

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE
Corso di laurea magistrale in
BIOLOGIA MARINA

**Analisi morfometrica classica ed EFA (Elliptic Fourier
Analysis) degli otoliti del genere *Mullus* in Alto - Medio
Adriatico**

Tesi di laurea in Biologia delle risorse alieutiche

Relatore

Dott. Marco Stagioni

Presentata da

Fabio D'Addelfio

II sessione

Anno Accademico 2014/2015

INTRODUZIONE	3
MEDITS	3
CAMPIONAMENTO	7
INTRODUZIONE AL GENERE <i>MULLUS</i> spp.	11
DISTRIBUZIONE E HABITAT	12
DATI BIOLOGICI.....	12
RIPRODUZIONE.....	13
ALIMENTAZIONE	14
PESCA	14
AREA DI STUDIO.....	15
DISTRIBUZIONE DELLA SPECIE NEL MAR ADRIATICO.....	18
OTOLITI	20
DESCRIZIONE GENERALE.....	21
COMPOSIZIONE	22
FUNZIONE	23
MORFOMETRIA CLASSICA ED EFA	24
MEDITS 2012	28
ESTRAZIONE E STOCCAGGIO DEGLI OTOLITI DI <i>MULLUS</i> spp.....	30
SCOPO DEL LAVORO	32
MATERIALI E METODI	32
CAMPIONI MEDITS 2012	32
LAVAGGIO DEGLI OTOLITI	34
ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI	35
IMAGEJ	37
SCELTA DEI CAMPIONI	39
ANALISI STATISTICA	40
ANALISI DELLA MORFOMETRIA CLASSICA.....	41
EFA	44
RISULTATI	46
MORFOMETRIA CLASSICA	47
<i>Mullus barbatus</i>	47
<i>Mullus surmuletus</i>	48
EFA	50
DISCUSSIONI	58
MORFOMETRIA CLASSICA	59
<i>Mullus barbatus</i>	59
<i>Mullus surmuletus</i>	60
EFA	60
<i>Mullus barbatus</i>	60
<i>Mullus surmuletus</i>	61
CONFRONTO TRA SPECIE	62
CONCLUSIONE	62
BIBLIOGRAFIA	63

INTRODUZIONE

Il presente lavoro è stato svolto presso il Laboratorio di Biologia Marina e Pesca di Fano (PU), ed è focalizzato sullo studio degli otoliti di due specie del genere *Mullus*: *M. barbatus* e *M. surmuletus*. Queste due specie sono conosciute con il nome comune di triglia, in particolare *M. barbatus* è noto come triglia di fango, mentre *M. surmuletus* come triglia di scoglio. I campioni di otoliti derivano tutti dalle campagne svolte dai ricercatori del Laboratorio di Biologia Marina e Pesca di Fano, in particolare dalla campagna MEDITS che si svolge ogni anno e che è indirizzata sulla valutazione delle risorse alieutiche dell'alto-medio Adriatico.

I campioni di *M. barbatus* provengono tutti dalla campagna MEDITS del 2012, mentre i campioni di *M. surmuletus*, provengono da più campagne, sia dalla MEDITS 2012 che dalla MEDITS 2014 e dalla GRUND 2002.

MEDITS

Numerose ricerche sulle risorse demersali sono state effettuate nel mare Adriatico dall'inizio del secolo scorso fino ad oggi. Molti studi sono stati eseguiti mediante la cooperazione scientifica degli istituti di ricerca marina che lavorano in Adriatico. La prima indagine biologica sulle risorse alieutiche che ha riguardato la più grande area dell'Adriatico è stata la spedizione "Hvar Expedition" (1948-1949), una spedizione di biologia della pesca finanziata dallo Stato della ex Jugoslavia e organizzata dall'Istituto di Oceanografia e Pesca di Spalato (Jukic-Peladic et al., 2001). Lo scopo di questo studio, eseguito con reti a strascico, è stato quello di determinare la caratteristica qualitativa e quantitativa delle comunità demersali di pesci, crostacei e cefalopodi. La ricerca è stata condotta nelle acque territoriali della ex Jugoslavia e l'Albania e nelle acque internazionali a circa 20 miglia nautiche al largo della costa italiana (Figura 1).

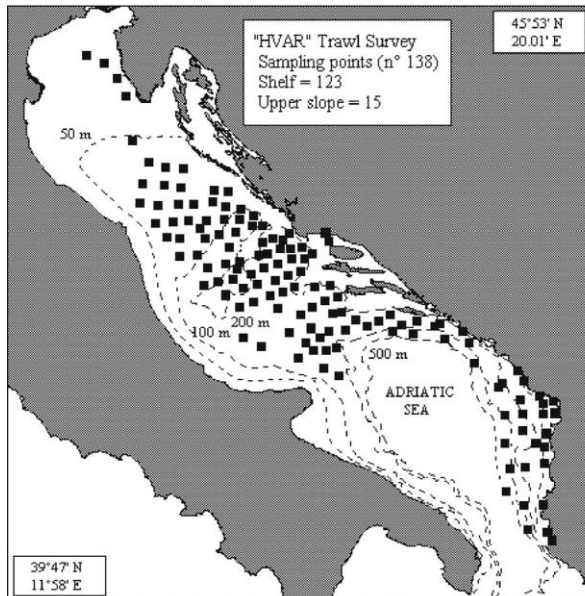


Figura 1: Area investigata e punti campionati durante la campagna "HVAR Expedition" (1948) (Jukic-Peladic et al., 2001).

