig. 17 A), gli otoliti sono stati adagiati sulla resina, cercando di far coincidere il *core* con la linea di riferimento (Fig. 17 B). Successivamente, lo stampo è stato completamente riempito di resina e lasciato nuovamente polimerizzare (Fig. 17 C).

Inoltre, è stato molto importante verificare la presenza di bolle tra gli otoliti e il materiale di inclusione.

L'otolite del nasello è otticamente denso a causa di un alto contenuto proteico (Morales-Nin, 1986), richiedendo una differente preparazione e/o piano di sezionamento per meglio mettere in evidenza gli anelli giornalieri.

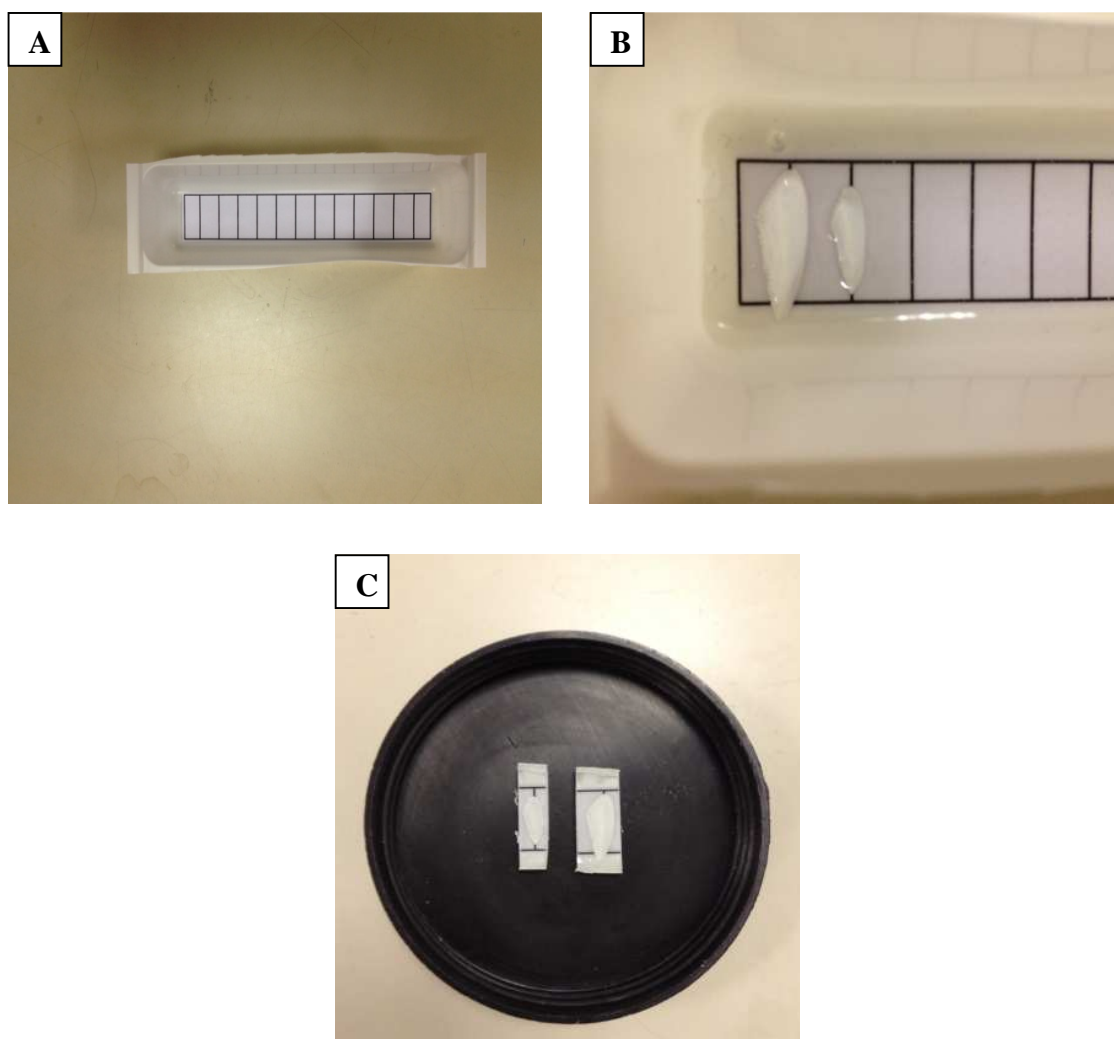


Figura 17 – (A) Stampo con linee di riferimento utilizzato per l'inclusione; (B) Disposizione degli otoliti sulla linea di riferimento; (C) Otoliti inclusi all'interno di un blocchetto di resina.

3.2.3.1 Sezione frontale

Gli otoliti, scelti randomicamente, sono stati suddivisi in tre classi di taglia costituite ciascuna da 24 otoliti:

- <100;
- 100-139;
- 140-180.

La suddivisione in classe è stata compiuta al fine di mettere in evidenza un tasso di crescita incrementale differente durante il primo anno di vita. Inoltre, si è presupposto di individuare una taglia massima, nella quale gli incrementi di crescita continua non fossero più visibili tramite microscopio ottico.

In seguito all'inclusione, ogni blocco di resina è stato fissato al vetrino con colla termoplastica affinché fosse possibile eseguire il sezionamento.

Sezionamento

Il sezionamento automatico è stato fondamentale per conseguire le sezioni frontali. L'importanza di questa fase è legata all'aumento della visibilità delle microstrutture attraverso una netta riduzione dello spessore del blocchetto di resina.

La macchina da taglio micrometrico utilizzata è la Remet Micromet, dotata di disco diamantato di spessore 0.5 mm (Fig. 18).

Il mantenimento di uno spessore costante di circa 350 micron in tutte le sezioni, è stato frutto dell'implementazione della Tabella 4, che ha posto in relazione lo spostamento della vite micrometrica con lo spessore delle sezioni e della lama da taglio. Dopo alcune prove, lo spessore di sezione risultato migliore è stato di 350 micron, dunque, a tal fine le sezioni frontali sono state ottenute eseguendo un primo spostamento verso sinistra di 45 micron dal *core*, e dopo l'esecuzione del primo taglio, di altri 90 micron verso destra.

Tabella 4. Relazione tra spostamento micrometrico e lo spessore, in micron, ottenuto con il taglio.

Spostamento	125	115	105	95	90	85	80	75
Spessore della sezione	700	600	500	400	350	300	250	200

Per le classi da 100 a 180 mm, sono stati eseguiti due tagli consecutivi per garantire la presenza del *core*, mentre per gli otoliti appartenenti alla classe di taglia <100 mm, essendo di dimensioni ridotte, è stato realizzato un solo taglio.



Figura 18 - Macchina da taglio micrometrico Remet Micromet utilizzata per ottenere le sezioni frontali.

3.2.3.2 Sezione sagittale

Per le sezioni sagittali, gli otoliti sono stati selezionati randomicamente da esemplari inferiori di 100 mm di lunghezza. Con questa sezione, si è cercato soprattutto di prediligere le microstrutture primarie vicine al *core*, in quanto con questo piano di sezionamento sono maggiormente esposte.

3.2.4 Levigatura

La levigatura è la fase che ha permesso la rimozione graduale della resina in eccesso, contribuendo in maniera significativa alla realizzazione di sezioni di un centinaio di micron.

Nello specifico, è stata utilizzata una macchina levigatrice automatica Remet LS2 (Fig. 19 A). Sia per la sezione frontale che per la sagittale, ciascuna sezione è stata fissata su di un vetrino con resina epossidica E30 (Prochima Calcinelli - PU) (bicomponente rapporto 10:6), lasciata poi polimerizzare su piastra riscaldata per circa 24 ore.

- Sezioni frontali: sono state levigate attraverso l'utilizzo di un disco con carta abrasiva ad acqua a granulometria elevata, P600 (26 μm) (Fig. 19 B). Periodicamente, è stato opportuno controllare il progresso della levigatura per evitare il danneggiamento e quindi la perdita per eccesso di levigatura.

Con la riduzione dello spessore e l'avvicinamento del *core* alla superficie focale, sono state utilizzate carte abrasive sempre più fini, come la P1200 (14 µm) o la P2500 (9 µm).

La levigatura della prima superficie si è conclusa con l'impiego di due panni lucidanti impregnati di Alluminia (polish 3M Perfect.it III) liquida extrafine e ultrafine (Fig. 19 B). Infine, il vetrino è stato risciacquato e lasciato per alcuni minuti nel sonicatore.

L'inversione della superficie è stata compiuta attraverso l'immersione del vetrino (circa 10 min.) all'interno di un becher con acqua a temperatura costante (80°C), che ha favorito il graduale ammolimento delle resina. Al distaccamento della sezione dal vetrino è stata invertita la superficie e nuovamente fissata al vetrino. Dopo l'avvenuta polimerizzazione, si è proceduto con la levigatura della seconda superficie adottando le medesime procedure precedentemente menzionate.

- Sezioni sagittali: sono state ottenute predisponendo l'otolite intero al centro del vetrino e fissandolo con resina epossidica E30. Come riportato dalla letteratura, è stato seguito la disposizione dettata, cioè la prima superficie levigata è stata quella distale, in modo da evitare il danneggiamento del *core*, mantenendolo più vicino alla superficie adesa al vetrino.

Sono stati adoperati dischi con carte abrasive molto fine, P1200 o la P2500, rispetto alle sezioni frontali. Le procedure di levigatura, di lucidatura della prima e della seconda superficie e il metodo di inversione delle superficie sono state identiche a quelle menzionate per le sezioni frontali.

Il metodo di inversione delle due superficie è stato messo a punto durante l'esperienza in laboratorio. L'utilizzo di una precedente tecnica, che prevedeva come materiale di fisaggio il CrystalBond (colla termoplastica), non ha dato i risultati sperati. Infatti, come tutte le colle termoplastiche, le sezioni sono state maneggiate a temperatura molto elevata (circa 120°C), causando per lo più danneggiamenti irreversibili delle strutture degli otoliti.

Per questo motivo, è scaturita la necessità di trovare qualcosa di alternativo alla colla termoplastica, rinvenuta nella messa appunto della tecnica di fisaggio con resina epossidica.

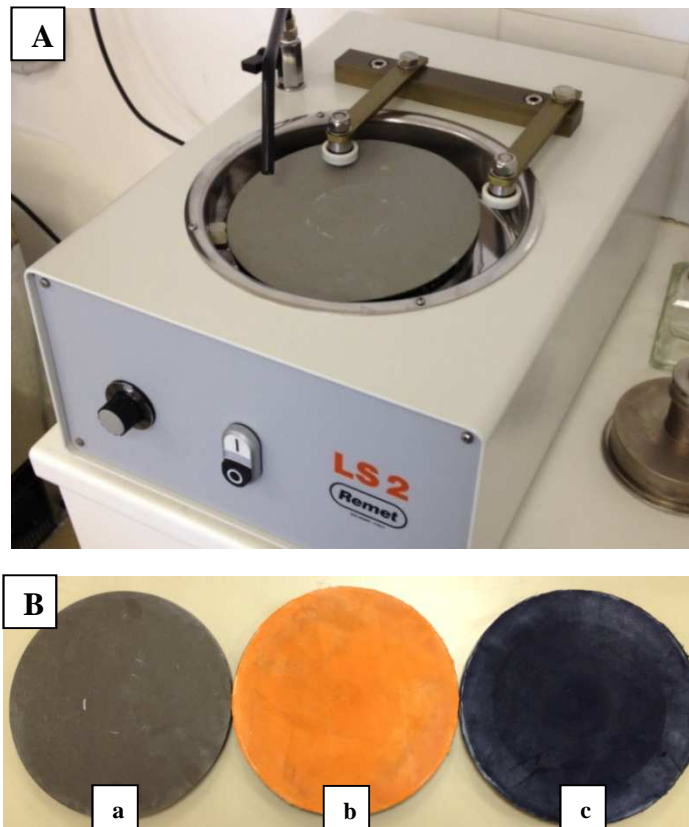


Figura 19 - (A) Macchina levigatrice Remet LS2; (B) a): Esempio di disco con carta abrasiva ad acqua P600; b): Panno lucidante arricchito di Allumina extra-fine; c): Panno lucidante arricchito di Allumina ultra-fine.

3.2.5 Acquisizione delle immagini

L'acquisizione delle immagini del sub-campione dell'anno 2012, ha avuto come obiettivo sia quello di realizzare una memoria morfologica delle 506 coppie di otoliti, ma anche quello di realizzare tutte le tipologie di analisi morfometriche su di esse, attraverso programmi di analisi di immagini, come ImageJ.

3.2.5.1 Otoliti interi

Gli otoliti sono stati visionati usando lo stereoscopio (Wild – Heerbrugg) (Fig. 20 A), connesso ad una videocamera (Digital Camera for Microscope DCM 500- Resolution 5M pixels) (Fig. 20 A) e ad un PC con un sistema di analisi immagini, ScopePhoto.

Le immagini sono state acquisite con obiettivi dal 6x al 25x.

Per l'acquisizione dell'immagini sono state standardizzate il più possibile le condizioni di illuminazione. E' stata utilizzata una luce riflessa proveniente da lampade alogene esterne, proiettate quasi perpendicolarmente alla superficie degli otoliti.

Il miglior contrasto delle immagini è stato ottenuto dalla regolazione delle fonti di luce esterne ma anche attraverso l'intensità di luminosità della telecamera. Inoltre, per aumentare il contrasto dell'immagine, è stato utilizzato un contenitore con acqua a sfondo nero. La risoluzione adottata è stata, la massima possibile, di 2592x1944 pixel.

Per ogni coppia, sono state acquisite due immagini, una distale e una prossimale (Fig. 20 C-D), servite come confronto per il calcolo delle distanze metriche, Feret (diametro maggiore) e MiniFeret (diametro minore), per il conteggio degli anelli annuali, e delle loro lunghezze.

Le immagini di otoliti di dimensioni elevati, oltre la risoluzione massima dello stereoscopio, sono state acquisite tramite uno scanner, Epson Perfection V600 Photo (Fig. 20 B) con risoluzione di 2400dpi. Gli otoliti sono stati disposti all'interno di una pietri con acqua.

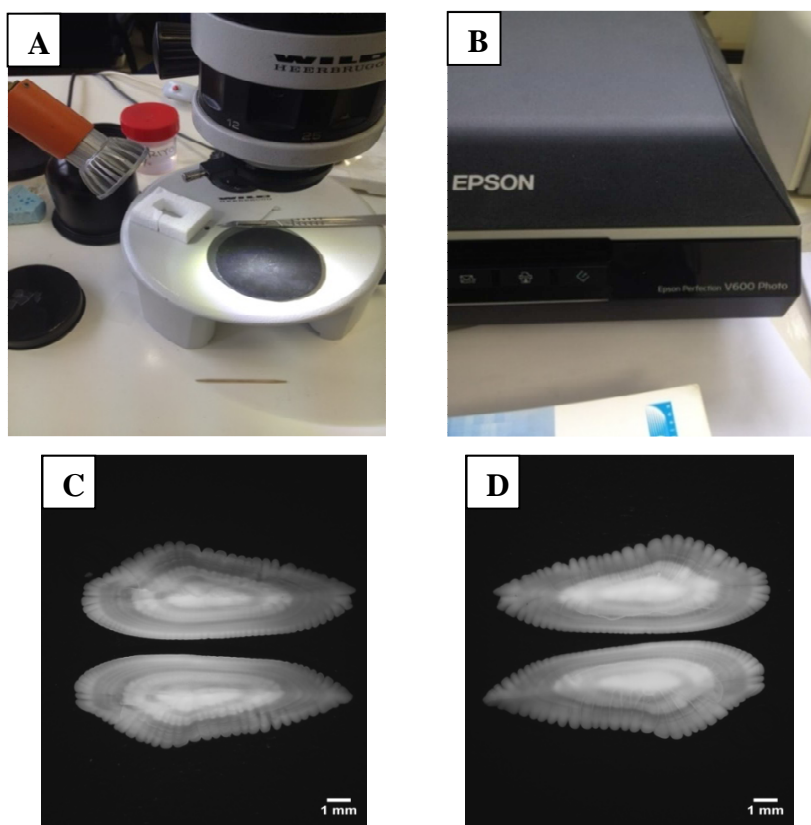


Figura 20 - (A) Stereoscopio Wild – Heerbrugg con illuminazione esterna alogena; (B) Scanner Epson Perfection V600 utilizzato per otoliti di grandi dimensioni; (C-D) Otolite acquisito tramite stereoscopio con luce riflessa in posizione prossimale (C) Posizione distale (D). Ingrandimento 6x.

3.2.5.2 Sezioni frontali e sagittali

Le sezioni frontali e sagittali degli otoliti sono stati esaminati usando un microscopio ottico (Leitz-Wetzlar-Germany) (Fig. 21 B) equipaggiato con filtro verde. E' anche stato utilizzato un olio (Lemonvitrex-Erba densità=0.91e indice di rifrazione 1.50 ± 0.1) come materiale chiarificante, affinché aumentasse la capacità di penetrazione della luce e la visibilità degli anelli giornalieri in regioni di otolite ricche di materiale organico.

Il microscopio è stato connesso ad una videocamera (Digital Camera for Microscope DCM 500 - Resolution 5M pixels) (Fig. 21 A) e ad un PC con un sistema di analisi immagini, ScopePhoto.

Gli otoliti sono stati osservati sullo schermo utilizzando obiettivi da 10x a 40x.

La scelta dell'ingrandimento, ha permesso di avere delle immagini più o meno dettagliate degli assi di lettura dell'età.

Anche in questo caso, le condizioni di luminosità sono state standardizzate e regolate tramite l'apertura del diaframma del microscopio o dalla luminosità della telecamera.

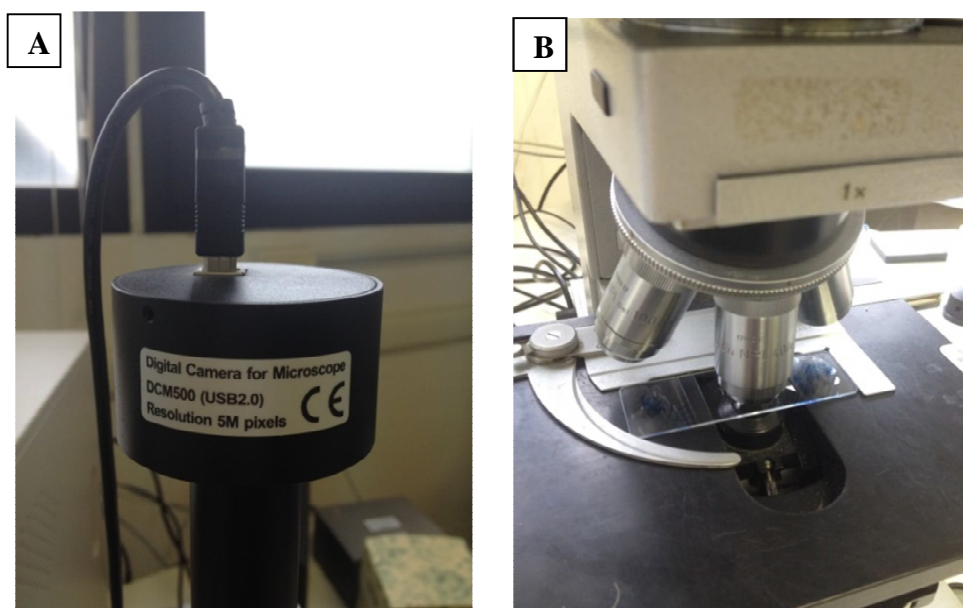


Figura 21 - (A) Videocamera utilizzata (Digital Camera for Microscope DCM 500 - Resolution 5M pixels); (B) Microscopio ottico (Leitz-Wetzlar-Germany).

3.3 Analisi dati

Secondo il tipo di analisi, i dati utilizzati sono stati raggruppati in specifici dataset, e successivamente i risultati ottenuti, sono stati plottati, tramite diversi tipi di grafici, sul software Excel.

Le prime analisi svolte hanno avuto il compito di delineare un quadro generale della struttura di popolazione del *Merluccius merluccius* dell'alto-medio Adriatico. Ad esempio, in primo luogo, è stata osservata la frequenza di distribuzione dei naselli lungo la colonna d'acqua, dopo averla divisa in opportune classi di profondità come specificato nel protocollo internazionale MedITS: 0-50 metri; 50-100 metri; 100-200 metri; 200-500 metri (Fig. 22).

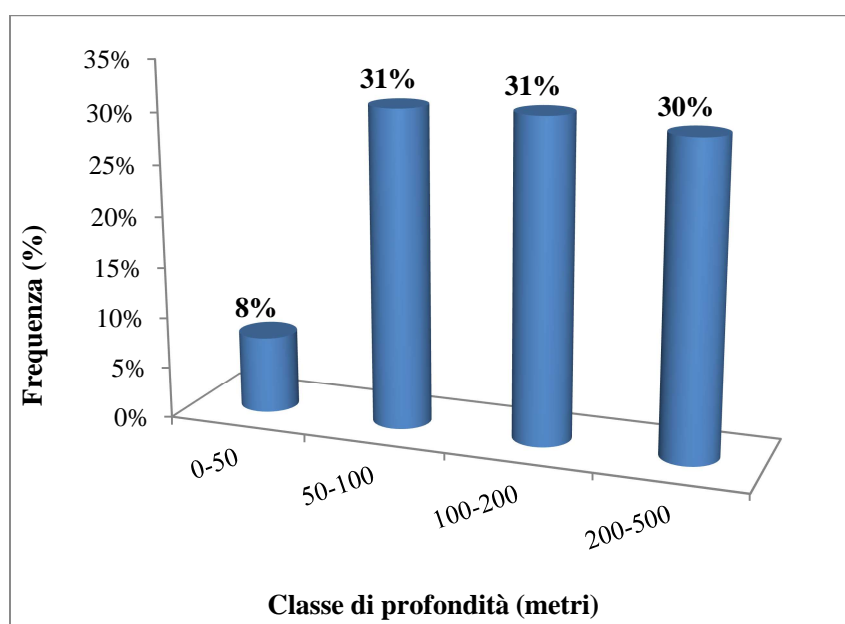


Figura 22 – Frequenza di classe di profondità di *Merluccius merluccius*.

Successivamente, dall'osservazione delle immagini di tutti i 506 otoliti sono state effettuate ulteriori analisi di carattere generale:

- Frequenza di taglia e di classe di taglia dell'interno campione 2012;
- Frequenza di classe di taglia del sub-campione;
- Distribuzione di taglia dei naselli con la profondità;
- Frequenza di margine.

Per lo studio delle allometrie sono stati calcolati i parametri morfometrici, per mezzo del programma ImageJ. È stato importantissimo, prima di svolgere le analisi metriche,

la calibrazione delle immagini acquisite per risoluzione e ingrandimento dello strumento utilizzato. In questo modo le immagini sono state standardizzate esprimendo tutte le misurazione dei parametri in micron o in millimetri, a secondo della tipologia di analisi. Le immagini delle 506 coppie hanno permesso, in via automatica, il calcolo dei seguenti parametri: Area, Perimetro, Circonferenza, Feret (diametro maggiore), Feret X, Feret Y, Angolo Feret, MiniFeret (diametro minore), AR, Round, e Solidità. Mettendo in relazioni questi paramentri con la lunghezza totale (LT, mm) del pesce sono state ottenute le seguenti allometrie:

- Feret-LT sia dell'otolite destro che sinistro;
- MiniFeret-LT sia dell'otolite destro che sinistro;
- Area-LT sia dell'otolite destro che sinistro;
- Perimetro-LT sia dell'otolite destro che sinistro;

Le macrostrutture visibili sugli otoliti potrebbero avere differente origine e/o essere associati ad un diverso cambiamento ontogenico e specie-specificità dei fattori ambientali o endogeni. In particolare, la stima dell'età del sub-campione di nasello è stato compiuto attraverso l'interpretazione e il conteggio degli anelli annuali (annuli), riscontrati dal centro dell'otolite (*core*) al margine ventrale. Una zona di crescita annuale, o annulo, consiste in un anello (o banda opaca) e in una traslucente (Fig. 22). L'identificazione del primo annulo invernale negli otoliti di nasello è risultato problematico a causa di un insieme di anelli (larvale, pelagico e demersale) disposti attorno al *core*.

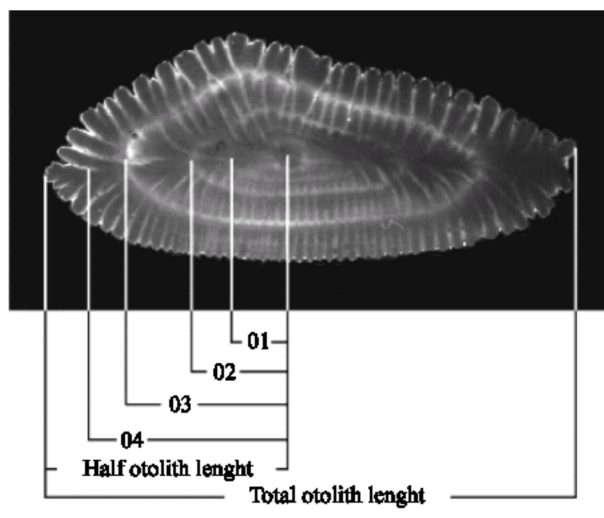


Figura 23 – Esempio di un otolite di nasello con il conteggio degli anelli annuali.

Il conteggio degli annuli ha permesso di implementare uno specifico dataset con il codice dell'otolite e le rispettive classi di età: 0, 1, 2, 3, 4, 5. E' stato aggiunto il valore + alle classi di età costituite da otoliti che presentano un margine incrementale opaco. Per descrivere la crescita del sub-campione di nasello catturati nel 2012 nell'alto-medio Adriatico è stata implementata la seguente equazione di crescita di von Bertalanffy:

$$L_i = L_{\infty}(1 - e^{-kt_i}) + \epsilon_i$$

Dove L_i è la lunghezza all'età t , L_{∞} è la massima lunghezza asintotica ottenuta dalla media individuale nella popolazione, k è il parametro di curvatura della crescita ed è il tasso di crescita istantaneo, t_i è l'età compiuta alla lunghezza uguale a 0.

Per gli otoliti non interpretabili, si è adoperata una sezione trasversale. Sono state realizzate 34 sezioni trasversali, dove si è cercato di interpretare e contare gli anelli annuali.

La classificazione del tipo di margine dell'otolite (traslucente od opaco) è stato sicuramente complicato dall'alta incidenza dei falsi anelli, ma nonostante ciò si è riusciti a interpretare l'intero sub-campione.

Successivamente, sono state eseguite tutte le misurazioni dei raggi dal *core* agli annuli, permettendo di realizzare l'allometria tra lunghezza totale del pesce e la lunghezza del raggio dal *core* al primo anello sia dell'otolite destro che sinistro.

Per la stima di età e del tasso di crescita dei giovanili di nasello, sono stati perfettamente analizzati i patterns di crescita incrementale giornaliera messe in evidenza, in differente modo, dalle sezioni frontali e sagittali degli otoliti (Fig. 24 A).

La scelta del miglior asse di lettura degli incrementi è spesso ricaduta su quello che riusciva a fornire la sequenza incrementale più completa. La sezione è stata dapprima osservata a basso ingradimento, e in seguito sono stati numerati tutti gli anelli giornalieri. Il punto di partenza, per entrambe le sezioni, è stato fatto coincidere con l'anello di schiusa, per proseguire lungo l'asse di lettura precedentemente scelto, fino al margine (Fig. 24 A-B).

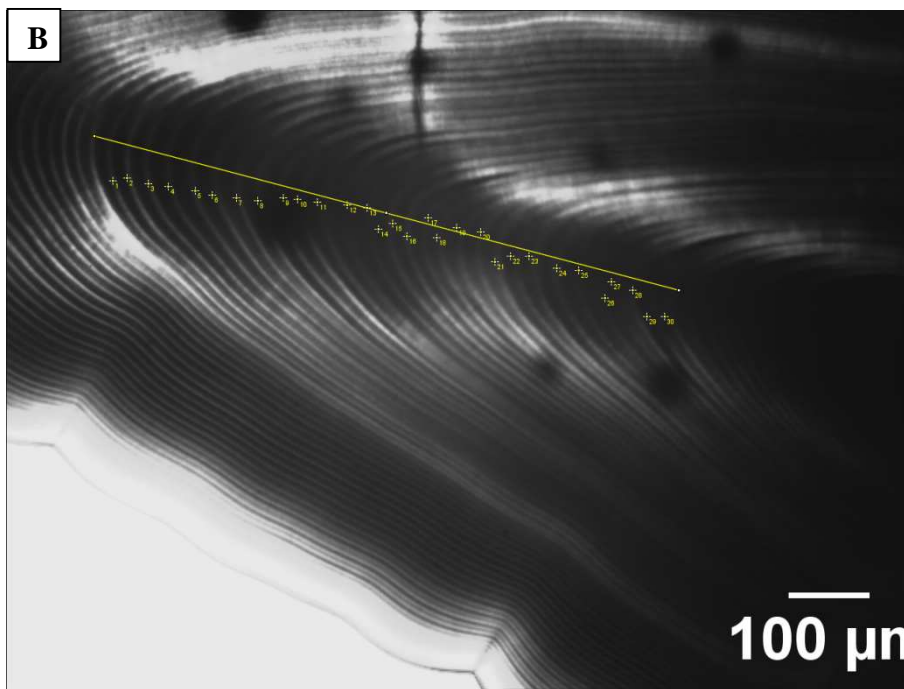
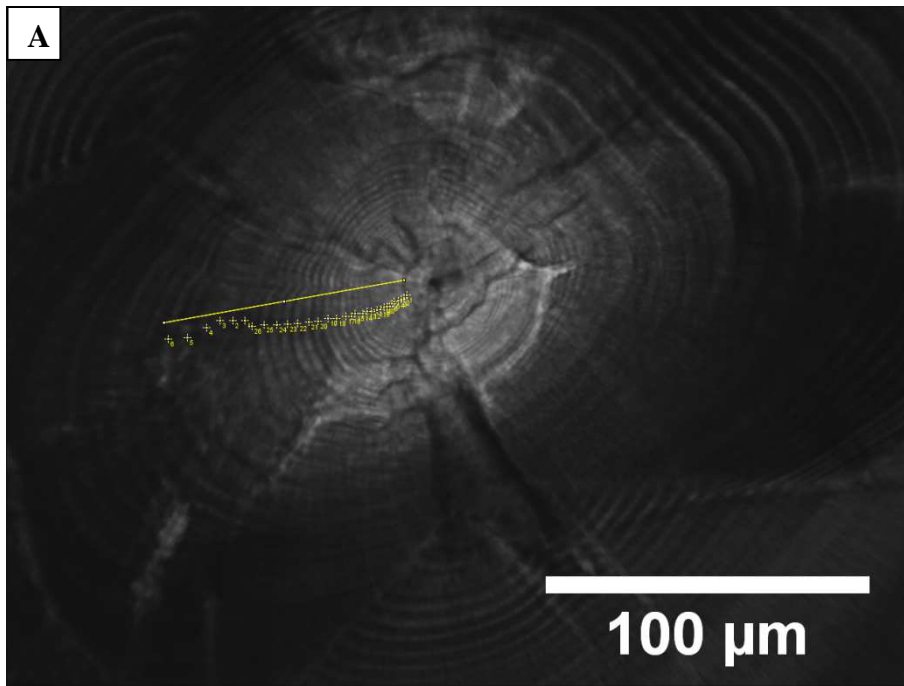


Figura 24 – Microstrutture di una sezione sagittale di otolite di *Merluccius merluccius*, visualizzato al microscopio con luce trasmessa. (A) In dettaglio, il conteggio dei pattern di crescita incrementale intorno al *core*, gli incrementi primari, i centri di crescita accessori e la crescita prismatica; Ingrandimento 25x; (B) Pattern di crescita regolare con conteggio degli anelli giornalieri lungo l'asse minore, tramite il programma imageJ; Ingrandimento 10x.

Ulteriori tipologie di analisi sono state compiute sulle sezioni frontali e sagittali:

- Relazione tra taglia dell'individuo (LT) e l'età determinata dall'interpretazione degli incrementi giornalieri;
- Tasso di crescita mensile in lunghezza dell'individuo prima del compimento del primo anno di vita;
- Frequenza delle date di schiusa, calcolando la differenza in giorni tra la data di cattura e l'età stimata attraverso il conteggio degli anelli giornalieri;
- Spessore medio tra gli anelli giornalieri negli assi di lettura utilizzati: maggiore, minore e ortogonale;
- Confronto dello spessore medio delle due tipologie di sezioni nei differenti assi di lettura;
- Confronto dello spessore medio nello stesso asse di lettura nelle sezioni frontali e sagittali.

4 RISULTATI

In totale sono stati letti 506 otoliti interi, di cui 72 con sezione frontale suddivise nelle tre classi di taglia: <100 mm; 100-139 mm; 140-180 mm; e 30 con sezione sagittale di taglia inferiore a 100 mm, e 35 con sezione trasversale.

4.1 Analisi otoliti interi

In tabella 5, sono stati riassunti i dati estrapolati dall'analisi degli otoliti interi che presentavano dall'interpretazione dell'età almeno un anello annuale. Sono state calcolate le medie delle lunghezze dei raggi (S) di ogni anello annuale, e la lunghezza media totale ad ogni anno raggiunto (L).

L'analisi interpretativa degli otoliti con un anello annuale, ha messo in evidenza che la lunghezza media del sub-campione di nasello dell'alto-medio Adriatico all'età di un anno è di circa 199 mm.

Tabella 5. Sommario della media dei raggi di ogni anello annuale stimato dall'analisi degli otoliti e dalla media della lunghezza totale ad ogni anno compiuto; N= numero di osservazioni; (S)= lunghezza media dei raggi ad ogni anno compiuto (mm); ΔS = incremento nel raggio dell'otolite; (L)= lunghezza totale media di ogni anello annuale (mm); ΔL = incremento nella lunghezza totale del pesce.

Anelli annuali	N	(S)	ΔS	(L)	ΔL
1	102	3.6	0.0	199.0	199.0
2	106	6.6	3.0	265.0	66.0
3	75	8.5	1.9	336.0	71.0
4	8	8.9	0.4	419.0	83.0

La distribuzione di frequenza della lunghezze totali del campione catturato durante la campagna MedITS del 2012, ha mostrato che le taglie di *M. merluccius* più abbondanti nell'alto-medio Adriatico sono comprese tra i 100 e i 160 mm di lunghezza totale, descrivendo un istogramma unimodale (Fig. 25).

Le taglie superiori hanno rivelano una diminuzione in frequenza.

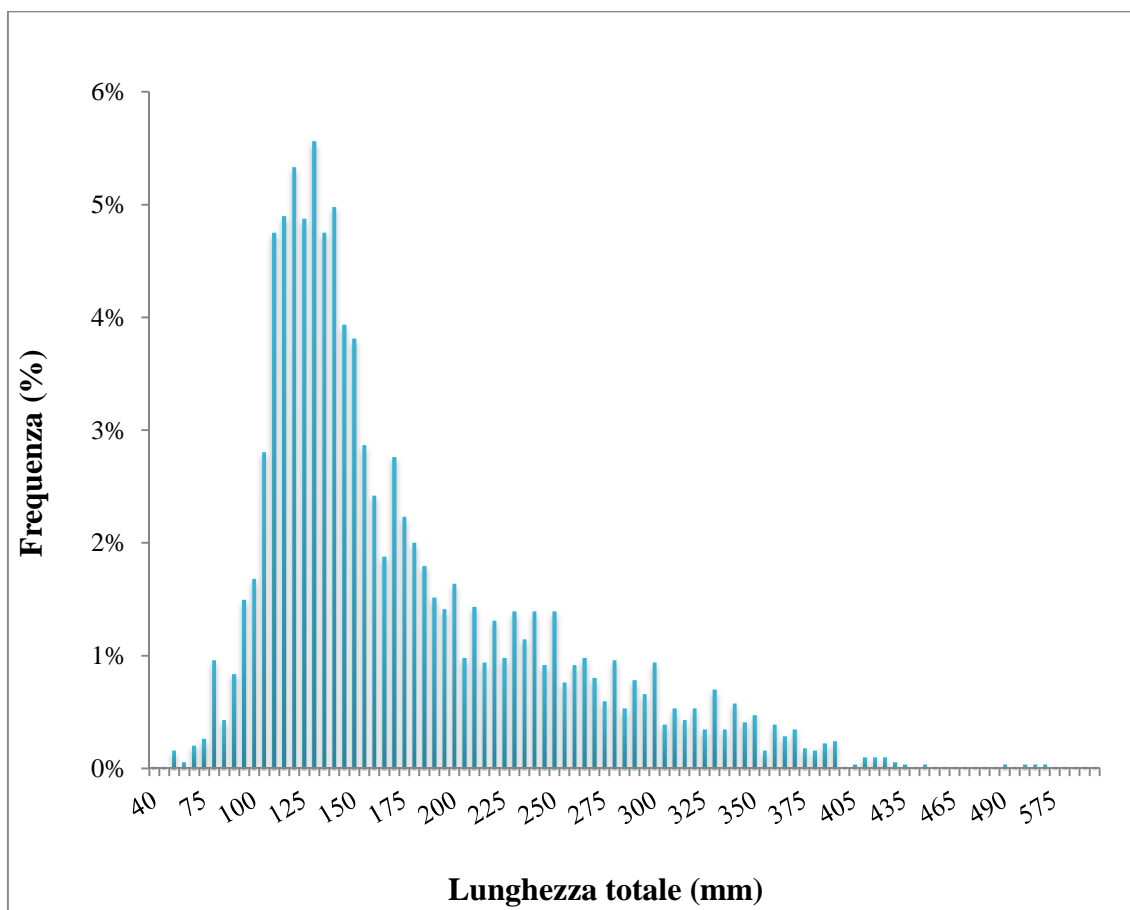


Figura 25 - Analisi di frequenza della lunghezza totale dell'intero campione dei naselli dell'alto-medio Adriatico.

Nella Figura 26, suddividendo tutte le lunghezze dei naselli in classi di taglia, l'andamento unimodale del grafico ottenuto precedentemente non cambia.

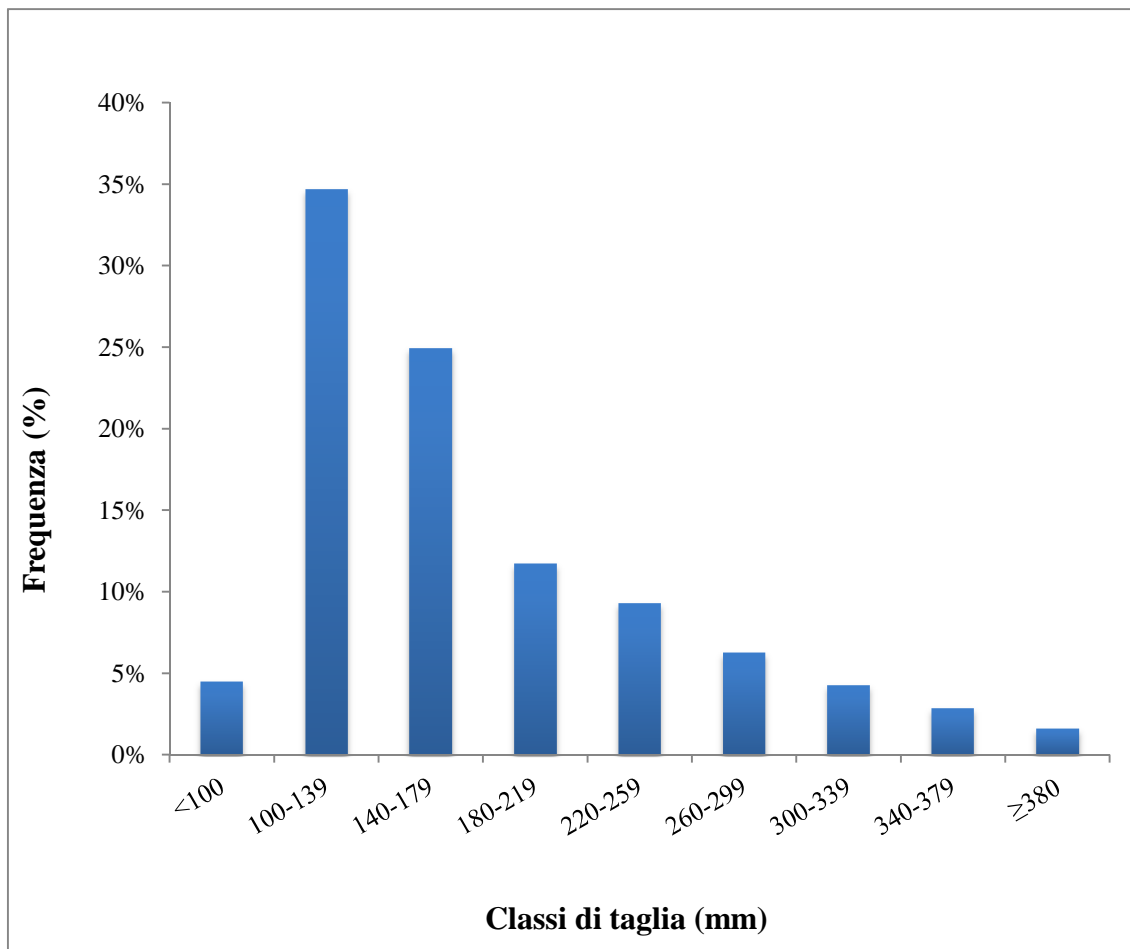


Figura 26 - Analisi di frequenza delle classi di taglia dei naselli dell'alto-medio Adriatico.