Nel 1972 il Laboratorio di Biologia Marina e Pesca di Fano e l'Istituto di Oceanografia e Pesca di Spalato hanno cominciato a condurre delle ricerche in cooperazione per analizzare i popolamenti demersali in termini quantitativi e qualitativi.

Nel 1982 il Laboratorio di Biologia Marina e Pesca di Fano (Italia), in collaborazione con l'Istituto di oceanografia e pesca di Spalato (Croazia), ha iniziato la più vasta ricerca delle comunità demersali in Adriatico, conosciuta come spedizione "Pipeta", dal nome della nave da pesca utilizzata nelle indagini. Gli studi sono stati condotti principalmente due volte l'anno: in primavera e autunno. È stata campionata l'intera superficie del Nord e Centro Adriatico, (59000 km²) fino al Capo del Monte Gargano a sud e le acque territoriali croate ad est (Figura 2).

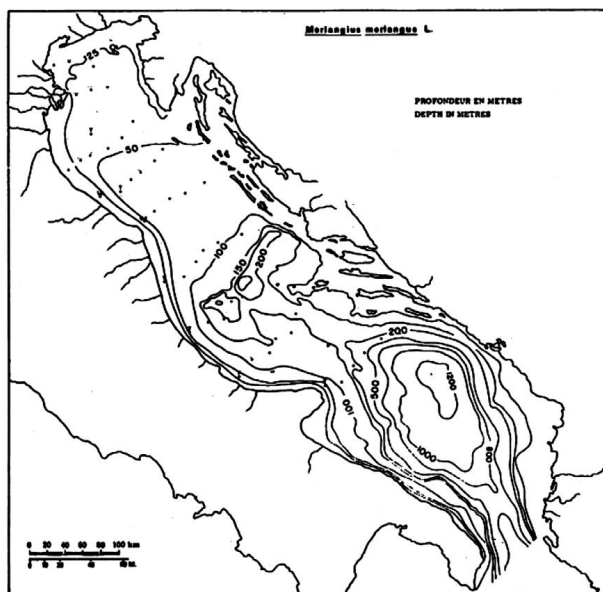


Figura 2: Mappa dell'area investigata nel Mare Adriatico durante la spedizione "PIPETA" (Piccinetti et a., 2012)

I campioni erano prelevati con una tipica rete a strascico commerciale, conosciuto come "tartana". Le stazioni sono state sistematicamente organizzate in nove profili e la durata della cala era per lo più di un'ora. Due cale in direzioni opposte erano state effettuate a ciascuna stazione, scelte in relazione alla distribuzione delle biocenosi e la profondità dell'acqua. Dall'inizio del programma, temperatura, salinità e ossigeno sono stati misurati con un'analisi della composizione delle catture in termini di quantità e qualità, prendendo i campioni delle specie economicamente più importanti. Lunghezza, sesso e stadio di maturità delle gonadi delle specie commercialmente più importanti sono stati determinati in seguito in laboratorio. Sono stati anche esaminati gli otoliti e le scaglie ed è stata anche studiata la dieta di alcune specie (Vrgoč et al., 2004).

La ricerca è stata portata avanti come programma GRUND (Gruppo Nazionale Valutazione Risorse Demersali), un programma nazionale italiano comune sostenuto dal MIPAF (Ministero Politiche Agricole e Forestali) e che ha istituito il monitoraggio delle comunità demersali sulla base di, una metodologia uniforme del campionamento e l'analisi dei dati, per tutti i mari italiani. Il programma GRUND si è concluso nel 2007 (Piccinetti et al., 2012).

A partire dal 2001, la ricerca sulle comunità demersali lungo la costa orientale dell'Adriatico è stata organizzata come parte del progetto regionale FAO AdriaMed. Il campionamento, la raccolta e l'elaborazione dei dati è stata la stessa come nel programma GRUND. Queste indagini venivano condotte una volta l'anno (nel periodo autunno-inverno) in 42 stazioni (Figura 3).

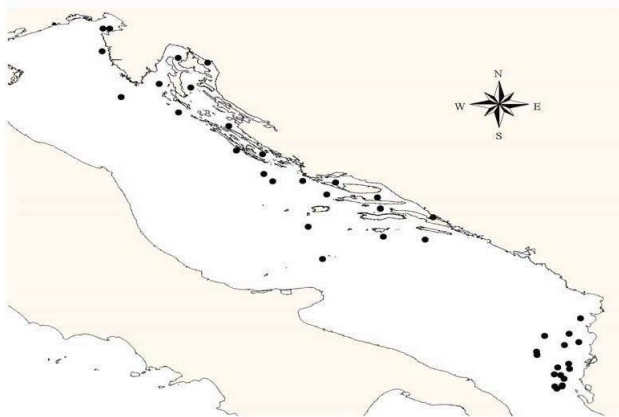


Figura 3: Area investigata durante le campagne FAO AdriaMed (2001-2002) (Vrgoč et al., 2004).

Le specie target erano le tredici specie di pesci demersali più importanti economicamente, crostacei e cefalopodi che si possono trovare nel Mare Adriatico: *Merluccius merluccius*, *Mullus barbatus*, *Pagellus erythrinus*, *Merlangius merlangus*, *Lophius budegassa*, *Lophius piscatorius*, *Solea vulgaris*, *Nephrops norvegicus*, *Parapenaeus longirostris*, *Eledone moschata*, *Eledone cirrhosa*, *Loligo vulgaris* e *Sepia officinalis* (Vrgoč et al., 2004).

Nel Mediterraneo la maggior parte delle risorse demersali sono considerate completamente o eccessivamente sfruttate. Per sostenere le norme che regolano queste attività di pesca, in particolare per l'applicazione della politica comune della pesca nel Mediterraneo, c'era bisogno di avere delle informazioni standardizzate sullo stato di tali risorse. È in un tale contesto che la Commissione Europea ha incitato alla realizzazione di un programma comune per la loro valutazione per mezzo di campagne con le reti a strascico (Bertrand et al., 1997).

Il programma “MEDiterranean International Trawl Survey” (MEDITS) è uno studio internazionale sulla pesca a strascico, finanziato dalla Comunità Europea e iniziato nel 1994, progettato per produrre informazioni di base sulle risorse demersali e bentoniche nel Mar Mediterraneo, in termini di distribuzione della popolazione e struttura demografica (Bertrand et al., 2002).

Così, dal suo inizio, il programma era gestito da quattro partners principali, rispettivamente in ciascuno dei quattro paesi europei del Mediterraneo, l'Istituto spagnolo di oceanografia (IEO, Spagna), l'Istituto francese di ricerca per lo sfruttamento del mare (IFREMER, Francia), la Società Italiana di Biologia Marina (SIBM, Italia) e il Centro Nazionale di ricerca marina (NCMR, Grecia). Questi partners sono stati scelti per la loro competenza e la loro capacità di mobilitare a livello nazionale, i mezzi tecnici e finanziari necessari per il programma (Bertrand et al., 1997).

Così, quando i partners hanno deciso di organizzare la campagna MEDITS, una delle principali sfide del progetto è stata l'adozione di protocolli comuni di campionamento standardizzati. I protocolli di base sono stati adottati dai primi quattro partners all'inizio del 1994, poco prima della prima campagna. Questi protocolli includevano il disegno di campionamento, lo strumento di campionamento (caratteristiche e modalità di utilizzo), le informazioni raccolte e la gestione dei dati per quanto riguarda la produzione di analisi standardizzate. Tutti i protocolli comuni sono stati raccolti e inseriti in un “Manuale dei protocolli” approvato dal comitato direttivo del programma e distribuito ai partecipanti (Bertrand et al., 2002).

Nel 1996 il programma è stato ampliato ad altri paesi mediterranei, come la Slovenia, la Croazia, Malta, Cipro, Marocco, Albania e, ultimamente, Montenegro. Allo stato attuale, 11 paesi sono coinvolti nel programma (Relini et al., 2008).

In accordo con GFCM Geographical SubAreas (GSA) il Mare Adriatico è diviso in due sub-aree: l'Adriatico Centrale e Settentrionale (GSA 17) e il Mare Adriatico Meridionale (GSA 18) (Figura 4).

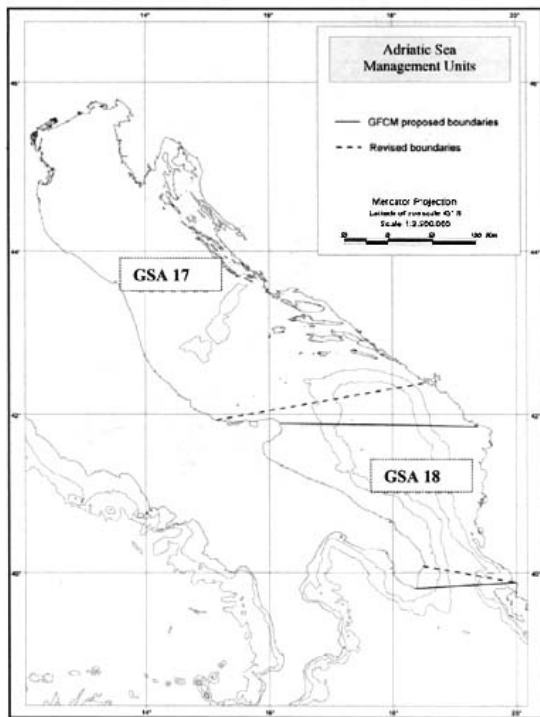


Figura 4: Mappa che mostra i confini delle GSA 17 e GSA 18 nel Mare Adriatico (AdriaMed, 2001)

L'area di studio interessata copre l'intera Geographical SubAreas 17 (GSA 17). Nel progetto sono coinvolti il Laboratorio di Biologia Marina e Pesca di Fano, l'Istituto di oceanografia e pesca di Spalato (Croazia) e l'Istituto di ricerca sulla pesca della Slovenia. La campagna è condotta ogni anno, applicando i protocolli comuni standardizzati di campionamento (Relini et al., 2008).

La MEDITS in Adriatico viene effettuata generalmente durante le stagioni primaverili-estive intorno a Giugno-Luglio con la motonave "Andrea". Nel 2012, la campagna, è stata condotta dal 16 Giugno al 01 Agosto, mentre nel 2014 è stata rimandata per problemi tecnici ed è stata fatta tra il 14 Agosto e il 23 Novembre.

CAMPIONAMENTO

La zona di studio è definita dall'insieme delle aree strascicabili al largo delle coste dei paesi partners da 10 - 800 metri di profondità (Figura 5).