La distribuzione di frequenza della lunghezza totale del sub-campione analizzato, ha mostrato che le classi di taglia relativamente più abbondanti sono comprese tra i 100 e i 180 mm di lunghezza totale dei naselli (Fig. 27).

Le classi di taglia superiori, rispecchiando in maniera ottimale i risultati ottenuti nell'intero campione in Figura 25, hanno mostrato una riduzione della frequenza.

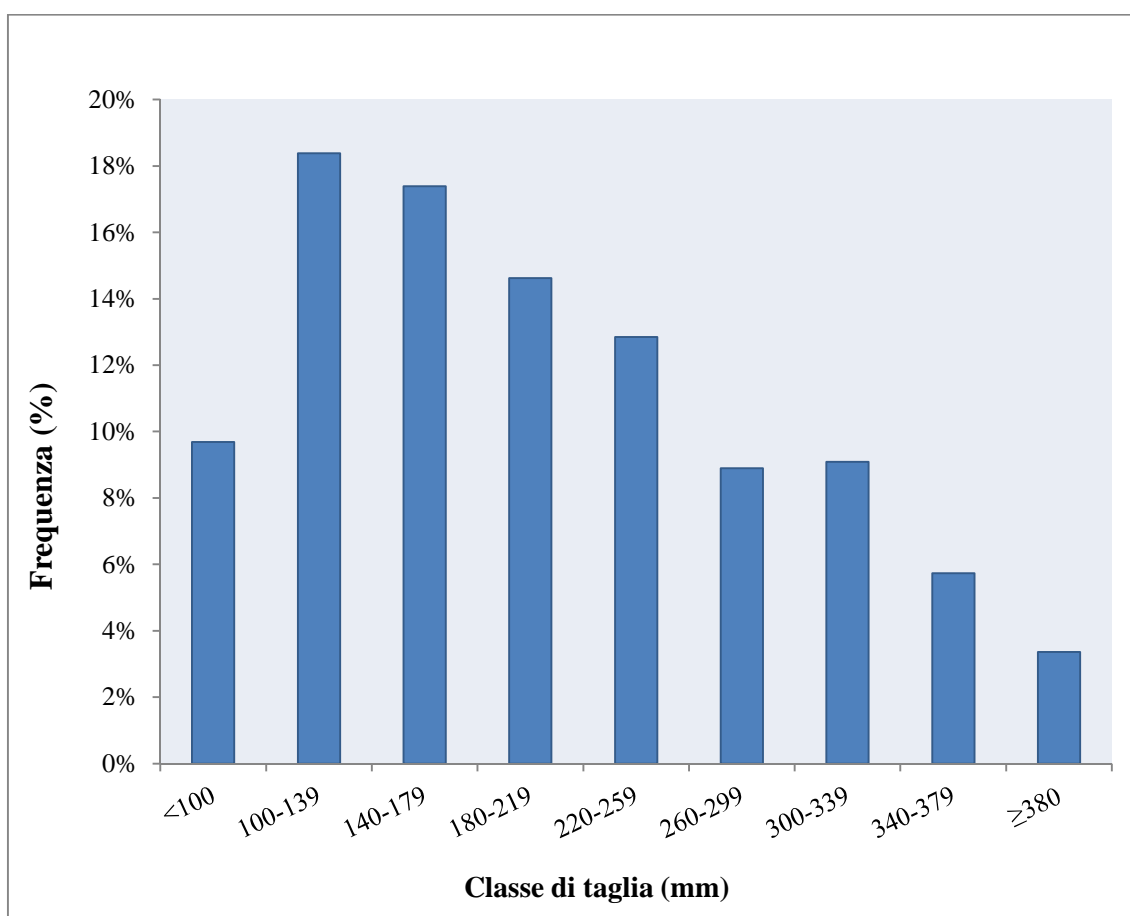


Figura 27 – Analisi di frequenza delle classi di taglia del sub-campione di naselli.

Dall'analisi interpretativa dell'età del sub-campione di naselli catturati durante la campagna MedITS del 2012, nella GSA 17, la classe di età dominante è rappresentata dalla classe 0+ (Fig. 28).

La frequenza delle classi di età successive alla 0+ diminuisce drasticamente, fino allo zero.

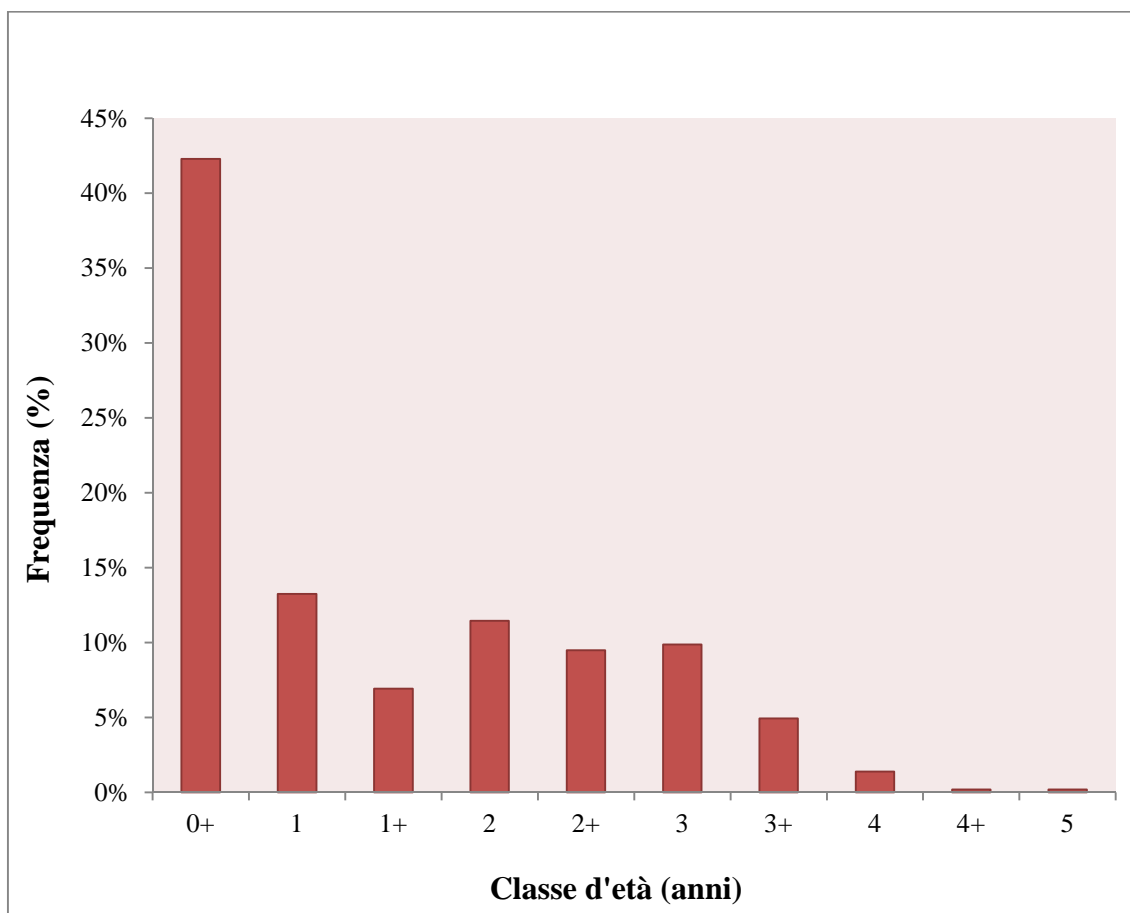


Figura 28 – Analisi di frequenza delle classi d'età del sub-campione dei naselli dell'alto-medio Adriatico.

In Figura 29, utilizzando i valori di lunghezza totale di tutti i naselli con tutti i gruppi di età, la relazione di crescita dei naselli che è stata descritta mostra un andamento lineare della curva (alto tasso di crescita). Quindi, non è stato statisticamente corretto calcolare l'equazione di crescita di von Bertalanffy, in quanto sarebbero servite almeno 8 classi di età.

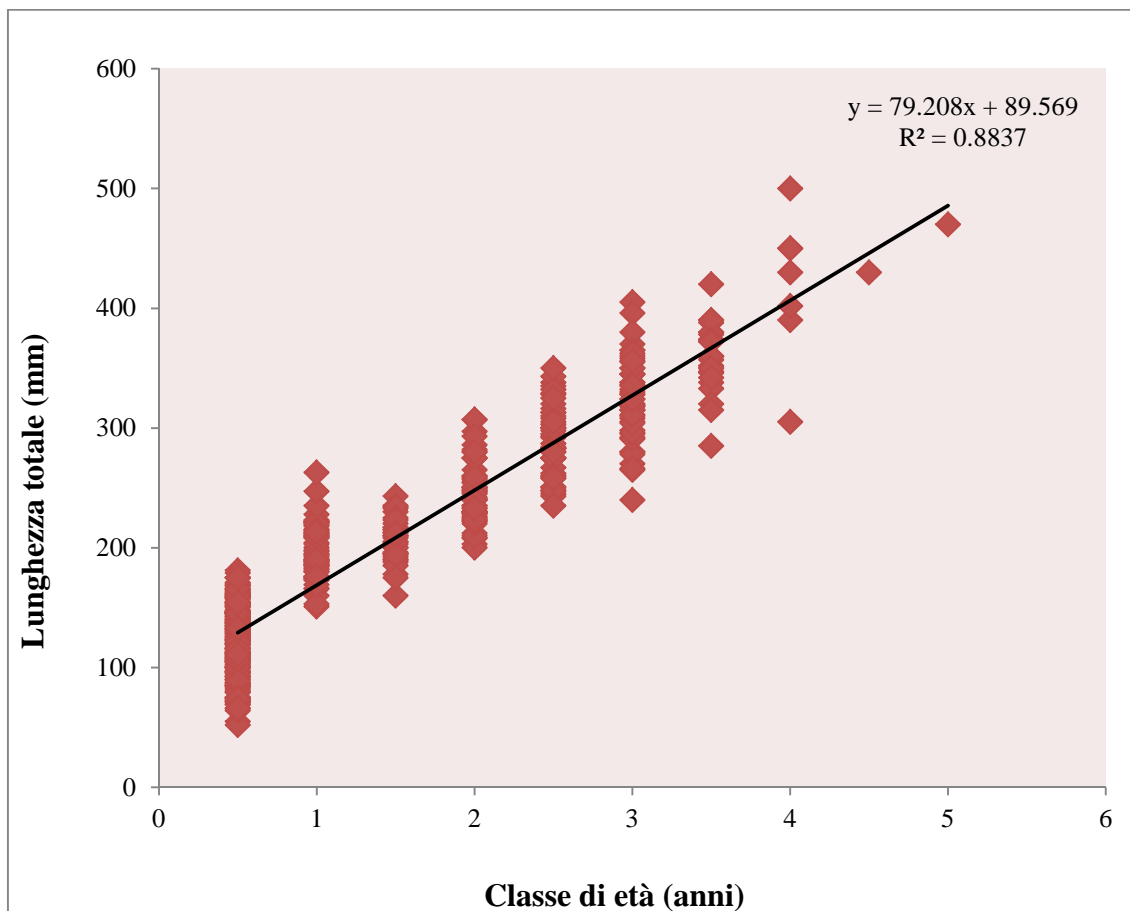


Figura 29 – Modello di crescita descritto dal sub-campione di *Merluccius merluccius* dell'alto-medio Adriatico.

Presi in considerazione tutti i valori di lunghezza totale dei naselli con tutti i gruppi di profondità, in Figura 30, è mostrato un evidente andamento di diminuzione della lunghezza media totale degli individui all'aumentare della profondità.

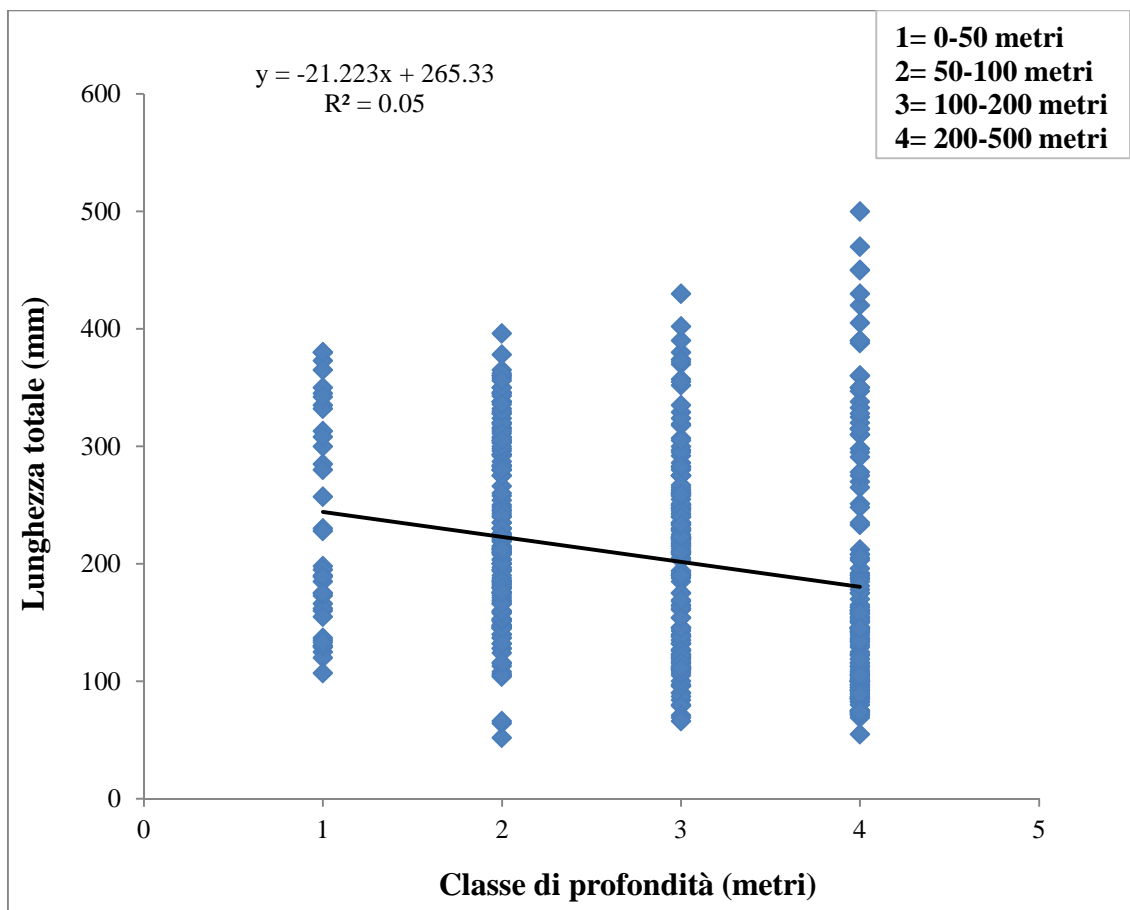


Figura 30 – Relazione tra lunghezza totale dei naselli e le classi di profondità.

La distribuzione degli individui, in relazione alla profondità di cattura e alla loro lunghezza totale, è stata descritta mediante la Figura 31. Si possono distinguere ben tre gruppi di individui:

1. Individui di piccola taglia, fino a 160-170 mm, che sembrano essere distribuiti per lo più negli strati batimetrici tra i 100 e 220 metri di profondità;
2. Gruppo di naselli con un range di taglia compreso tra 180-380 mm, collocati in uno strato batimetrico abbastanza eterogeneo compreso tra i 20 e i 220 metri;
3. Il gruppo dei riproduttori, cioè naselli di taglia superiore a 400 mm, ripartiti nelle acque profonde, circa 180-280 metri.

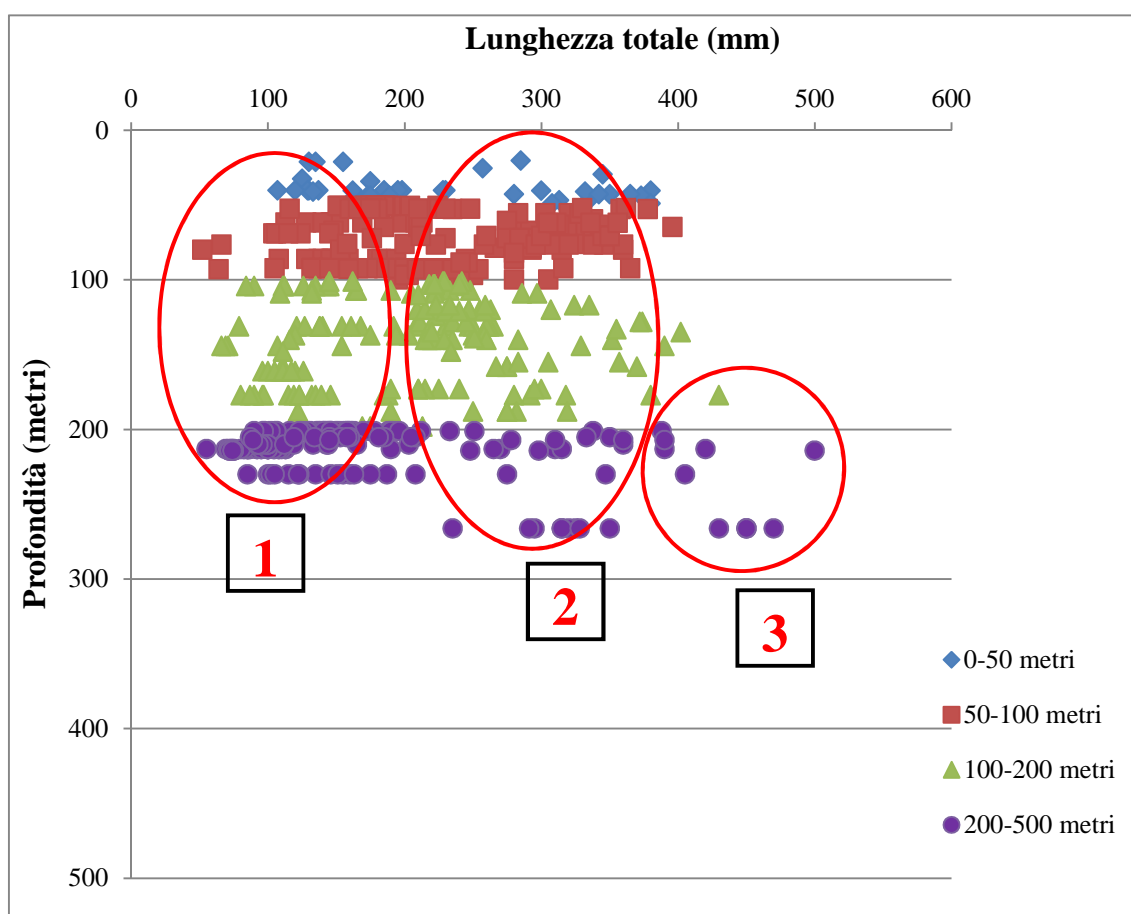


Figura 31 – Distribuzione dei naselli in relazione a taglia e profondità di cattura durante la campagna MedITS nella GSA 17.

Dall'analisi allometrica sia dell'otolite destro che sinistro, tra la lunghezza totale dei naselli e la lunghezza del raggio calcolato dal *core* al primo anello, è chiara una differente distribuzione dei naselli lungo la colonna d'acqua. Gli esemplari di un anno con taglia di 180-190 mm, sono collocati a profondità maggiori insieme ai riproduttori di dimensione elevata (400-500 mm), mentre il resto degli individui con taglia compresa tra i 190 e i 390 mm, sono distribuiti su diversi strati batimetrici (Fig. 32).