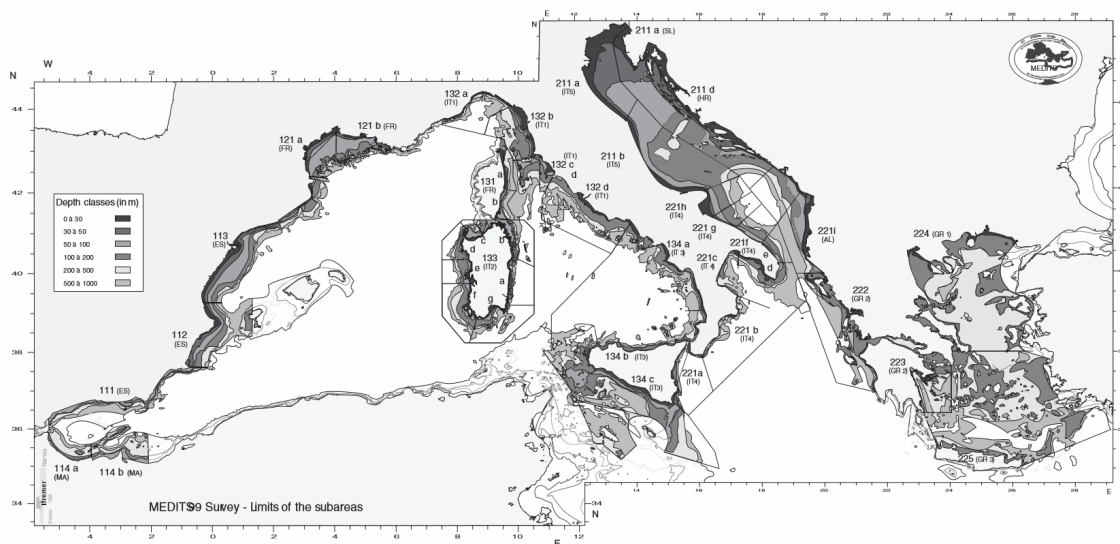


Figura 5: Area di studio della MEDITS trawl survey nel Mediterraneo. Limiti batimetrici dei campionamenti (Bertrand et al., 2002).

Questi limiti sono stati adottati per coprire al meglio le aree di distribuzione delle principali specie sfruttate o potenzialmente sfruttabili, considerando i vincoli amministrativi e tecnici del progetto. Le prime due campagne del 1994 e del 1995 sono state condotte solo lungo la costa della Spagna, della Francia, dell'Italia e della Grecia. Nel 1996 l'area è stata ampliata per coprire quasi tutto il mare Adriatico comprendendo le acque della Slovenia, Croazia e Albania. Il sud del Mare di Alborán è stato inserito nel programma della campagna dal 1999 con il contributo del Marocco e le acque intorno a Malta sono state campionate nel 2000. La frequenza di campionamento medio previsto era una stazione per 60 miglia nautiche quadrate in tutti i settori, tranne in Adriatico, dove è stato stabilito che ogni stazione doveva essere campionata ogni 200 miglia nautiche quadrate a causa della relativa uniformità della profondità. Le stesse posizioni sono state visitate ogni anno. Un totale di circa 1.000 cale sono state effettuate nel corso di ogni indagine annuale (Bertrand et al., 2002).

L'attrezzatura da pesca adottata costituisce un compromesso tra diversi vincoli. Per aumentare la cattura delle specie demersali, è stato progettato un attrezzo da pesca con un'apertura verticale leggermente superiore a quelli professionali più comuni usati nel Mediterraneo quando è iniziata la campagna MEDITS. Il design è stato redatto da tecnici della pesca provenienti da specifiche che sono state definite dai biologi.

Una speciale rete a strascico francese (riferimento IFREMER GOC 73) è stata utilizzata per il campionamento. Questa rete è stata costruita da Dremiere P.Y. dell'IFREMER, e le principali caratteristiche sono una dimensione più piccola della maglia del sacco (10 mm da nodo a nodo), è composta di 4 pannelli e ha una apertura verticale ed orizzontale maggiore della rete commerciale ordinaria utilizzati nella pesca a strascico nell'Adriatico (Figura 6) (Vrgoč et al., 2004).

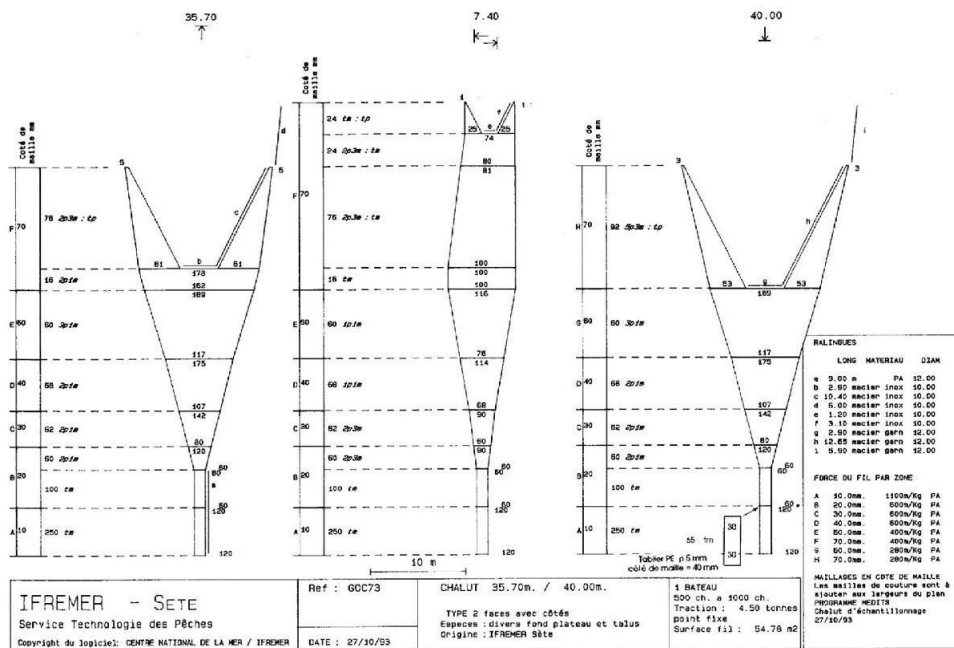


Figura 6: Rete a strascico utilizzata per le campagne MEDITS (GOC73) (MEDITS Handbook, 2013).

La rete è gestita da una nave con una potenza di traino di almeno 368 kW (500 CV).

Le più importanti caratteristiche dell'attrezzo da pesca sono state:

- Essere in grado di funzionare in tutti i settori e a tutte le profondità specificate dal programma (10-800 m);
- Avere una selettività più bassa possibile in modo da avere una buona stima delle popolazioni campionate.

In pratica l'ultimo requisito era il contrario di quello che viene normalmente chiesto ai pescatori, che è quello di usare buoni attrezzi selettivi in modo da consentire agli individui di piccole dimensioni di sfuggire. Questo obiettivo viene generalmente ottenuto imponendo a tutte le reti a strascico commerciali una dimensione minima per le maglie utilizzate. La normativa europea (Reg. CE 1967/2006) stabilisce che le dimensioni minime delle maglie delle reti a strascico, potranno essere: fino al 31/05/2010 maglie romboidali aventi apertura minima di 40 mm, dal 01/06/2010 maglie quadre con apertura di almeno 40 mm oppure maglie romboidali con apertura di almeno 50 mm. Per il campionamento durante la campagna MEDITS si è deciso di limitare la dimensione delle maglie a 10 mm di lato (da nodo a nodo), che corrisponde a circa 20 mm di apertura della maglia. Le reti sono fatte con un poliamide (nylon) di ottima qualità (MEDITS Handbook, 2013).

Il disegno generale dei cavi di traino, divergenti, calamanti e dell'armamento della rete è riportato in Figura 7.

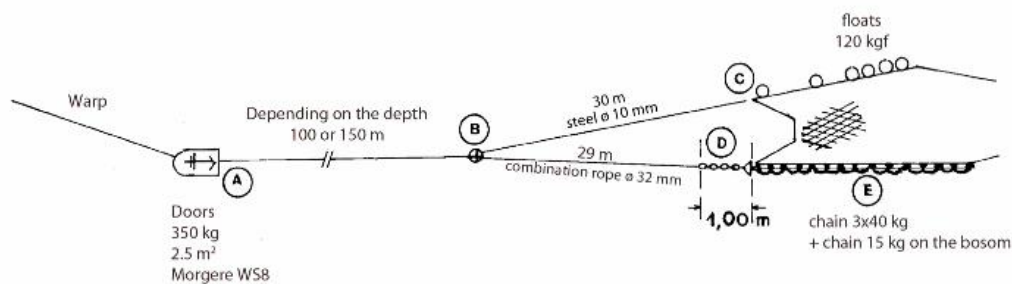


Figura 7: Particolare sui cavi di traino della rete (MEDITS Handbook, 2013).

Per mantenere la geometria della rete da traino più costante possibile, sono state definite due lunghezze dei calamenti in base alla profondità. Per profondità dai 10 ai 200 m la lunghezza del cavo è di 100 m, mentre per profondità dai 200 agli 800 m si utilizza un cavo di 150 m, anche se è raccomandato aumentare la lunghezza del cavo a 200 m quando si utilizza a profondità maggiori di 500 m (MEDITS Handbook, 2013), Il cavo filato è proporzionale alla profondità di pesca.

Le cale sono posizionate secondo uno schema di campionamento stratificato per profondità con estrazione casuale delle cale all'interno di ciascuno strato. Il numero di cale in ogni strato è proporzionale all'area di questi strati. Tranne che nel caso di problemi particolari (danni osservati negli anni precedenti, etc.), le cale sono realizzate nella stessa posizione di anno in anno. La decisione di effettuare una cala in un dato luogo non dovrebbe essere influenzata dalla presenza di banchi di pesci rilevati con l'ecoscandaglio. Le seguenti profondità sono fisse in tutte le aree e corrispondono ai limiti degli strati: 10 - 50 m, 51 - 100 m, 101 - 200 m, 201 - 500 m, 501 - 800 m. Le cale devono essere eseguite solo durante il giorno. Il periodo di luce è definita come il tempo tra 30 minuti dopo l'alba a 30 minuti prima del tramonto. La velocità di pesca standard è di 3 nodi. Questa velocità raccomandata è molto importante al fine di assicurare la migliore geometria della rete da traino, che può e deve essere verificata mediante "pinger e idrofoni" (tipo ScanMar). La velocità e la distanza percorsa deve essere monitorata e registrata. La durata della cala è fissata a 30 minuti a una profondità inferiore a -200 metri e a 60 minuti a profondità superiori a -200 m. Nel caso in cui nel corso delle operazioni di pesca la cala dovesse essere interrotta prima del completamento della durata standard, la cala può essere considerata valida se almeno 2/3 del tempo o della distanza sono stati raggiunti con successo. In generale, le cale devono essere eseguite a profondità costante e le variazioni di profondità durante la pescata non devono superare $\pm 5\%$ rispetto alla profondità iniziale (MEDITS Handbook, 2013).