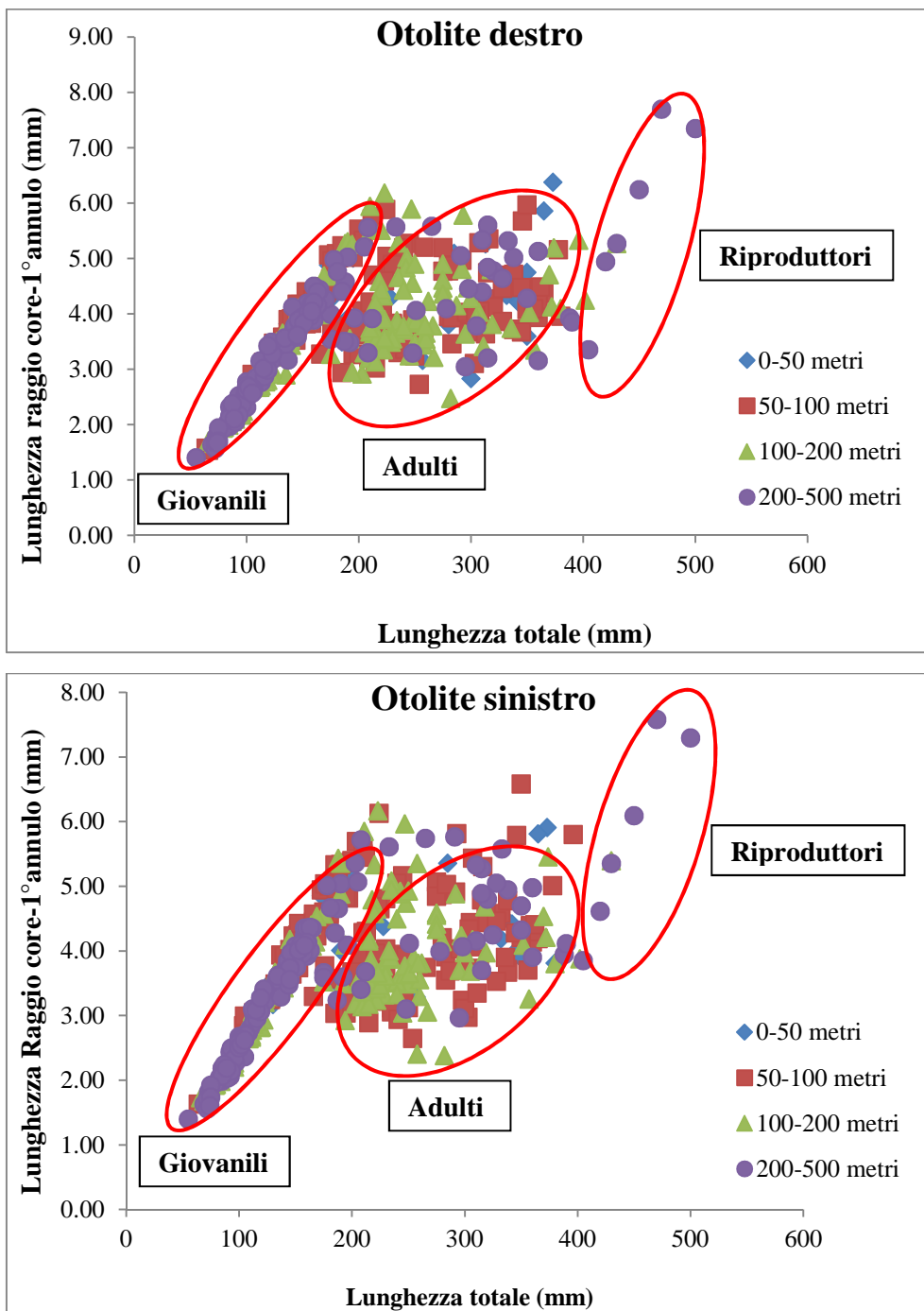


Figura 32 - Analisi di regressione tra la lunghezza totale del pesce e la lunghezza del raggio calcolato dal *core* al primo anello degli otoliti sia destri che sinistri nel *M. merluccius*.

Dalle analisi di allometria per la relazione delle lunghezze pesce-otolite, sia di quello destro che sinistro, si è evidenziato una proporzione lineare (Fig. 33).

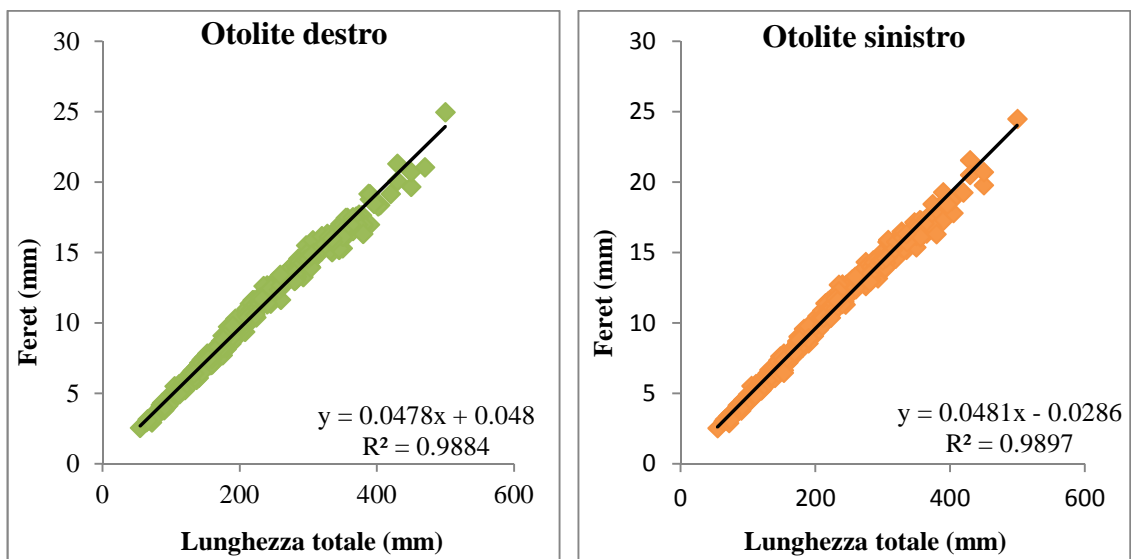


Figura 33 – Analisi di regressione tra la lunghezza totale del pesce e la lunghezza del Feret (diametro maggiore) dell’otolite nel *M. merluccius*.

Allo stesso modo le successive analisi allometriche degli otoliti destri e sinistri, hanno mostrato una relazione lineare tra la lunghezza del pesce, LT-Miniferet, LT-area, e LT-perimetro (Fig. 34, 35, 36).

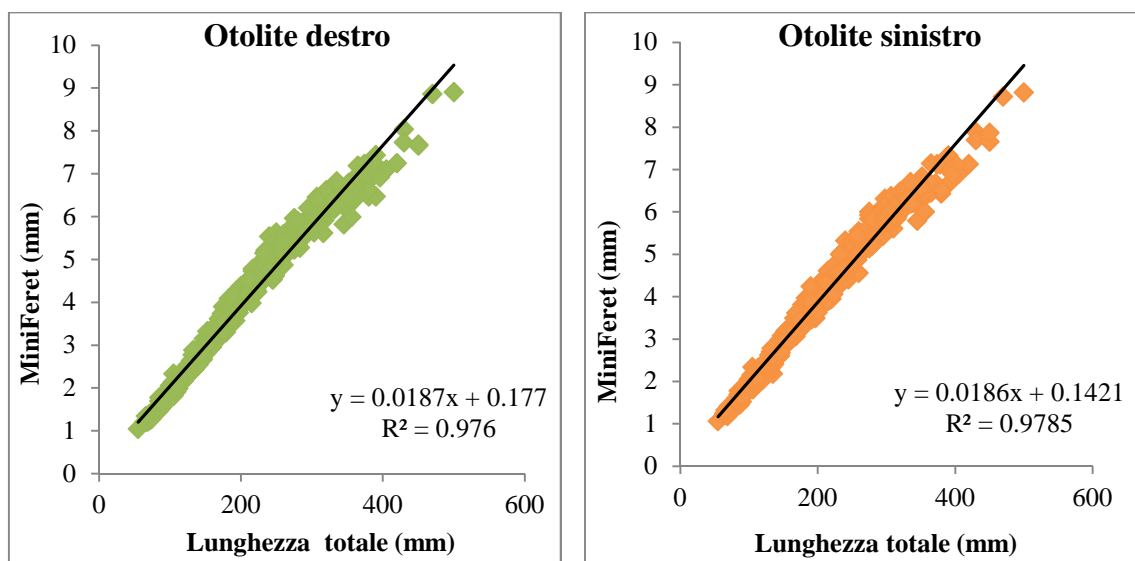


Figura 34 - Analisi di regressione tra la lunghezza totale del pesce e la lunghezza del MiniFerret (diametro minore) dell’otolite nel *Merluccius merluccius*.

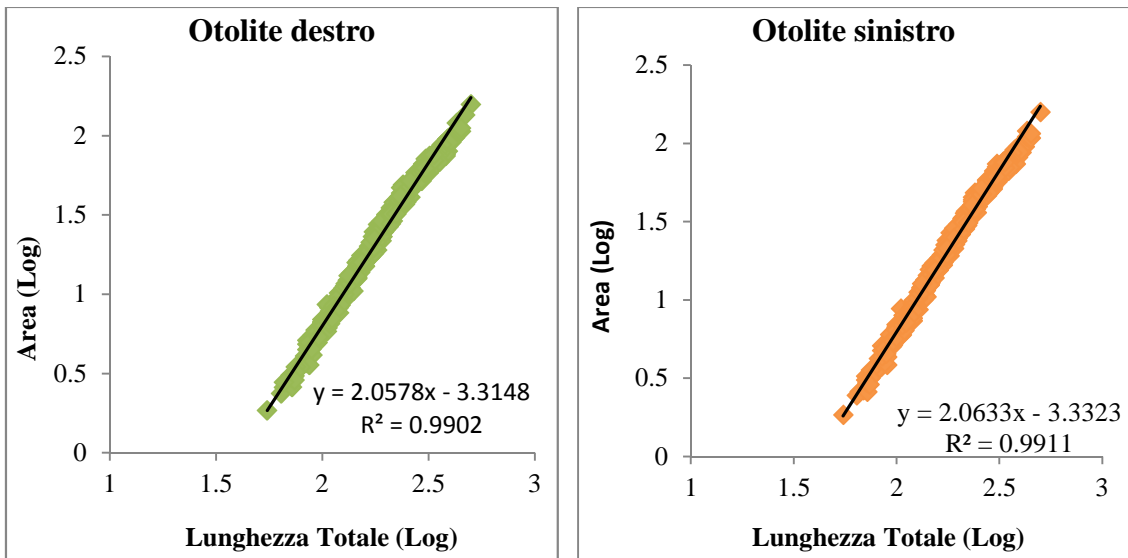


Figura 35 - Analisi di regressione tra la lunghezza totale del pesce e l'area dell'otolite (in scala logaritmica) nel *M. merluccius*.

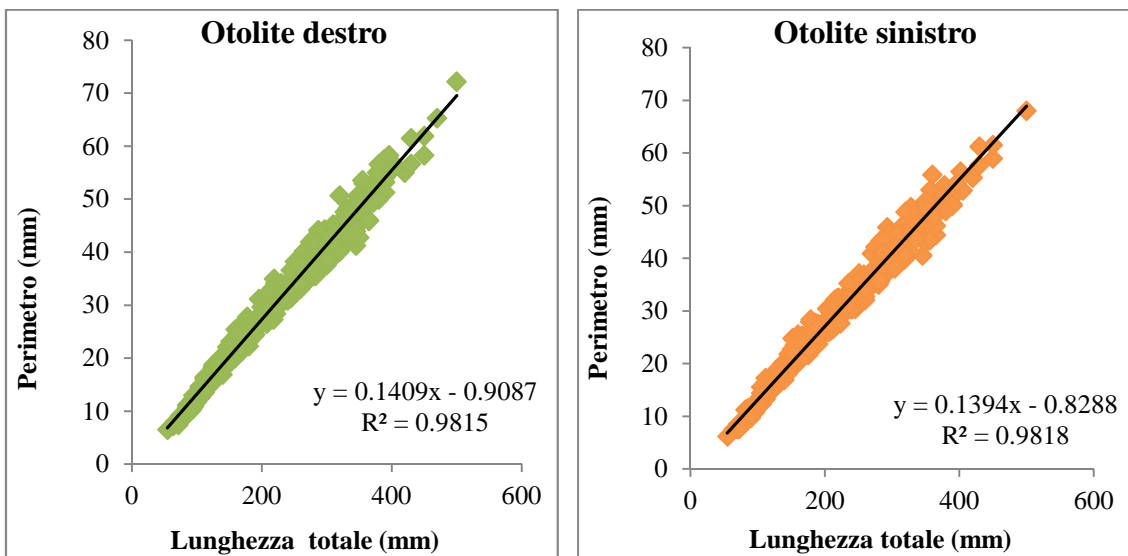


Figura 36 - Analisi di regressione tra la lunghezza totale del pesce e il perimetro dell'otolite nel *Merluccius merluccius*.

Dall'analisi interpretativa del margine incrementale di tutte le 506 coppie di *M. merluccius*, il margine opaco è risultato con il 64% più frequente rispetto al margine traslucente (36%).

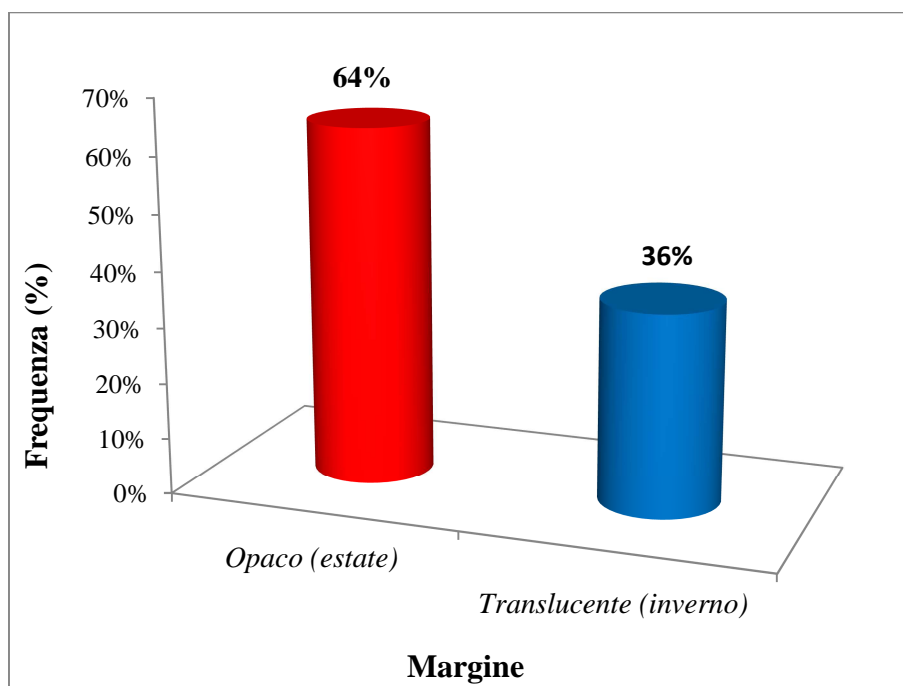


Figura 37 – Frequenza dei margini incrementali delle 506 coppie di otoliti di naselli.

Per capire meglio la distribuzione dei margini, opachi e traslucenti, secondo le classi di taglia dei naselli è stata implementata la Tabella 6.

Tabella 6 – Frequenza di margine degli otoliti di nasello in relazioni alle classi di taglia d'appartenenza.

Classe di taglia (mm)	Frequenza margine opaco (%)	Frequenza margine traslucente (%)
<100	10%	0%
100-139	19%	0%
140-179	14%	3%
180-219	5%	10%
220-259	3%	9%
260-299	4%	5%
300-339	4%	5%
340-379	3%	3%
≥380	1%	2%
Totale	64%	36%

Riportando graficamente l'informazione espressa in Tabella 6, il margine incrementale opaco nelle classi di taglia di individui inferiore ai 180 mm è risultato nettamente dominante, mentre nelle taglie superiori, oltre i 180 mm, la frequenza dei due margini si equivale (Fig. 38).

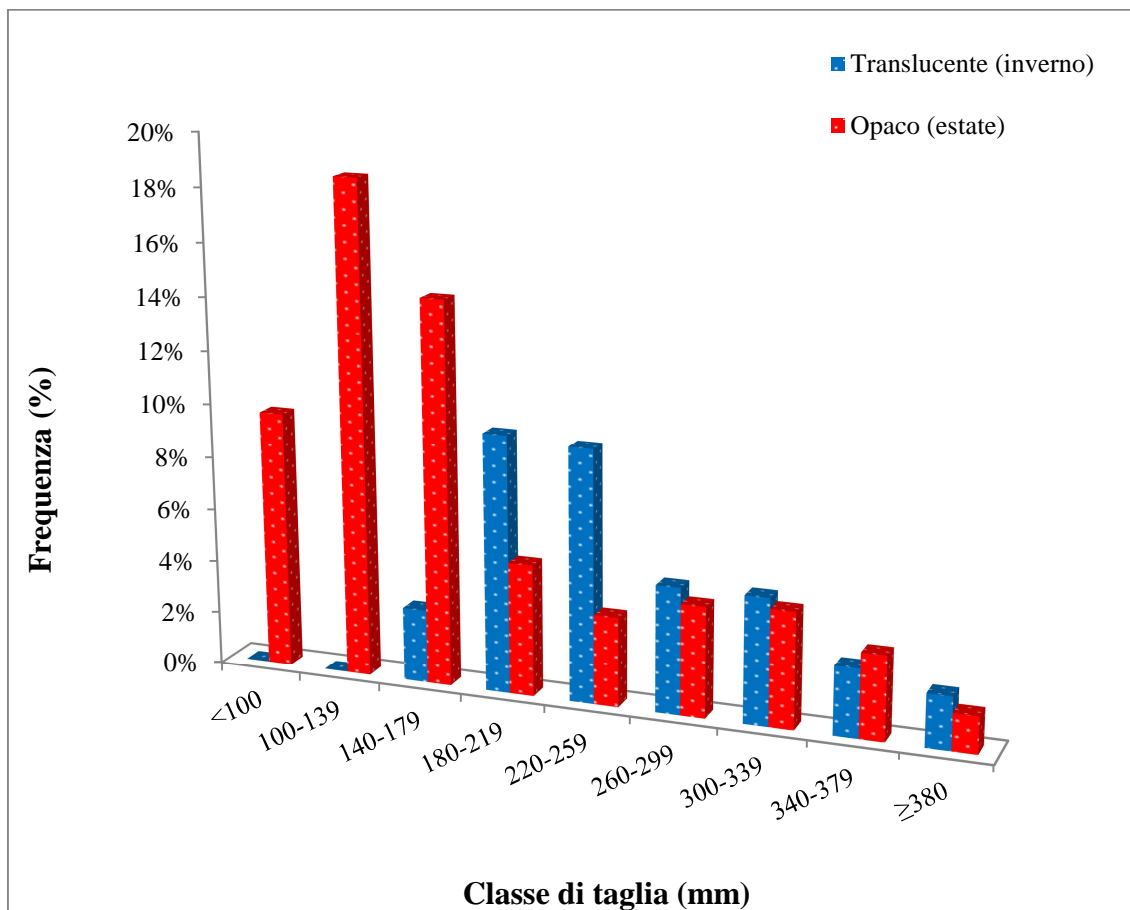


Figura 38 – Frequenza dei margini incrementali degli otoliti di nasello in relazione alla classe di taglia di appartenenza.

4.2 Analisi delle sezioni frontali e sagittali

Il numero di otoliti con sezioni illeggibili (rotti, eccessivamente levigati o con pattern di crescita non definiti) è risultato alto, circa il 10% delle sezioni frontali e sagittali.

In totale, 88 sezioni di otoliti sono risultate interpretabili, in base all'analisi dei patterns di incrementi giornalieri. E' importante specificare una percentuale di errore causato dalla difficoltà in risoluzione degli incrementi nella zona prismatica.

Il conteggio degli otoliti ha evidenziato un range compreso tra gli 86 e 206 incrementi giornalieri corrispondente ad una lunghezza totale dei naselli compresa tra 55 e i 176 mm. Il numero degli incrementi nel nucleo, è variato dai 29 ai 33.

In aggiunta, nella Tabella 7 sono stati sintetizzati i valori più importanti estrapolati dall'analisi delle sezioni frontali e sagittali, come la lunghezza media degli assi di lettura, lo spessore medio tra gli incrementi e il tasso di crescita mensile in lunghezza del sub-campione dei naselli dell'alto-medio Adriatico fino a poco prima del raggiungimento del primo anno di vita.