Per ogni cala viene compilato un foglio di barca che contiene i dati sulla cala, i dati della barca, sulle reti e sul pescato. Quindi si registrano: numero della cala, data del giorno, ora

iniziale, finale e a metà della cala con relative coordinate, velocità del traino e profondità, durata totale della cala, informazioni su catene, calamenti, galleggianti, piombi e cavo filato e infine le tabelle per inserire i dati biologici sia delle specie bersaglio della campagna che delle specie non bersaglio e del benthos.

A bordo della barca le catture sono divise in categorie e sotto-categorie faunistiche come riportato nell'Allegato V e XV del MEDITS Handbook 2013. Per ogni specie viene registrato il peso totale e il numero di individui pescati. Se però la cattura di una data specie risulta essere troppo abbondante da poter essere misurata *in extenso* viene fatto un sub-campione rappresentativo della cattura di non più di 100 individui, come è stato fatto per *Mullus barbatus* per diverse cale (MEDITS Handbook, 2013).

Per ciascuna specie target vengono presi dei parametri biologici secondo il protocollo internazionale MEDITS.

INTRODUZIONE AL GENERE *MULLUS* spp.

Del genere *Mullus* fanno parte due specie di particolare interesse commerciale: *M. barbatus* chiamato anche triglia di fango e *M. surmuletus* conosciuto con il nome di triglia di scoglio. Il carattere principale delle specie appartenenti al genere *Mullus* è la presenza di due lunghi barbigli a funzione tattile e olfattiva che la triglia utilizza come organi sensoriali, per individuare le prede, e che in fase di riposo possono essere nascosti in un solco sotto la mandibola (Bombace and Lucchetti, 2011). Inoltre è stato riscontrato come i barbigli di *M. barbatus* siano più complessi rispetto a quelli di *M. surmuletus* e ciò è dovuto al fatto che c'è una maggiore difficoltà nel trovare le prede nei fondali fangosi a causa della scarsa visibilità (Lombarte and Aguirre, 1997).

Le due specie di triglia presentano un corpo allungato e mediamente compresso lateralmente, soprattutto nella metà posteriore. La testa è abbastanza grande rispetto al corpo e gli occhi, che sono posizionati in cima alla testa, hanno un diametro pari a circa metà del muso (Figura 8) (Bombace and Lucchetti, 2011).

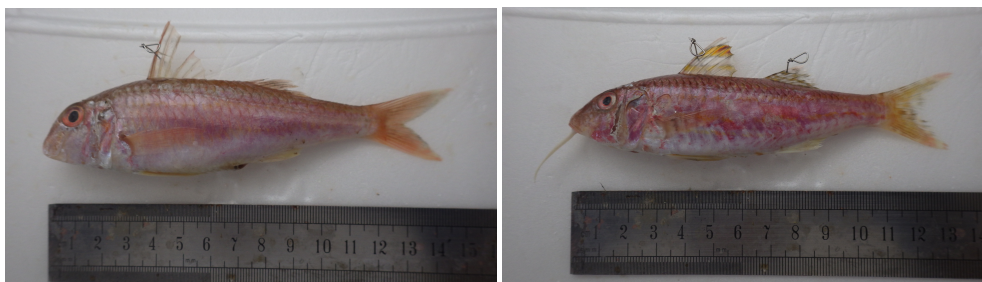


Figura 8: Esempio di *Mullus barbatus* (sinistra) e *Mullus surmuletus* (destra).

Il colore è uniformemente rosa con il dorso più scuro a macchie rossastre e la pancia più chiara. Le pinne sono senza alcuna colorazione ben definita (Jardas, 1996).

L'identificazione delle due specie del genere *Mullus* può essere difficile soprattutto per gli esemplari giovanili che non hanno ancora evidenziato i caratteri morfologici degli adulti. In generale *M. barbatus* presenta un muso corto con profilo anteriore quasi verticale, mentre *M. surmuletus* ha un muso più lungo e profilo più arrotondato. Differiscono anche nella colorazione che è più uniforme nella triglia di fango, mentre è più variopinta con bande gialle sia sui fianchi sia sulla pinna dorsale nella triglia di scoglio. Un'altra distinzione più netta è data dal tipo di fondali che frequentano e da come suggerisce il nome mentre la triglia di fango predilige fondali sabbioso-fangosi la triglia di scoglio la si può trovare sui fondali con substrati duri (Bombace and Lucchetti, 2011).

DISTRIBUZIONE E HABITAT

Mullus barbatus è una specie bentonica, gregaria, che vive comunemente a profondità comprese tra i 10 e i 500 m su fondali sabbioso-fangosi. *Mullus surmuletus*, invece, vive fino a massimo 400 m di profondità, anche se più comunemente si trova entro gli 80 m e prevalentemente su fondali rocciosi (Bombace and Lucchetti, 2011).