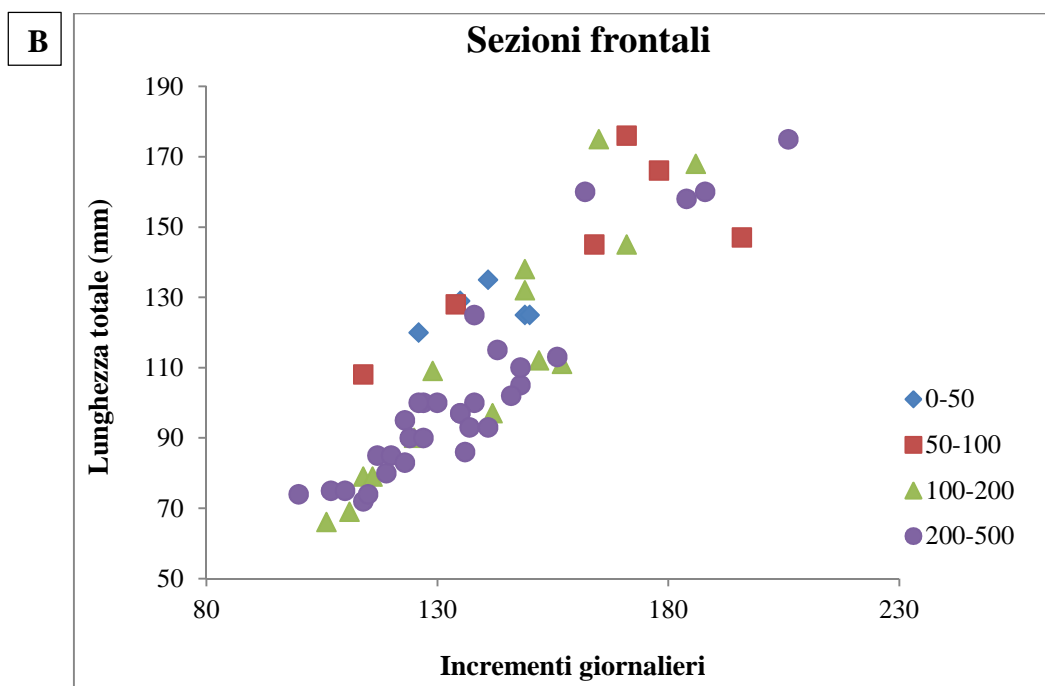
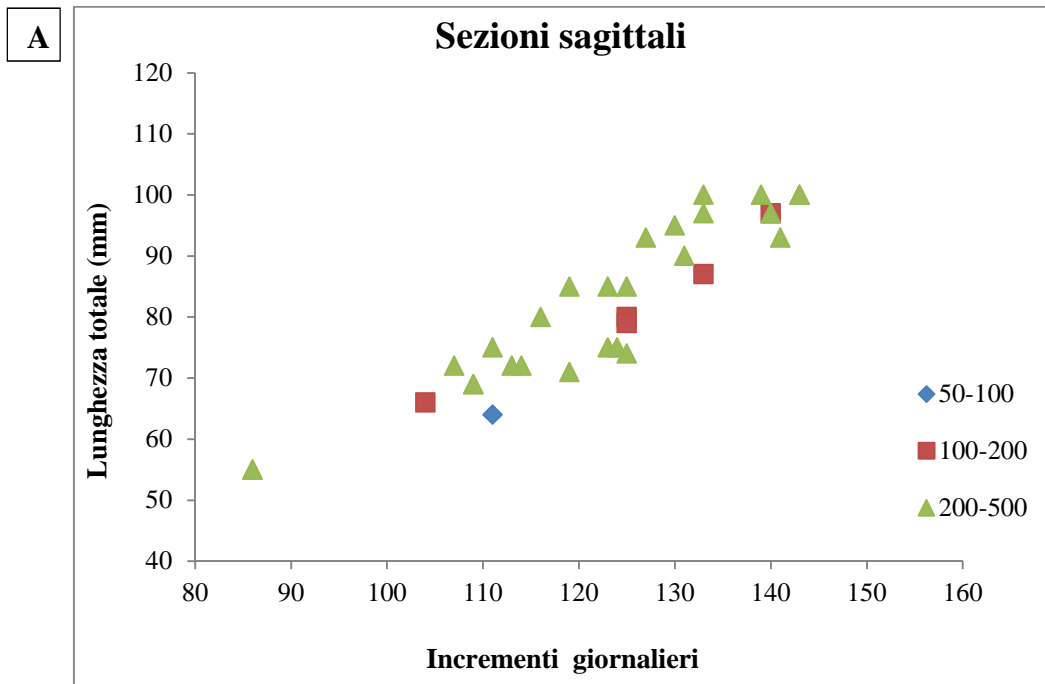
Tabella 7. Dati riassuntivi tratti dall'analisi delle sezioni frontali e sagittali. Lunghezza media degli assi (LA) di lettura maggiore, minore, ortogonale (μm); Spessore medio degli incrementi (SM μm); Lunghezza media calcolata dall'anello di schiusa fino al *settlement* (LS-S μm); Tasso di crescita del pesce in lunghezza (mm).

Classe taglia	Sezione frontale						Sezione sagittale	
	<100	E.S.	100-139	E.S.	140-180	E.S.	<100	E.S.
N° sezioni	29	-	18	-	11	-	30	-
N° increm.	100-142	-	129-183	-	162-206	-	86-143	-
LA	902.23	167.21	-	-	-	-	1701.88	421.66
➤ <i>Magg.</i>	250.77	58.57	300.77	57.85	349.60	56.20	508.21	94.75
➤ <i>Min.</i>	441.85	90.97	476.3	94.98	560.27	95.51	857.91	249.66
➤ <i>Ortog.</i>	7.74	1.07	-	-	-	-	14.25	2.45
SM	2.08	0.40	2.03	0.39	2.10	0.34	4.33	0.76
➤ <i>Magg.</i>	3.81	0.59	3.37	0.73	2.27	0.28	7.73	1.57
➤ <i>Min.</i>	70.19	-	69.03	-	76.1	-	73.29	-
➤ <i>Ortog.</i>	22.08	-	25.16	-	27.15	-	20.99	-
LS-S								
Tasso crescita								

Il modello di crescita dei giovanili di *M. merluccius* è stato riassunto graficamente in Figura 39 (C), dove è stato inglobato l'insieme delle informazioni tratte dalle sezioni frontali (B) e sagittali (A).

In ciascuno dei grafici, inoltre, è stata inserita la classe di profondità di cattura.

La relazione di stima lunghezza-età mostrata nel grafico (C) è lineare, e ha evidenziato la presenza di un raggruppamento, costituito da naselli di età e lunghezza minore, allo strato batimetrico più profondo (200-500 metri).



C

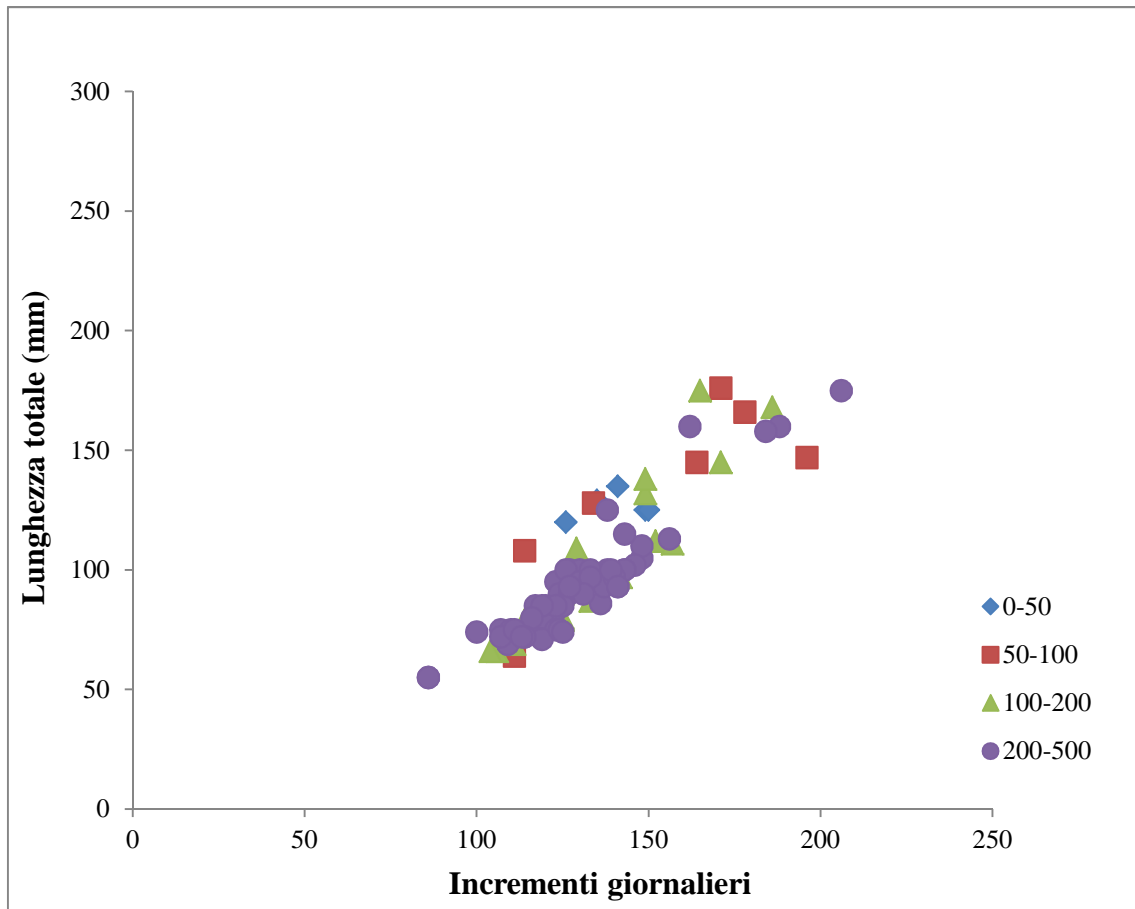


Figura 39 – Curve di crescita dei giovanili del sub-campione di *Merluccius merluccius* nell'alto-medio Adriatico; (A) Letture su sezioni sagittali e in (B) su sezioni frontali. In (C) grafico che mette insieme le letture di entrambe le sezioni.

In Figura 40, sono stati espressi graficamente i confronti tra le medie degli spessori degli incrementi. In particolare, nel grafico A sono state confrontate le medie degli spessori incrementali nei vari assi di lettura, maggiore, minore e ortogonale nelle due diverse sezioni frontale e sagittale; mentre nel grafico B è stata confrontata la differenza delle medie degli spessori incrementali di stessi assi di lettura ma di differenti sezioni.

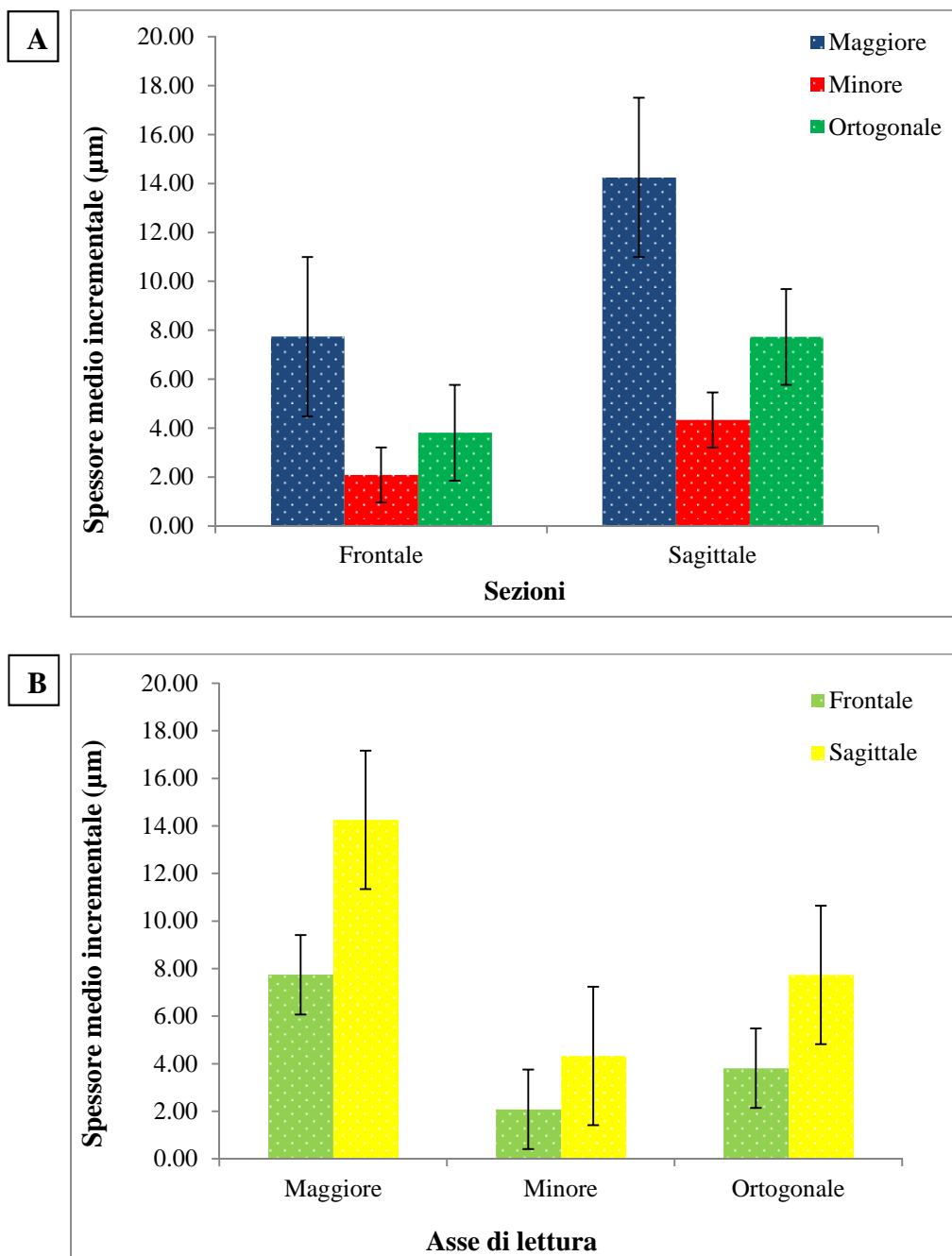


Figura 40 – Spessore medio degli incrementi giornalieri del *M. Merluccius*. (A) In particolare, è presente il confronto degli spessori medi degli incrementi negli assi di lettura delle sezioni frontali e sagittali; (B) Spessori medi incrementali confrontati tra sezioni diverse degli assi di lettura, maggiore, minore e ortogonale.

Il retrocalcolo (*back-calculation*) della distribuzione delle date di schiusa, nonostante disponessimo solamente di dati di cattura del periodo estivo della campagna MedITS, ha mostrato un continuo periodo di schiusa nei mesi invernali dalla fine di Novembre 2011 alla fine di Marzo 2012. In particolare, il picco maggiore è stato riscontrato nei mesi di Febbraio-Marzo (Fig. 41).

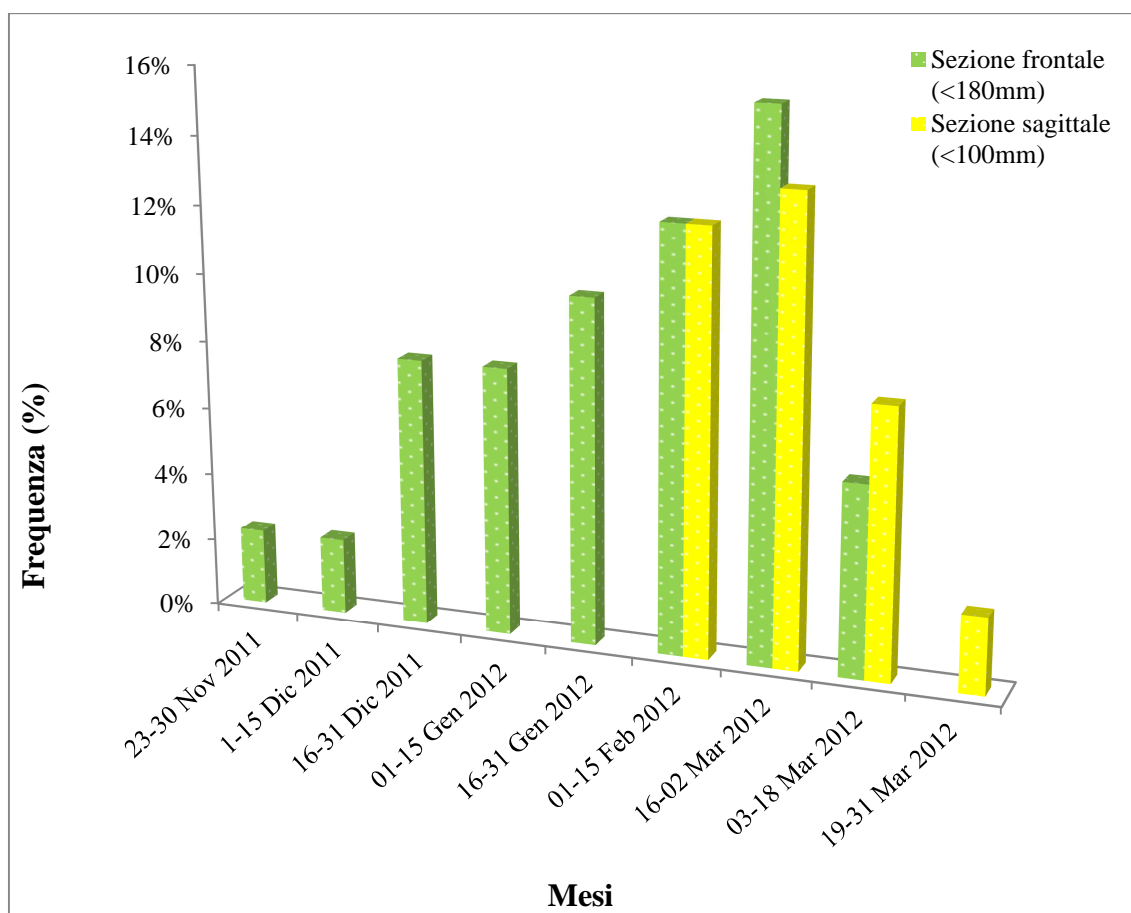


Figura 41 – Distribuzione delle date di schiusa dei giovanili di nasello, *M. merluccius*, nel 2011-2012.

5 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Con il presente lavoro di tesi ho contribuito a descrivere la struttura di età della popolazione di nasello (*M. merluccius*, Linnaeus, 1756), e il reclutamento dei giovanili che caratterizzano il Mar Adriatico centro-settentrionale.

La validazione della formazione periodica dell'incremento è un necessario prerequisito per gli studi di ogni genere di analisi degli otoliti (Campana, 2001). L'applicazione dei metodi diretti di validazione come: allevamento, cattura e marcatura, etc., per determinare la periodicità incrementale del nasello è ancora in progresso in quanto è molto difficoltoso per la biologia del pesce e per la sua distribuzione batimetrica (De Pontual et al., 2003; Morales-Nin et al., 2005).

In questo lavoro di tesi, sono stati applicati quindi, metodi indiretti di validazione per supportare la periodicità giornaliera tramite la formazione incrementale dell'otolite.

La determinazione dell'età del *M. merluccius* è, in generale, difficoltosa a causa di numerose e contraddistinte macrostrutture, come ad esempio, molte zone sottili traslucide, probabilmente corrispondenti a brevi eventi ambientali e/o fisiologici, che rendono complicata la distinzione tra i reali anelli annuali e zone di crescita secondaria chiamati falsi anelli, che spesso aumentano con la taglia del pesce (Courbin et al., 2007). Per questo motivo non possono essere applicati criteri di comune interpretazione (Oliver et al., 1989; Morales-Nin, 1997).

Dall'analisi di frequenza effettuata sulle taglie dei naselli dell'intero campione catturato durante la campagna sperimentale MedITS 2012, le dimensioni dei naselli dominanti sono comprese tra 100 e 160 mm di lunghezza totale (Fig. 25).

L'analisi di frequenza delle classi di taglia di età del sub-campione, ha mostrato una dominanza della classe di età 0+, costituita da reclute che non hanno ancora raggiunto un anno di vita e di dimensioni inferiori a 200 mm di lunghezza totale (Fig. 27-28).

La popolazione di nasello descrive un modello di crescita lineare (Fig. 29), a cui non è stato possibile calcolare l'equazione di crescita di von Bertalanffy, perché non ritenuto statisticamente corretto. Questo è spiegabile dal fatto che lo stock è ancora nella fase di crescita veloce.