La triglia di fango è distribuita nell'est Atlantico, dal Mare del Nord e Inghilterra al Senegal e nel Mediterraneo. È uniformemente distribuito in tutte le parti dell'Adriatico (Jardas, 1996). Preferisce le acque più basse dell'Adriatico settentrionale e centrale, mentre solo pochi esemplari possono essere catturati in acque più profonde (Jukić and Piccinetti, 1981). Questa specie compie migrazioni stagionali: in primavera, la triglia di fango si trova per la maggior parte nella costa est su fondi molli, mentre in autunno è possibile trovarla distribuita in tutto il Mare Adriatico (Arneri and Jukić, 1986). Alcuni autori come Haidar (1970) riportano che nell'Adriatico centrale e settentrionale ci sono due tipi di migrazioni in questa specie: la migrazione dei giovanili dalla costa verso il mare aperto e la migrazione primaverile degli adulti riproduttori verso le regioni della costa Croata a profondità tra i 50 e gli 85 metri. Per quanto riguarda il tipo di sedimento la triglia preferisce fondali fangosi e sabbiosi, ad esempio, che sono le regioni con la più alta disponibilità di cibo (Jukić and Piccinetti, 1981).

DATI BIOLOGICI

La triglia di fango può crescere fino a 30 cm di lunghezza che corrispondono all'incirca a 0,5 kg. Abitualmente la lunghezza degli esemplari catturati si aggira tra i 10 e i 20 cm ed in media le femmine hanno un corpo più grande dei maschi (Jardas, 1996). Inoltre crescono abbastanza velocemente, cosa che può essere notata nel primo anno di età della loro vita (Haidar, 1970). Quindi quasi tutti i più grandi esemplari sono femmine mentre i maschi non crescono molto sopra i 20 cm (Relini et al., 1999).

La triglia di scoglio raggiunge dimensioni superiori fino a un massimo di 45 cm, anche se raramente supera i 25 – 30 cm (Bombace and Lucchetti, 2011).

Le triglie raggiungono la maturità sessuale nel loro primo anno di vita, le femmine a circa 12 – 13 cm di lunghezza, mentre i maschi fra gli 11,5 e 12 cm (Vrgoč et al., 2004).

RIPRODUZIONE

La triglia di fango depone le uova nel Mare Adriatico in tarda primavera inizio estate (Maggio, Giugno, Luglio) e raggiunge la maturità sessuale nel primo anno di età con una lunghezza che si aggira tra i 10 e i 14 cm. I maschi hanno due tipi di cicli sessuali: gli esemplari più piccoli di 14 cm hanno un ciclo sessuale annuale, con la fase di deposizione da Maggio a Luglio, mentre gli esemplari più grandi hanno un ciclo biennale con la fase riproduttiva da Maggio a Dicembre. Le femmine hanno sempre un ciclo di riproduzione annuale e depongono le uova da Aprile a Maggio. A circa 60 – 70 m di profondità avviene la deposizione maggiore di uova, cui segue nella fase post larvale la migrazione verso acque meno profonde (30 – 40 m) e verso la costa. La sex ratio è estremamente variabile, a seconda delle diverse zone studiate, nel Mediterraneo orientale, compreso il Mar Adriatico, le femmine predominano mentre una situazione inversa si osserva nel Mediterraneo occidentale (Vrgoč et al., 2004). Larve, post larve e giovanili fino a 4 cm di lunghezza totale sono pelagici, e hanno una colorazione azzurra, tipica di specie pelagiche. Nella fase successiva gli individui si spostano verso le aree costiere sabbiose, dove trovano condizioni ambientali idonee come la temperatura ideale e la disponibilità di cibo, per accrescersi in fretta, e assumono anche abitudini demersali, quindi legati al fondale. Il passaggio dalla vita pelagica alla vita bentonica è chiamato “settlement”. Cambiano anche la livrea che passa dall'azzurro al verde e al rossiccio fino alla colorazione definitiva. Nel periodo tardo estivo le triglie migrano dalla costa verso il largo sempre su fondali fangosi per unirsi allo stock degli adulti (Bombace and Lucchetti, 2011).

ALIMENTAZIONE

Le due specie del genere *Mullus* sono carnivore bentoniche e si nutrono principalmente di Policheti e Crostacei, ma anche in misura minore di Molluschi, Echinodermi, Nematodi e Alghe. Le analisi fatte sui contenuti stomacali di entrambe le specie hanno mostrato abitudini alimentari molto simili, e soprattutto legate da fattori come la stagionalità e la taglia (Chérif et al., 2011; Labropoulou et al., 1997). In Adriatico, i principali predatori di giovanili e adulti di triglia sono la rana pescatrice *Lophius piscatorius*, la razza chiodata *Raja clavata*, la pastinaca *Trygon pastinaca*, il pesce San Pietro *Zeus faber*, e il nasello *Merluccius merluccius* (Haidar, 1970).

PESCA

Entrambe le specie di triglia hanno un elevato valore commerciale e sono le principali specie target della pesca demersale nel Mar Mediterraneo. È ampiamente riconosciuto che il loro stock è sottoposto a un'elevata pressione di pesca, e che, in molti casi, è diretta verso i giovanili (Tserpes et al., 2002).