Tuttavia, la taglia media raggiunta dal *Merluccius merluccius* nell'alto-medio Adriatico è di circa 199 mm di lunghezza totale alla fine del primo anno di vita. Precedenti articoli, basati sull'analisi degli anelli annuali degli otoliti e sulla progressione modale

hanno riportato lunghezze medie di circa 120 mm nel Mar Ligure (Orsi Relini et al., 1989), e di 170 mm nel Mar Egeo (Uçkun et al., 2000); Colloca et al. (2003) ha determinato una lunghezza di circa 150 mm nel Mar Tirreno centrale; e nell'area dell'Adriatico un range compreso tra i 90 mm (Zupanovic, 1968), 140 mm (Flamigni, 1984), fino ai 190 mm (Ghirardelli, 1959b).

Dall'analisi delle frequenze delle fasce batimetriche è stata rilevata una distribuzione costante dei naselli negli strati tra gli 80 e 300 metri, mentre solo l'8% è distribuito a profondità minore di 80 metri (Fig. 22). Quindi, probabilmente, la distribuzione batimetrica dei naselli dell'alto-medio Adriatico pescati durante la campagna del MedITS nel 2012, si struttura in base alla fase di vita trascorsa dai naselli. In Figura 31, è confermata questa distribuzione: le reclute annuali, di taglia inferiore a 200 mm di lunghezza totale, sono state pescate in aree di elevata profondità compresa tra i 100 e i 220 metri; i riproduttori (>380 mm TL) sono stati ritrovati soltanto negli strati più profondi a circa 280 metri, infine, i naselli adulti hanno mostrato una ripartizione eterogenea lungo tutta la batimetria dettata probabilmente dal cambio di dieta. Questa distribuzione è ulteriormente confermata dalla relazione allometrica tra taglia degli individui e lunghezza del raggio misurato tra *core* e primo annulo (Fig. 32). Questi dati, probabilmente, permettono di confermare quanto detto in letteratura, la piattaforma continentale dell'Adriatico centrale, con le sue condizioni ambientali, nello specifico di temperatura (13.5-14°C) (Morales-Nin & Moranta, 2004) pressoché stabili, favoriscono la riproduzione, il reclutamento e la nursery (Fossa di Pomo).

Per conoscere la relazione che lega la crescita in lunghezza degli esemplari di nasello (LT) con i parametri metrici degli otoliti, sono state condotte le analisi di allometria: LT-Feret, LT-MiniFerret, LT-perimetro e LT-area. I grafici riportati nelle Figure 33, 34, 35, e 36 hanno mostrato che le due lunghezze sono direttamente proporzionali.

La tipologia di margine dell'otolite è collegata a periodi di crescita veloce o lenta degli individui, fornendo un aspetto opaco o traslucido. Dai risultati ottenuti in Figura 37, il bordo opaco è risultato il più frequente. In particolare, predomina per individui con età inferiore ad un anno, in quanto cresciuti durante periodi più caldi, mentre nelle taglie superiori la frequenza dei due margini si equivale.

L'altro approccio di questo studio è stato basato sulla determinazione dell'età delle sagitte degli otoliti dei giovanili di nasello dell'alto-medio Adriatico, oltre a quantificare il tasso di crescita giovanile e il periodo di reclutamento. Come per gli otoliti interi, anche per le sezioni sono stati riscontrati dei problemi di interpretazione dei patterns di

crescita incrementali, a causa soprattutto della presenza di multiprismi di crescita attorno al nucleo e alla formazione di centri di crescita accessoria, probabilmente relazionati all'ambiente di transizione o al comportamento. Queste caratteristiche sono frequenti in numerose specie che subiscono dei cambiamenti durante il passaggio dalla vita pelagica durante la fase larvale al reclutamento sul fondale nello stadio giovanile (Wright, 1993; Modin et al., 1996; Morales-Nin & Aldebert, 1997). Per aggirare queste problematiche, in questo studio, sono state combinate le informazioni estrapolate da due differenti piani di sezionamento, frontale e sagittale, per stimare al meglio l'età di un individuo.

Comunque, un errore di circa una settimana è stato assunto nell'interpretazione delle età, ed inoltre, il giorno di schiusa, primo discernibile incremento, è stato fatto coincidere con il primo deposito incrementale sull'otolite, rappresentando un vero riferimento per il conteggio degli anelli giornalieri. Questo è ovviamente una semplificazione, e come in altri Gadidae, la stima di età dal conteggio degli anelli giornalieri è necessariamente approssimativa (Geffen, 1995).

Gli studi di Palomera et al., (2005) e di Alvarez & Cotano (2005) descrivono un anello scuro al centro della sagitta definendolo come l'anello di schiusa. Questi autori osservano, dal *core* all'anello di schiusa, un numero di incrementi pari a 4-5 (Palomera et al., 2005) e 5-6 (Alvarez & Cotano, 2005).

Dalle 88 sezioni di otoliti analizzati, il numero di incrementi letti è stato compreso tra gli 86 e i 206 anelli, rispettivamente attribuiti ad individui di lunghezza totale pari a 55 e 175 mm.

L'età stimata del sub-campione, quindi, è variata da circa 2-3 a poco meno di 9 mesi. Il tasso di crescita di *M. merluccius* è stimato tra 20.99 a 27.15 mm in lunghezza al mese, dipendente dalla classe di taglia analizzata come riportato in Tabella 7.

I dati ottenuti sembrano rispecchiare un andamento di crescita veloce durante i primi sei mesi di vita, per poi diminuire nei successivi, fino al primo anno di vita. Queste osservazioni sono supportate da studi precedenti, che hanno evidenziato che gli incrementi disposti sotto al prisma del nucleo sono progressivamente più fini, a causa del cambiamento del metabolismo con l'età, che ne potrebbe influenzare la crescita dell'otolite (Morales-Nin, 2000).

Un tasso di crescita di 11.5 mm al mese è stato riportato per i giovanili del NW del Mediterraneo, in particolare nel Golfo del Leone (Morales-Nin & Aldebert, 1997), e tra

7.0 e 12.0 mm al mese per il Mar Ligure (Orsi Relini et al., 1989). Queste stime sono state ottenute tramite le analisi di progressione modale delle frequenze di lunghezza.

La distribuzione delle date di schiusa, determinata dal retrocalcolo (*back-calculation*) dei dati di cattura, è risultato che il periodo di schiusa è avvenuta tra Novembre e Marzo (Fig. 41), con un picco di nascite in quest'ultimo mese, risultando da altri studi essere uno dei principali periodi riproduzione nell'alto-medio Adriatico. Nonostante ciò, questo risultato è avvalorato da Karlovac (1965), che ha trovato larve di nasello durante i campionamenti planctonici in Adriatico da Ottobre a Giugno, con dei picchi durante i mesi invernali. Quindi probabilmente il reclutamento dei giovanili avviene durante tutto l'arco dell'anno, e questa riproduzione protratta, potrebbe essere una strategia adattiva per massimizzare la sopravvivenza, favorita dal mantenimento o dalle piccole variazioni di condizioni di temperatura della piattaforma continentale e dello slope del Mediterraneo dove i pesci risiedono (Morales-Nin & Moranta, 2004). Perciò, la coincidenza delle date di schiusa calcolate con i dati osservati supportano la natura giornaliera degli incrementi degli otoliti e validano indirettamente l'uso dei patterns di crescita per la stima di età dei giovanili di *Merluccius merluccius*.

Questa strategia, però, è contraria a quella osservata in altri Gadiformi come il merluzzo dell'Atlantico, *Gadus morhua*, in cui la riproduzione si concentra in due soli mesi (Anderson & Dalley, 2000).

In conclusione, in questo lavoro di tesi sono stati applicati due diversi approcci che hanno garantito la stima di età di un sub-campione di naselli pescati durante la campagna MedITS nella GSA 17, garantendo una prima valutazione della struttura di popolazione di *Merluccius merluccius*. È stato applicato un nuovo metodo per stimare la crescita dei giovanili di nasello, combinando le analisi microstrutturali delle sezioni frontali e sagittali.

Sebbene, il presente studio potrebbe essere affetto da alcune fonti di incertezza (errore di stima di età, mortalità e dispersione delle larve e dei giovanili, discontinuità del campionamento), il *M. merluccius* sembra in definitiva reclutare durante tutto l'arco dell'anno sulla piattaforma continentale dell'Adriatico centrale, con delle intensità di reclutamento che sono dipendenti dalla stagione e dal tasso di crescita.

È necessario dunque, applicare una notevole protezione degli adulti, perché il successo della specie sembra essere legata alla protezione delle zone profonde in cui i grandi riproduttori si spostano nel corso della loro vita.

6 LAVORI FUTURI

A causa dell'importanza dei dati per la gestione della pesca, questo lavoro di tesi è propedeutico all'implementazione di uno studio futuro basato sulla metodologia di relazione lunghezza-età per stimare i parametri, L_{∞} e k e t_0 , della curva di crescita della popolazione di *Merluccius merluccius* dell'alto-medio Adriatico.

Lo studio futuro dovrebbe anche mirare alla riduzione di alcune fonti di incertezza. Ad esempio, si potrebbero utilizzare dati provenienti da più anni di campionamento, e da campagne sperimentali invernali, per eliminare la discontinuità di campionamento.

Per stimare con maggiore accuratezza l'età, il tasso di accrescimento e la distribuzione delle date di schiusa dei giovanili di nasello, potrebbe essere necessario aumentare la taglia del sub-campione, e considerare anche otoliti di nasello di dimensione maggiori.

Inoltre, si potrebbe provare a colorare gli otoliti per cercare di mettere maggiormente in evidenza gli anelli annuali, e dunque, confermare la loro validazione indiretta. Infine, cercare di focalizzare lo studio futuro sulle analisi di sezioni sagittali, in quanto, rispetto alle sezioni frontali, riescono meglio a mostrare i patterns di crescita.

7 BIBLIOGRAFIA

- Al-Hossaini, M., & Pitcher, T. J. (1988). The relation between daily rings, body growth and environmental factors in plaice, *Pleuronectes platessa* (L.), juvenile otoliths. *Journal of Fish Biology*, 33, 409-418.
- Alvarez, P., & Cotano, U. (2005). Growth, mortality and hatch-date distributions of European hake larvae, *Merluccius merluccius* (L.), in the Bay of Biscay. *Fisheries research*, 76, 379-391.
- Anderson, J. T., & Dalley, E. L. (2000). Interannual differences in hatching times and growth rates of pelagic juvenile cod in Newfoundland waters. *Fisheries research*, 46, 227-238.
- Arneri, E. (1996). Fisheries resources assessment and management in Adriatic and Ionian Seas. *FAO Fisheries Report*, 533, 7-20.
- Artegiani, A., Bregant, D., Paschini, E., Pinardi, N., Raicich, F., & Russo, A. (1997a). The Adriatic Sea general circulation. Part I: air-sea interactions and water mass structure. *Journal of Physical Oceanography*, 27, 1492-1514.
- Assis, C. A. (2005). The utricular otoliths, lapilli, of teleosts: their morphology and relevance for species identification and systematic studies. *Scientia Marina*, 69, 259-273.
- Bailey, K. M., & Stehr, C. L. (1988). The effects of feeding periodicity and ration on the rate of increment formation in otoliths of larval walleye pollock *Theragra chalcogramma* (P.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 122, 147-161.
- Bello, G., Marano, G., Rizzi, S., Jukić, S., & Piccinetti, C. (1986). Preliminary survey on the Adriatic hake, *Merluccius merluccius*, within the Demersal Resources Assessment Programme, Spring 1985 survey. *FAO Fisheries Report*, 345, 200-204.
- Bertrand, J. A., De Sola, L. J., Papaconstantinou, C., Relini, G., Souplet, A., (2002). The general specifications of the MedITS. Survey. *Scientia Marina*, 66 (Suppl.2), 9-17.
- Bini, G. (1968). Atlante dei pesci delle coste italiane. 1-10. Mondo sommerso, Roma.
- Blacker, R. W. (1974). Recent advances in otolith studies. In *Sea fisheries research* (Jones, R.R.H. ed.), pp. 67-90. New York, USA: Wiley.

- Boehlert, G. W., & Yoklavich M. M. (1985). Larval and juvenile growth of sablefish, *Anoplopoma fimbria*, as determined from otolith increments. *Fishery Bulletin*, 83, 475.
- Bombace, G. (1992). Fisheries of the Adriatic Sea. Proceedings of the 25th EMBS: Marine Eutrophication and Population Dynamic. In: G.Colombo et al. (Editors), pp. 379-389.
- Bombace, G., & Lucchetti, A. (2011). Elementi di biologia della pesca. Edagricole. 275-359.
- Bouain, A., & Siau, Y. (1988). A new technique for staining fish otoliths for age determination. *Journal of Fish Biology*, 32, 977-978.
- Brothers, E. B. (1981). What can otolith microstructure tell us about daily and subdaily events in the early life history of fish. *Rapport et Procès-verbaux des réunions du Conseil permanent international pour l'exploration de la mer*, 178, 393-394.
- Brothers, E. B. (1985). Otolith marking techniques for the early life history stages of lake trout. Great Lakes Fishery Commission, *Research Completion Report*. Ann Arbor, Michigan.
- Buljan, M. (1964). Ocjena produktivnosti Jadrana dobivena na temelju njegovih hidrografskih svojstava (Productivity rating of the Adriatic obtained on the basis of its hydrographic properties). *Acta Adriatica*, 11, 35-45.
- Buljan, M., & Zore-Armanda, M. (1971). Osnovi oceanografije i pomorske meteorologije (Basics of Oceanography and Marine meteorology). Institute of Oceanography and Fisheries, Split: Posebna izdanja (Special Editions), 424 p.
- Buljan, M., & Zore-Armanda, M. (1976). Oceanographical properties of the Adriatic Sea. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 14, 11-98.
- Campana, S. E. (1987). Image analysis for microscope-based observations: An inexpensive configuration. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1569, 20.
- Campana, S. E. (1992). Measurement and interpretation of the microstructure of fish otoliths. In *Otolith microstructure examination and analysis*. (Stevenson, D. K., & Campana, S. E. Ed.). pp. 59-71. Ottawa: Canada: *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*.
- Campana, S. E. (2001). Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. *Journal of fish biology*, 59, 197-242.

- Campana, S. E., & Casselman, J. M. (1993). Stock discrimination using otolith shape analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 50, 1062-1083.
- Campana, S. E., & Moksness, E. (1991). Accuracy and precision of age and hatch date estimates from otolith microstructure examination. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 48, 303-316.
- Campana, S. E., & Neilson, J. D. (1985). Microstructure of fish otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 1014-1032.
- Casselman, J. M. (1974). Analysis of hard tissue of pike *Esox lucius* (L.) with special reference to age and growth. In *The Age of fish* (Benegal, T.B., ed.), pp. 13-27. Old Woking, UK: Unwin Brother's Limited.
- Casselman, J. M. (1982). Chemical analyses of the optically different zones in eel otoliths. In *Proceedings of the 1980 North American Eel Conference, Ontario Fisheries Technical Report Series*. 4 (Loftus, K.H. ed.), pp. 74-82.
- Casselman, J. M. (1983). Age and growth assessment of fish from their calcified structures techniques and tools. In *Proceedings of the international workshop on age determination of oceanic pelagic fishes. Tunas, Billfishes, and Sharkes* (Prince, E.D. & Pulos, L.M., ed.), pp. 1-17. *NOAA Technical Report NMFS*, 8.
- Casselman, J. M. (1987). Determination of age and growth. In *The biology of fish growth*, (Weatherley, A.H. & Gill, H.S., ed.), pp. 209-242. Orlando, USA: Academic Press.
- Castonguay, M., Simard, P., & Gagnon, P. (1991). Usefulness of Fourier analysis of otolith shape for Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*) stock discrimination. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 296-302.
- Cataudella S., & Spagnolo M., (2011). Lo stato della pesca e dell'acquacoltura nei mari italiani a cura di OnLine Group srl – Roma, 73-77.
- Christensen, J. M. (1964). Burning of otoliths, a technique for age determination of soles and other fish. *Journal du Conseil Permanent International por l'Exploration de la Mer*, 29, 73-81.
- Coll, M., Santojanni, A., Palomera, I., & Arneri, E. (2009). Food-web changes in the Adriatic Sea over the last three decades. *Marine Ecology Progress Series*, 381, 17-37.

- Colloca, F., Centiloni, P., Belluscio, A., Carpentieri, P., & Ardizzone, G. M. (2003). Analysis and validation annual increments in otoliths of European hake (*Merluccius merluccius*) in the central Mediterranean. *Sea. Archive of Fishery and Marine Research*, 50, 2-2.
- Collins, M. R., Schmidt, D. J., Waltz, C. W., & Pinckney, J. L. (1989). Age and growth of king mackerel, *Scomberomorus cavalla*, from the Atlantic coast of the United States. *Fishery Bulletin*, 87, 49-61.
- Commissione Europea – Web Site. Fisheries_Marine wild-species [Cited 18-09-2015]. http://ec.europa.eu/fisheries/marine_species/wild_species/hake/index_en.htm
- Committee of Age Reading Experts (CARE). Manual on generalized age determination. [Cited 18 September 2014]. <http://care.psmfc.org>
- Cordier, R. & Dalcq, A. (1954). Organe stato-acoustique. In *Traité de Zoologie* (Grassé P.P. ed.), vol. XII, pp. 453-521. France: Paris: Masson.
- Courbin, N., Fablet, R., Mellon, C., & De Pontual, H. (2007). Are hake otolith macrostructures randomly deposited? Insights from an unsupervised statistical and quantitative approach applied to Mediterranean hake otoliths. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 64, 1191-1201.
- Cowan Jr, J. H. (1988). Age and growth of Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus*, larvae collected in the coastal waters of the northern Gulf of Mexico as determined by increments in saccular otoliths. *Bulletin of Marine Science*, 42, 349-357.
- Dabrowski, K., & Tsukamoto, K. (1986). Tetracycline tagging in coregonid embryos and larvae. *Journal of Fish Biology*, 29, 691-698.
- Dannevig, E. H. (1956). Chemical composition of the zones in cod otoliths. *Journal du Conseil permanent international pour l'exploration de la mer*, 21, 156-159.
- De Vries, D. A., Grimes, C. B., Lang, K. L., & White, B. D. (1990). Age and growth of king and Spanish mackerel larvae and juveniles from the Gulf of Mexico and U.S. South Atlantic Bight. *Environmental Biology of Fishes*, 29, 135-143.
- Degens, E. T., Deuser, W. G. & Haedrich, R. L. (1969). Molecular structure and composition of fish otoliths. *Marine Biology*, 2, 105-113.
- De Pontual, H., Bertignac, M., Battaglia, A., Bavouzet, G., Moguedet, P., & Groison, A. L. (2003). A pilot tagging experiment on European hake (*Merluccius merluccius*): methodology and preliminary results. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 60, 1318-1327.

- Dunkelberger, D. G., Dean, J. M., & Watabe, N. (1980). The ultrastructure of the otolithic membrane and otolith in the juvenile mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Morphology*, 163, 367-377.
- FAO FishFinder - Web Site. FAO FishFinder. FI Institutional Websites. In: *FAO Fisheries and Aquaculture Department* [online]. Rome. Updated . [Cited 18-09-2015]. <http://www.fao.org/fishery/fishfinder/en>
- Flamigni, C. (1984). Preliminary utilization of trawl survey data for hake (*Merluccius merluccius* L.) population dynamics in the Adriatic Sea. *FAO Rapport Pechs / FAO Fisheries Report*, 290, 109-115.
- Frattoni, C., & Casali, P. (1998). Distribuzione di Gadiformi in Alto e Medio Adriatico. *Biologia Marina Mediterraneo*, 5, 82-98.
- Frattoni, C., & Paolini, M. (1995). Ruolo delle acque profonde quale nursery per *Merluccius merluccius* (L.). *Biologia Marina Mediterraneo*, 2, 281-286.
- Friedland, K. D., & Reddin, D. G. (1994). Use of otolith morphology in stock discriminations of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 91-98.
- Frogliola, C. (1973). Osservazioni sull'alimentazione del merluzzo (*Merluccius merluccius* L.) del medio Adriatico. *Atti V Congresso Nazionale della Società Italiana Biologi Marini*, Ed. Salentina nardo, 327-341.
- Gauldie, R. W. (1987). The fine structure of check rings in the otolith of the New Zealand orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 21, 267-274.
- Gauldie, R. W., & Nelson, D. G. A. (1988). Aragonite twinning and neuroprotein secretion are the cause of daily growth rings in fish otoliths. *Comparative Biochemistry and Physiology* 90A, 501-509.
- Geffen, A. J. (1982). Otolith ring deposition in relation to growth rate in herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae. *Marine Biology*, 71, 317-326.
- Geffen, A. J. (1983). The deposition of otolith rings in Atlantic salmon, *Salmo salar* (L.), embryos. *Journal of Fish Biology*, 23, 467-474.
- Geffen, A. J. (1995). Growth and otolith microstructure of cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Journal of Plankton Research*, 17, 783-800.

- Ghirardelli, E. (1959b). Contribution à l'étude de la biologie des soles (*Solea solea*) en moyenne Adriatique. *Proceedings of General Fisheries Council for the Mediterranean*, 5, 481-487.
- Giovanardi, O., & Rizzoli, M. (1984). Biological data, collected during expeditions Pipeta, on the whiting, *Merlangius merlangius* (L.) in the Adriatic Sea. *FAO, Fisheries Report*, 290, 149-153.
- Grasse, P. P. (1958). L'oreille et ses annexes. In *Traité de Zoologie, Anatomie, systématique, biologie*. Tome XIII (1), *Agnathes et Poissons: anatomie, éthologie, systématique* (Grassé, P.P., ed.), pp. 1061-1099. Paris, France: Masson.
- Haake, P. W., Wilson, C. A., & Dean, J. M. (1982). A technique for the examination of otoliths by SEM with application to larval fishes, p 12-15. In *Proceedings of the 5th Annual Larval Fish Conference* (Bryan, C.F. Conner, J.V. and Truesdale, F.M., ed.). Louisiana State University Press. Baton Rouge, LA.
- Hecht, T. (1979). *The Value of Otoliths in Fresh Water Fisheries Biology and Taxonomy*. Department of Zoology and Biology, University of the North.
- Hildebrand, M. (1988). *Analysis of vertebrate structure*. John Wiley and Sons, New York.
- Hovenkamp, F. (1990). Growth differences in larval plaice *Pleuronectes platessa* in the Southern Bight of the North Sea as indicated by otolith increments and RNA/DNA ratios. *Marine Ecology Progress Series*, 58, 205-215.
- ICES, (2009). Workshop on Age Reading of European and American Eel (WKAREA), 20-24 April 2009, Bordeaux, France. ICES CM 2009\ACOM: 48. 66 pp.
- Jardas, I. (1976). Contribution to the knowledge of the biology of hake in the Adriatic Sea. *Rev. Trav. Inst. Peches marit.*, 40, 615-618.
- Jardas, I. (1996). Jadranska ihtiofauna. *Školska knjiga*, Zagreb, 536.
- Jardas, I., Pallaoro, A., Vrgoc, N., Jukic-Peladic S., & Dadic, V., (2008). Red book of sea fishes of Croatia. Ministarstvo kulture RH, Zagreb, 396.
- Jobling, M. (1995). *Environmental Biology of Fishes*. Chapman and Hall, London.
- Jukić, S. (1972). Ishrana oslića (*Merluccius merluccius*), bukve (*Boops boops*) trlje (*Mullus barbatus*) i arbuna (*Pagellus erythrinus*) u Kaštelanskom zaljevu. *Acta Adriatica*, 14, 1-40.
- Jukić, S., & Arneri, E. (1984). Distribution of hake (*Merluccius merluccius* L.), Red mullet (*Mullus barbatus* L.) and Pandora (*Pagellus erythrinus* L.) in the Adriatic sea. *FAO, Fisheries Report*, 290, 85-91.

- Jukić, S., & Piccinetti, C. (1981). Quantitative and qualitative characteristics of demersal resources in the Adriatic sea with some population dynamic estimates. *FAO, Fisheries Report, 253*, 73-91.
- Jukic-Peladic, S., Vrgoc, N., Krstulovic-Sifner, S., Piccinetti, C., Piccinetti-Manfrin, G., Marano, G., & Ungaro, N. (2001). Long-term changes in demersal resources of the Adriatic Sea: comparison between trawl surveys carried out in 1948 and 1998. *Fisheries research, 53*, 95-104.
- Kalish, J. M. (1989). Otolith microchemistry: validation of the effects of physiology, age and environment on otolith composition. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 132*, 151-178.
- Kalish, J. M. (1991a). Determinants of otolith chemistry: seasonal variation in the composition of blood plasma, endolymph and otoliths of bearded rock cod *Pseudophycis barbatus*. *Marine Ecology. Progress Series, 74*, 137-159.
- Kalish, J. M., Beamish, R. J., Brothers, E. B., Casselman, J. M., Francis, R. I. C. C., Mosegaard, H., Panfili, J., Prince, E. D., Thresher, R. E., Wilson, C. A. & Wright, P. J. (1995). Glossary. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E. ed.), pp. 723-729. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Karakiri, M., Berghahn, R., & van der Veer, H. W. (1991). Variations in settlement and growth of 0-group plaice (*Pleuronectes platessa* L.) in the Dutch Wadden Sea as determined by otolith microstructure analysis. *Netherlands Journal of Sea Research, 27*, 345-351.
- Karlovac, J. (1965). Contribution à la connaissance de l'écologie du merlu, *Merluccius merluccius* (L.), dans le stade planctonique de sa vie en Adriatique. *Rapp. PV Reun. CIESM, 18*, 461-464.
- Karlovac, O. (1959). On the feeding of the hake (*Merluccius merluccius* L.) of the Adriatic Sea. *Proceedings of General Fisheries Council for the Mediterranean, 5*, 333-339.
- Kirinčić, J., & Lepetić, V. (1955). Recherches sur l'ichthyobentos dans les profondeurs de l'Adriatique méridionale et possibilité d'exploitation au moyen des palangres. *Acta Adriatica, 7*, 1-113.

- Krstulović-Šifner, S., Vrgoč, N., Dadić, V., Isajlović, I., Peharda, M., & Piccinetti, C. (2009). Long-term changes in distribution and demographic composition of thornback ray, *Raja clavata*, in the northern and central Adriatic Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 25,40-46.
- Lombarte, A., & Leonart, J. (1993). Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environmental biology of fishes*, 37, 297-306.
- Lowenstein, O. (1971). The Labyrinth. In *Fish physiology*, 5, (Hoar, W.S. & Randall, D.J., ed.), pp. 207-240. New York, USA: Academic Press.
- Maceina, M. J., Hata, D. N., Linton, T. L., & Landry Jr, A. M. (1987). Age and growth analysis of spotted seatrout from Galveston Bay, Texas. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116, 54-59.
- Maillet, G. L. & Checkley Jr, D. M. (1990). Effects of starvation on the frequency of formation and width of growth increments in sagittae of laboratory-reared Atlantic menhaden *Brevoortia tyrannus* larvae. *Fishery Bulletin*, 88, 155-165.
- Mann, S., Parker, S. B., Ross, M. D., Skarnulis, A. J., & Williams, R. J. P. (1983). The ultrastructure of the calcium carbonate balance organs of the inner ear: an ultra-high resolution electron microscopy study. *Proceedings of the Royal Society of London*, 218, 415-424.
- McGurk, M. D. (1984). Effects of delayed feeding and temperature on the age of irreversible starvation and on the rates of growth and mortality of Pacific herring larvae. *Marine Biology* 84, 13-26.
- MEDITS-Handbook. Version n. 7, 2013, MEDITS Working Group : 120 pp. [25-09-2014]. <http://www.sibm.it/MEDITS%202011/principalelinks.htm>
- Messieh, S. N., MacDougall, C., & Claytor, R. (1989). Separation of Atlantic herring (*Clupea harengus*) stocks in the southern Gulf of St. Lawrence using digitized otolith morphometrics and discriminant function analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1647.
- Modin, J., Fagerholm, B., Gunnarsson, B., & Pihl, L. (1996). Changes in otolith microstructure at metamorphosis of plaice, *Pleuronectes platessa* (L.). *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 53, 745-748.
- Morales-Nin, B. (1986b). Structure and composition of otoliths of Cape hake *Merluccius capensis*. *South African Journal of Marine Science*, 4, 3-10.

- Morales-Nin, B. (1987a). The influence of environmental factors on microstructure of otoliths of three demersal fish species caught off Namibia (Payne, A.I.L., Gulland, J.A. & Brink, K.H. ed.), *The Benguela and Comparable Ecosystems South African Journal of Marine Science*, 5, 255-262.
- Morales-Nin, B. (1988). Caution in the use of daily increments for ageing tropical fishes. *Fishbyte*, 6, 5-6.
- Morales-Nin, B. (1992). Determination of growth in bony fishes from otolith microstructure. *FAO Fisheries Technical Paper*, 322.
- Morales-Nin, B. (1997). Review on the European hake age determination and validation problems. *EFAN Report*, 1-97.
- Morales-Nin, B. (2000). Review of the growth regulation processes of otolith daily increment formation. *Fisheries Research*, 46, 53-67.
- Morales-Nin, B., & Aldebert, Y. (1997). Growth of juvenile *Merluccius merluccius* in the Gulf of Lions (NW Mediterranean) based on otolith microstructure and length-frequency analysis. *Fisheries Research*, 30, 77-85.
- Morales-Nin, B., & Moranta, J. (2004). Recruitment and post-settlement growth of juvenile *Merluccius merluccius* on the western Mediterranean shelf. *Scientia Marina*, 68, 399-409.
- Morales-Nin, B., Moranta, J., García, C., Tugores, M. P., Grau, A. M., Riera, F., & Cerdà, M. (2005). The recreational fishery off Majorca Island (western Mediterranean): some implications for coastal resource management. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil*, 62, 727-739.
- Morales-Nin, B., & Ralston, S. (1990). Age and growth of *Lutjanus kasmira* (Forskål) in Hawaiian waters. *Journal of Fish Biology*, 36, 191-203.
- Morison, A. K., Robertson, S. G., & Smith, D. C. (1998). An integrated system for production fish aging: image analysis and quality assurance. *North American Journal of Fisheries Management*, 18, 587-598.
- Mosegaard, H., Svedäng, H., & Taberman, K. (1988). Uncoupling of somatic and otolith growth rates in Arctic char (*Salvelinus alpinus*) as an effect of differences in temperature response. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45, 1514-1524.

- Mosegaard, H., Morales-Nin, B., Weidman, C., Geffen, A., Arneri, E., Millner, R., Panfili, J. & Folkvord, A. (1998). Otolith thin-section preparation: some problems and new developments. In *Otolith preparation and analysis* (Wright, P. ed.). *EFAN Report 2/1998*, 11-22.
- Mugiya, Y. (1984). Diurnal rhythm in otolith formation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*: seasonal reversal of the rhythm in relation to plasma calcium concentrations. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 78A, 289-293.
- Mugiya, Y. (1987). Phase difference between calcification and organic matrix formation in the diurnal growth of otoliths in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fishery Bulletin*, 85, 395-401.
- Mugiya, Y., Hirabayashi, S., & Ohsawa, T. (1985). Microradiography of otoliths and vertebral centra in the flatfish *Limanda Herzensteini*: hypermineralization in the hyaline zones. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 51, 219-225.
- Neilson, J. D., & Geen, G. H. (1982). Otoliths of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*): daily growth increments and factors influencing their production. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39, 1340-1347.
- Nolf, D. 1995, Studies on fossil otoliths: the state of the art. In *Recent developments in fish otolith research* (Secor, D.H., Dean, J.M. & Campana, S.E., ed.), pp. 513-544. Columbia, SC, USA: University of South Carolina Press.
- Ntiba, M. J., & Jaccarini, V. (1988). Age and growth parameters of *Siganus sutor* in Kenyan marine inshore water, derived from numbers of otolith microbands and fish lengths. *Journal of Fish Biology*, 33, 465-470.
- Oliver, P., Alvarez, F., & Morales-Nin, B. (1989). Report on the age-reading Workshop on Mediterranean European hake and Sardine, Palma de Mallorca, Spain, 10–15 April 1989. *FAO Fisheries Report*, 447, 79-84.
- Orsi Relini, L., Papaconstantinou, C., Jukic-Peladic, S., Souplet, A., Gil de Sola, L., Piccinetti, C., Kavadas, S., & Rossi, M. (2002). Distribution of the Mediterranean hake populations (*Merluccius merluccius smiridus* R.) (Osteichthyes: Gadiformes) based on six years monitoring by trawl-surveys: some implications for management. *Scientia Marina*, 66, 21-38.
- Palomera, I., Olivar, M. P., & Morales-Nin, B. (2005). Larval development and growth of the European hake *Merluccius merluccius* in the northwestern Mediterranean. *Scientia Marina*, 69, 251-258.

- Panfili, J., Pontual H. (de)., Troadec H., & Wright P. J. (eds). (2002). *Manual of fish sclerochronology*. Brest, France: Ifremer-IRD coedition, 464 p.
- Pannella, G. (1971). Fish otoliths: daily growth layers and periodical patterns. *Science* 173, 1124-1127.
- Pannella, G. (1974). Otoliths growth patterns: an aid in age determination in temperature and tropical fishes. In *The ageing of fish* (Bagenal, T.B., ed.), pp. 28-39. London, UK: Unwin Brother's Limited.
- Pannella, G. (1980). Growth pattern in fish sagittae. In *Skeletal growth of aquatic organisms. Biological records of environmental change* (Rhoads, D.C & Lutz, R.A., ed.), pp. 519-560. New York, USA and London, UK: Plenum Press.
- Piccinetti, C., & Piccinetti Manfrin, G. (1971). Osservazioni sull'alimentazione del merluzzo (*Merluccius merluccius* L.) in Alto e Medio Adriatico. *Note Laboratorio Biologia Marina: Fano*, 4, 41-64.
- Piccinetti, C., & Piccinetti Manfrin, G. (1994). Considerazioni sullo stato di sfruttamento delle risorse demersali (Alto e Medio Adriatico). *Biologia Marina Mediterranea*, 1, 77-87.
- Piccinetti, C., Vrgoc, N., Marçeta, B., & Manfredi, C., (2012). La situazione delle risorse ittiche nel mare Adriatico. *Acta Adriatica, Monograph Series*, 5, 220.
- Popper, A. N., & Hoxter, B. (1981). The fine structure of the sacculus and lagena of a Teleost fish. *Hearing research*, 5, 245-263.
- Relini, G. (1998). I progressi della ricerca italiana sulla pesca a strascico. *Biologia Marina Mediterranea*, 5, 3-21.
- Relini, G., Carpentieri, P., & Murenu, M., (eds.) (2008). Manuale di Istruzioni Medits (Medits Instruction Manual). *Biologia Marina Mediterranea*, 15 (Suppl. 2): 1-78.
- Rice, J. A., Crowder, L. B., & Holey, M. E. (1987). Exploration of mechanisms regulating larval survival in Lake Michigan bloater: a recruitment analysis based on characteristics of individual larvae. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116, 703-718.
- Richter, H. & McDermott, J. G. (1990). The staining of fish otoliths for age determination. *Journal of Fish Biology*, 36, 773-779.
- Rinaldi, A. (2008). Atlante della fauna e della flora nel sistema marino costiero dell'Emilia-Romagna. La mandragora.

- Rè, P., Rosa, H. C. & Dinis, M. T. (1985). Diel rhythms in *Dicentrarchus labrax* (L., 1758) larvae under controlled conditions: swim bladder inflation, feeding and otolith growth. *Centro de Investagaciones Pesqueras*, 49, 441-418.
- Ross, M. D., & Pote, K. G. (1984). Some properties of otoconia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 304 B, 445-452.
- Secor, D. H., Dean, J. M. & Leban, E. H. (1991). *Manual for otolith removal and preparation for microstructural examination*. Baruch Institute Technical Report 91-1. University South Carolina, Columbia, SC, 85.
- Secor, D. H., Dean, J. M. & Leban, E. H. (1992). Otolith removal and preparation for microstructural examination. In *Otolith microstructure examination and analysis* (Stevenson, D.K. & Campana, S.E., ed.), pp.19-57. Ottawa, Canada: *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences* 117.
- Stagioni, M., Montanini, S., & Vallisneri, M. (2011). Feeding habits of European hake, *Merluccius merluccius* (Actinopterygii: Gadiformes: Merlucciidae), from the northeastern Mediterranean Sea. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 41, 277-284.
- Sych, R. (1974). The sources of errors in ageing fish and considerations of the proofs of reliability. In *The ageing of fish* (Bagenal, T.B., ed.), pp. 78-86. London, UK: Unwin Brothers Ltd.
- Tesic, M. (1968). Vojnopomotska geografija DSNO (Naval Geography). Mornaricka uprava, Split, 391.
- Tesic, M. (1969). Morfomertrijia Jadranskog mora. In *Pomorske djelatnosti sa gledista medicinskih nauka*. Pomorska bibl. Mornan. Gl., Beograd, 22,177-192.
- Torres, G. J., Lombarte, A., & Morales-Nin, B. (2000). Sagittal otolith size and shape variability to identify geographical intraspecific differences in three species of the genus *Merluccius*. *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 80, 333-342.
- Tortonese E. (1975). Osteichtyes (Pesci Ossei), vol.II, Fauna d'Italia, Calderini, Bologna, 636.
- Troadec, H. (1992). *Reconnaissance de structures sur des pieces alcifies par imagerie numerique dans un but de suivi d'un stock halieutique* (Doctoral dissertation).
- Tuset, V. M., Lombarte, A., & Assis, C. A. (2008). Otolith atlas for the western Mediterranean, north and central eastern Atlantic. *Scientia Marina*, 72, 7-198.

- Uçkun, D., Taşkavak, E., & Toğulga, M. (2006). A Preliminary study on otolith-total length relationship of the Common Hake (*Merluccius merluccius* L., 1758) in İzmir Bay, Aegean Sea. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 9, 1720-1725.
- Ungaro, N., Rizzi, E., & Marano, G. (1993). Note sulla biologia e pesca di *Merluccius merluccius* (Linnaeus) nell'Adriatico pugliese. *Biologia Marina*, suppl., 1, 329-334.
- Volk, E. C., Wissmar, R. C., Simenstad, C. A., & Eggers, D. M. (1984). Relationship between otolith microstructure and the growth of juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*) under different prey rations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 41, 126-133.
- Volk, E. C., Schroder, S. L., Grimm, J. J., & Ackley, H. S. (1994). Use of a bar code symbology to produce multiple thermally induced otolith marks. *Transactions of the American Fisheries Society*, 123, 811-816.
- Vrgoč, N. (2000) Struktura i dinamika pridnenih zajednica riba Jadranskog mora (Structure and dynamics of demersal fish communities of the Adriatic Sea). Ph.D. Thesis. University of Zagreb, 198.
- Vrgoč, N., Arneri, E., Jukić-Peladić, S., Krstulović-Šifner, S., Mannini, P., Marčeta, B., Osmani, K., Piccinetti, C., & Ungaro, N. (2004). Review of current knowledge on shared demersal stocks of the Adriatic Sea. FAO-MiPAF Scientific Cooperation to Support Responsible Fisheries in the Adriatic Sea. GPC/RER/010/ITA/TD-12. *AdriaMed Technical Documents*, 12, 91.
- Vrgoč, N., Krstulović-Šifner, S., Dadić, V., & Jukić-Peladić, S. (2006). Demographic structure and distribution of John Dory, *Zeus faber* (L.), in the Adriatic Sea. *Journal of Applied Ichthyology*, 22, 205-208.
- Watabe, N., Tanaka, K., Yamada, J. & Dean, J. M. (1982). Scanning electron microscope observations of the organic matrix in the otolith of the Teleost fish *Fundulus heteroclitus* (L.) and *Tilapia nilotica* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 58, 127-134.
- Weichert, C. K. & Presch, W. (1981). *Elementos de anatomia de los cordados*. McGraw-Hill, México.
- Wenner, C. A., Roumillat, W. A., & Waltz, C. W. (1986). Contributions to the life history of black sea bass, *Centropristis striata*, off the southeastern United States. *Fishery Bulletin U.S.*, 84, 723-741.

- Williams, T. & Bedford, B. C. (1974). The use of otoliths for age determination. In *The ageing of fish* (Bagenal, T.B., ed.), pp. 114-123 London, UK: Unwin Brother's Limited.
- Wilson, C. A., Brothers, E. B., Casselman, J. M., Smith, C. L., & Wild, A. (1983). Glossary, pp. 207-208. In *Prince and L.M. Pulos* [ed.]. Proceedings of the international workshop on age determination of oceanic pelagic fishes: Tunas, Billifishes, and Sharks. *NOAA Technical Report NMFS*, 8.
- Wilson, C. A., Beckman, D. W., & Dean, J. M. (1987). Calcein as a fluorescent marker of otoliths of larval and juvenile fish. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116, 668-670.
- Withell, A. F., & Wankowski, J. W. (1988). Estimates of age and growth of ocean perch, *Helicolenus percoides* Richardson, in south-eastern Australian waters. *Marine and Freshwater Research*, 39, 441-457.
- Wright, P. J. (1993). Otolith microstructure of the lesser sandeel, *Ammodytes marinus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 73, 245-248.
- Zhang, Z., & Runham, N. W. (1992a). Effects of food ration and temperature level on the growth of *Oreochromis niloticus* (L.) and their otoliths. *Journal of fish biology*, 40, 341-349.
- Županović, Š. (1968). Study of hake (*Merluccius merluccius*) biology and population dynamics in the Central Adriatic. *General Fisheries Council for the Mediterranean*, 32, 24.
- Županović, Š., & Jardas, I. (1986). A contribution to the study of biology and population dynamics of the Adriatic hake, *Merluccius merluccius* (L). *Acta Adriatica*, 27, 97-146.
- Županović, Š., & Jardas, I. (1989). Fauna i flora Jadrana. *Jabucka Hotlina* (Flora and fauna of the Adriatic. Jakuba Pit). Logos Split. 526.

ALLEGATO

In allegato sono proposte una serie di immagini che sono state acquisite per permettere di eseguire le analisi utili per conseguire gli obiettivi prefissati.

Sono state selezionate varie tipologie di immagini acquisite con diversi strumenti e ingrandimenti. Inoltre, nelle varie immagini, si presentano patterns temporali diversi come: anelli annuali di otoliti provenienti da esemplari di nasello di età maggiori di un anno, e i patterns di crescita continua, dati dagli incrementi giornalieri, messi in evidenza nelle sezioni sagittali e frontali di otoliti provenienti dai giovanili di *Merluccius merluccius* per stima di età.

Immagine di otoliti interi



Figura 1 – Immagine acquisita con Scanner di un otolite appartenente ad un nasello di 420 mm di LT.

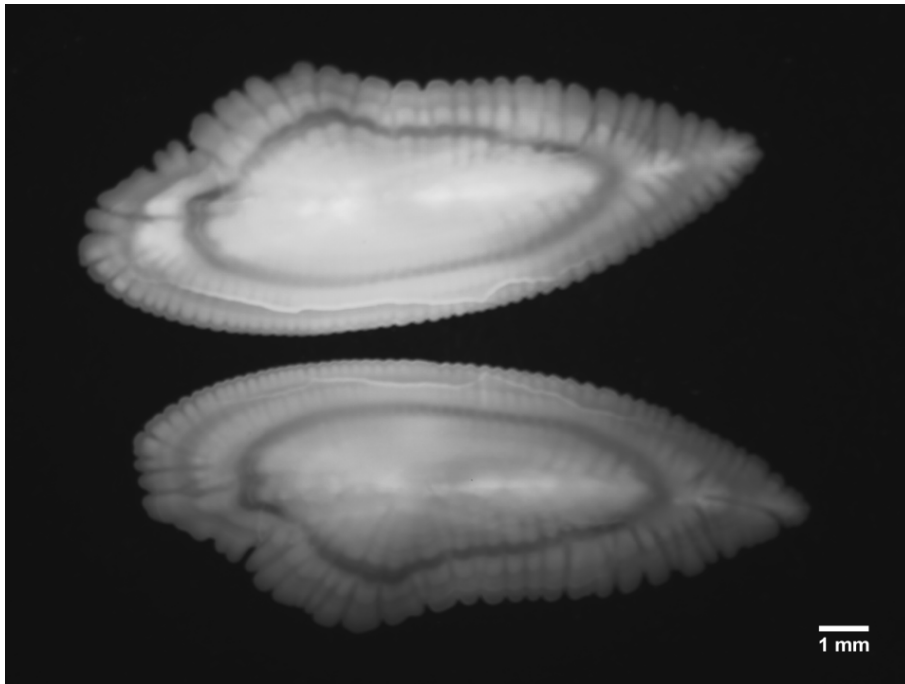


Figura 2 – Immagine acquisita con stereoscopio di un otolite appartenente ad un nasello di 280 mm LT. Ingrandimento 6x.

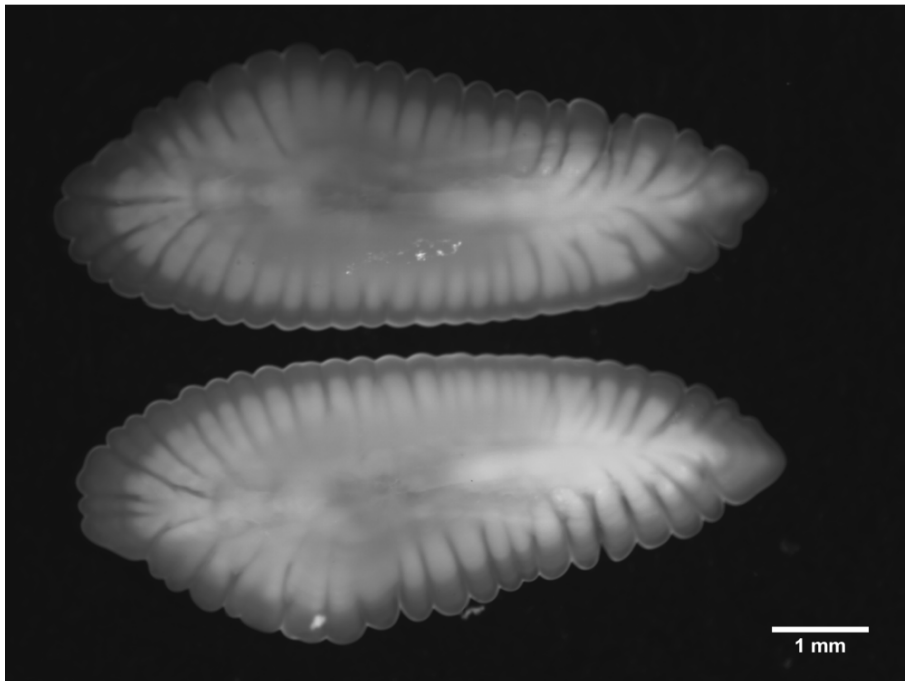


Figura 3 – Immagine acquisita con stereoscopio di un otolite appartenente ad un nasello di 145 mm LT. Ingrandimento 12x.

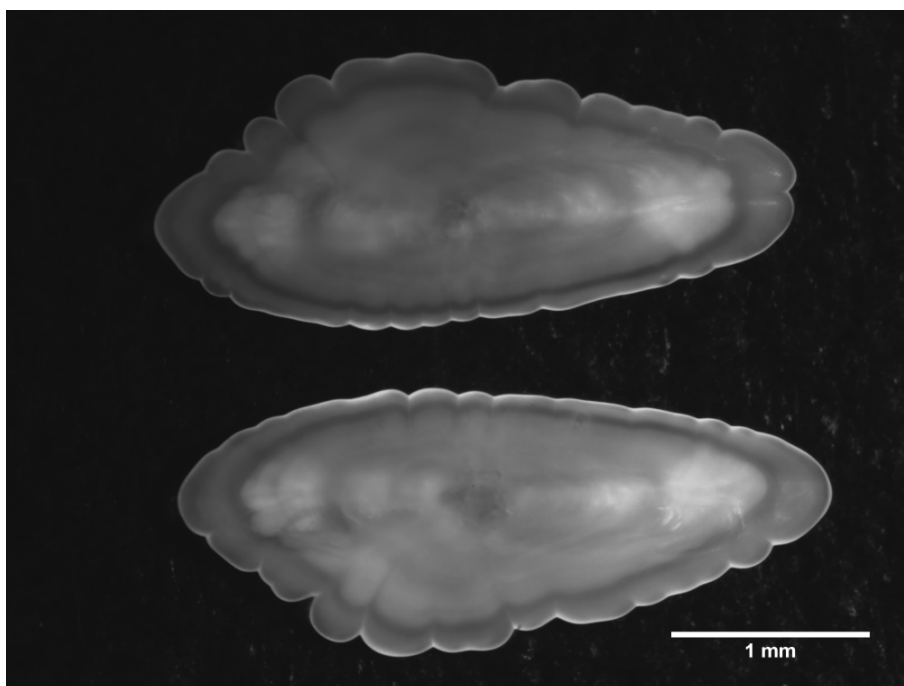


Figura 4 – Immagine acquisita con stereoscopio di un otolite appartenente ad un nasello di 75 mm LT. Ingrandimento 25x.

Immagini di sezioni di otoliti

Sezioni sagittali

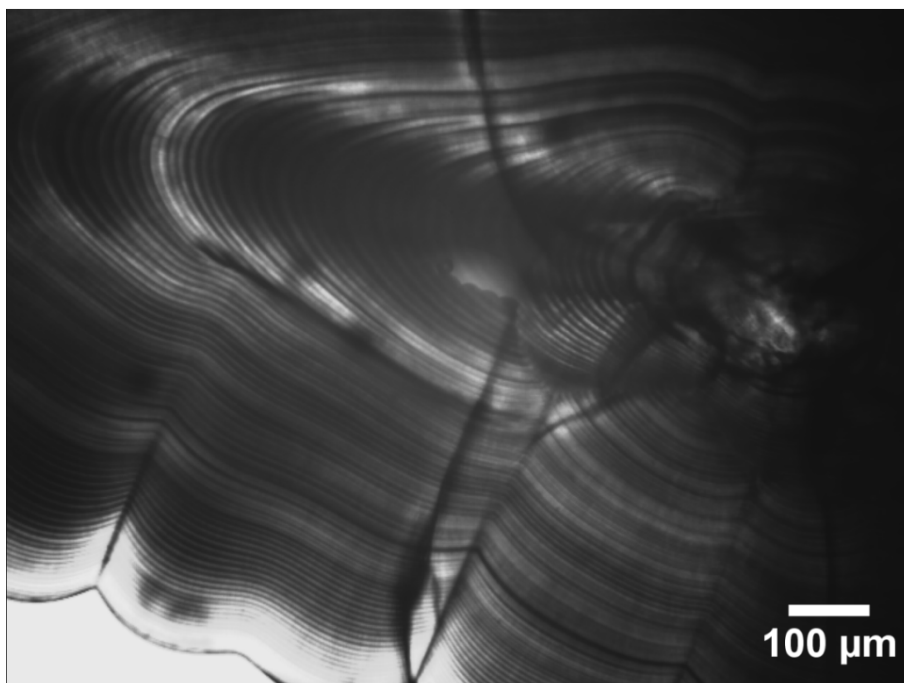


Figura 5 – Immagine acquisita con microscopio di un pattern di crescita continua di una sezione di otolite appartenente ad un nasello di 80 mm LT. Ingrandimento 10x.

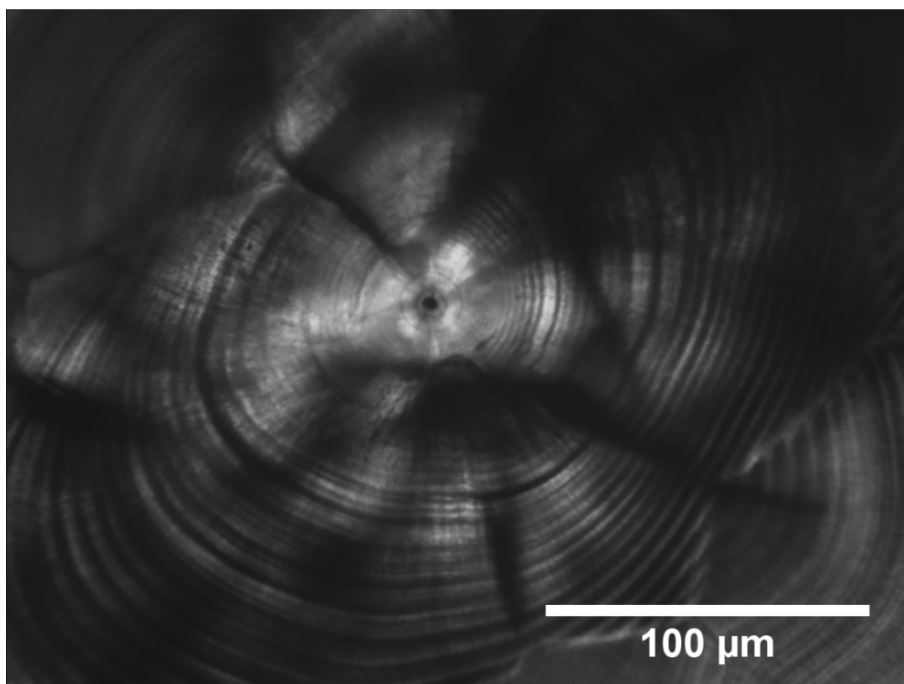


Figura 6 - Immagine acquisita con microscopio di un pattern di crescita continua del *core* di una sezione di otolite appartenente ad un nasello di 87 mm LT. Ingrandimento 25x.

Sezioni frontali

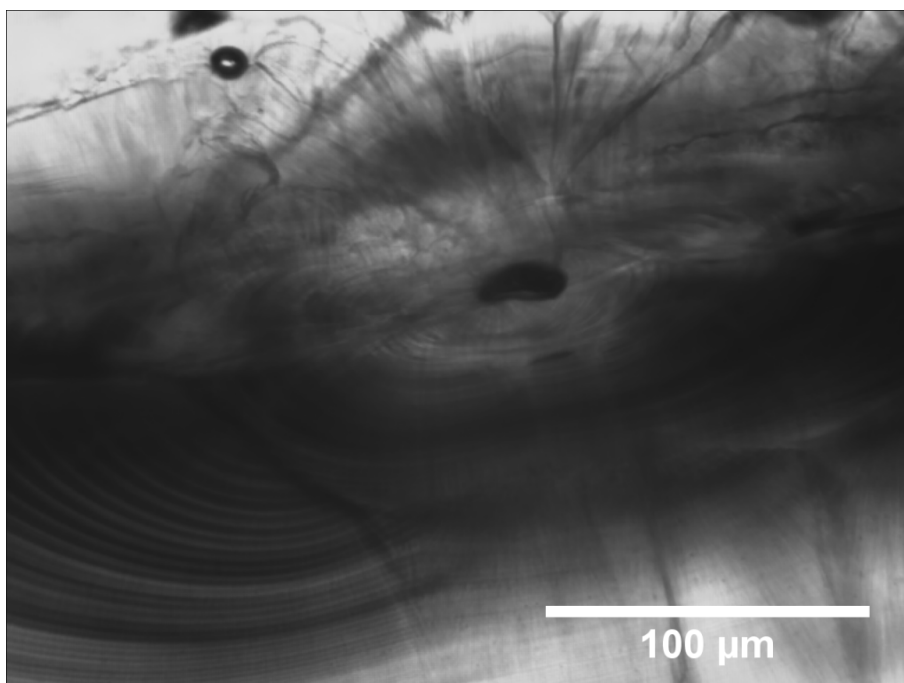


Figura 7 – Immagine acquisita con microscopio di un pattern di crescita continua del *core* di una sezione di otolite appartenente ad un nasello di 79 mm LT (Classe di taglia <100). Ingrandimento 25x.

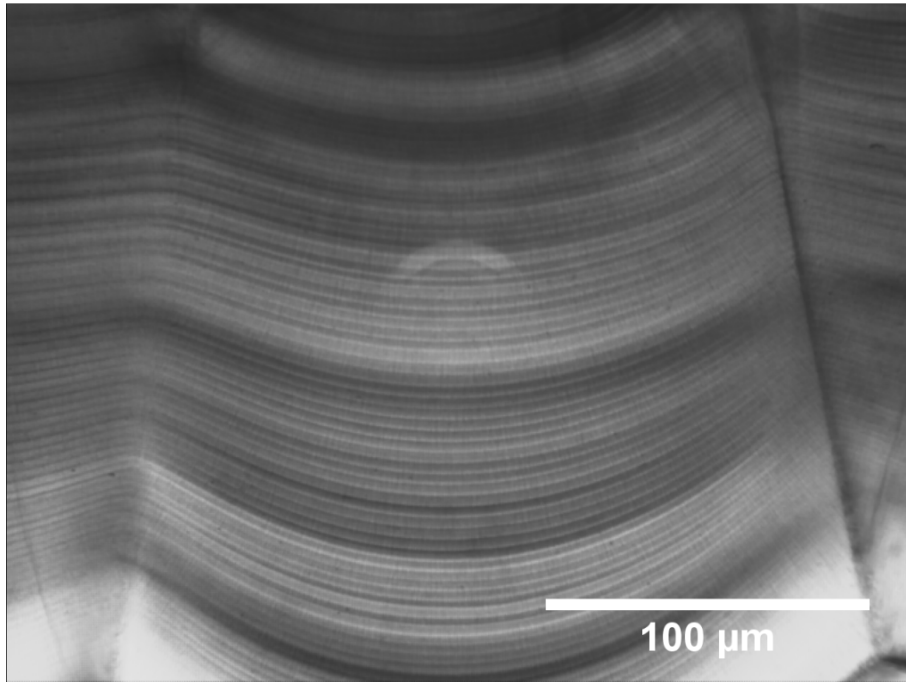


Figura 8 – Immagine acquisita con microscopio di un pattern di crescita continua di una sezione di otolite appartenente ad un nasello di 132 mm LT (Classe di taglia 100-139). Ingrandimento 25x.

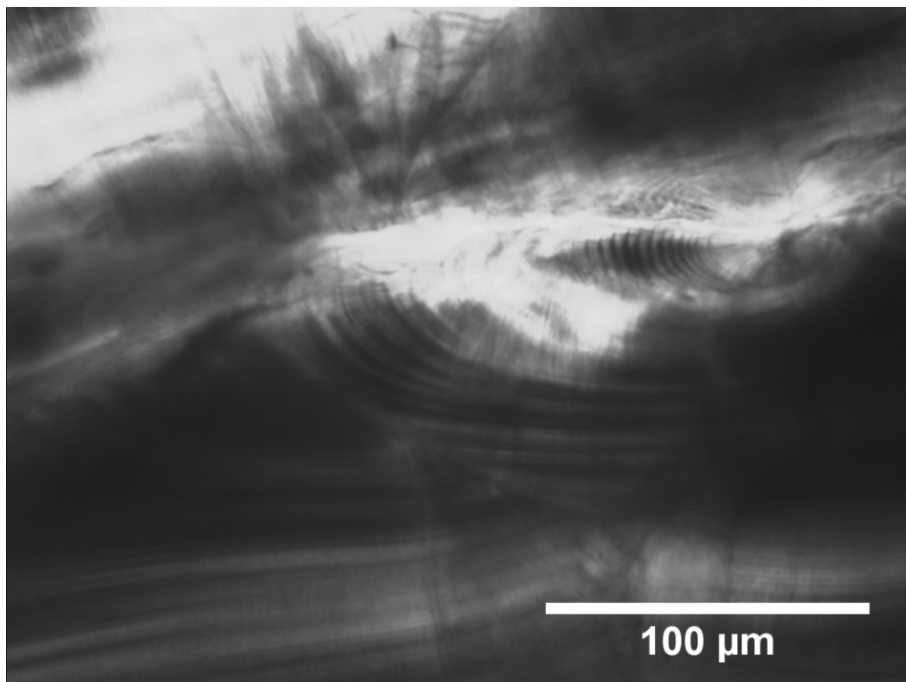


Figura 9 – Immagine acquisita con microscopio di un pattern di crescita continua del *core* di una sezione di otolite appartenente ad un nasello di 169 mm LT (Classe di taglia 140-180). Ingrandimento 25x.

RINGRAZIAMENTI

Dott. Marco Stagioni, in qualità di correlatore, per l'apporto essenziale durante tutto il periodo di tesi presso il Laboratorio di Biologia Marina e Pesca di Fano, per il fondamentale ed insostituibile contributo alla mia formazione professionale e non solo.

Al mio relatore Prof. Fausto Tinti, dimostratosi sempre molto professionale e disponibile per qualsiasi consiglio, chiarimento.

Alla mia famiglia, nonostante la lontananza, mi è stata affianco emotivamente in questo percorso durato ben due anni, e a mio padre che mi supportato economicamente alla realizzazione di questo traguardo.

Alla mia Lucy, che con il suo amore mi ha trascinato in lungo e in largo; è riuscita ad aprirmi mentalmente facendomi pensare e riflettere su tantissime cose a cui prima non badavo e ad avermi insegnato a rincorrere i miei sogni.

Ed infine a me stesso, che sono riuscito caparbiamente a raggiungere il mio obiettivo pronto a tuffarmi in una nuova esperienza, speriamo ricca di soddisfazioni.