Lungo le coste italiane le triglie vengono pescate tramite reti a strascico e in misura minore con reti da posta. La triglia viene pescata per tutto l'arco dell'anno, con un picco molto accentuato a fine estate – inizio autunno, che è il periodo dell'anno durante il quale le giovani triglie compiono la migrazione costa-largo per unirsi alla popolazione degli adulti (reclutamento). L'attività di pesca da parte dei pescherecci a strascico si concentra quindi sulle giovani triglie che migrano verso il largo e che quindi si rendono facilmente disponibili alla pesca a strascico (Bombace & Lucchetti, 2011). Nei periodi estivi e autunnali, esemplari giovani sono dominanti nella popolazione. In alcune aree costiere dell'ovest del Mar Adriatico, questa frazione è pari al 60-90%, con tassi di cattura fino a 100 kg/h (Vrgoč et al., 2004).

Il rendimento della pesca di *Mullus barbatus* in Italia era di 20.114 t nel 1982, delle quali 13.886 erano catture avvenute nel Canale di Sicilia, mentre i dati ufficiali più recenti hanno indicato un calo delle catture nazionali a 10.708 t, delle quali solo 1.126 provengono dal Canale di Sicilia (Sonin et al., 2007).

In Mediterraneo la taglia minima di cattura per le specie del genere *Mullus* è fissata a 11 cm in base al Regolamento CE 1967/2006, che stabilisce anche che la taglia di un pesce è misurata dall'estremità anteriore del muso sino all'estremità della pinna caudale.

AREA DI STUDIO

Il mare Adriatico è un bacino semi-chiuso allungato del Mediterraneo centrale, e per alcune sue caratteristiche come la sua profonda penetrazione nel continente e per la bassa profondità, può essere descritto come un mare continentale. Si estende a circa 800 km da NW a SE tra 40° e 46° N di latitudine e tra 12° e 20° E di longitudine. La sua larghezza varia da 90 a 220 km ed è collegato al resto del Mediterraneo dal Canale d'Otranto che, essendo di circa 40 miglia nautiche di larghezza e 780 metri di profondità, svolge un ruolo molto importante nella circolazione e lo scambio di masse d'acqua tra l'Adriatico e lo Ionio. Caratteristiche geo-morfologiche del bacino adriatico, cambiamenti geopolitici lungo la costa orientale, divisioni nazionali di statistica e distribuzione delle risorse della pesca esistenti hanno portato all'individuazione di due sub-aree geografiche (GSA): GSA 17 (Nord e Centro Adriatico), delimitata da Italia, Croazia, Slovenia e Bosnia-Erzegovina e GSA 18 (Sud Adriatico) che confina con il Montenegro, l'Albania e l'Italia (Puglia) (Piccinetti et al., 2012). L'area di studio copre l'intero GSA 17 - settentrionale e centrale dell'Adriatico, per un totale di area investigata pari a 91127 km².

La zona orientale della GSA 17 mostra, caratteristiche di tipo ecologico, morfologico e oceanografico diverse da quella occidentale. La morfologia della zona orientale costiera è alta, rocciosa ed è articolata con le piccole e grandi isole, canali e baie riparate. Le coste italiane sono generalmente piatte e alluvionali, fatta eccezione per il Gargano. Lagune estese si trovano nella parte nord e nella zona del Delta del Po. L'Adriatico Nord-Occidentale è caratterizzato da un grande afflusso di acqua dolce che abbassa la salinità e porta ad elevata produzione primaria e ad alta produttività biologica di questa zona (Piccinetti *et al.*, 2012).

BATIMETRIA

L'Adriatico è un mare poco profondo, con una profondità media stimata in 252 metri. La profondità aumenta gradualmente da nord a sud, e la maggior parte del fondo non supera i 200 m di profondità (Figura 9). La parte settentrionale e centrale dell'Adriatico è caratterizzata da un'estesa piattaforma continentale; la parte settentrionale ha acque poco profonde mentre nella parte centrale del bacino si raggiunge la profondità massima nella fossa di Jabuka (273 m). Nella parte meridionale della GSA 17 il Mare Adriatico è più profondo di 200 metri (Piccinetti et al., 2012).

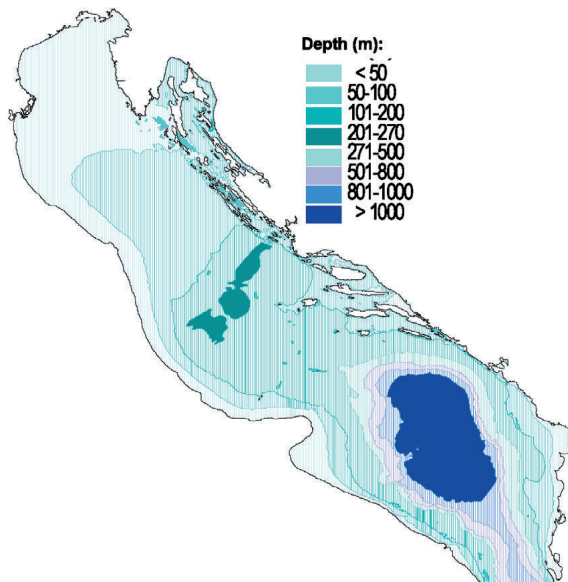


Figura 9: Batimetria del Mare Adriatico (Piccinetti et al., 2012)

TEMPERATURA

Le acque superficiali subiscono un chiaro ciclo stagionale della temperatura con valori massimi di temperatura superficiale durante l'estate, mentre durante l'inverno, abbiamo il massimo rimescolamento dello strato profondo delle acque (Figura 10).

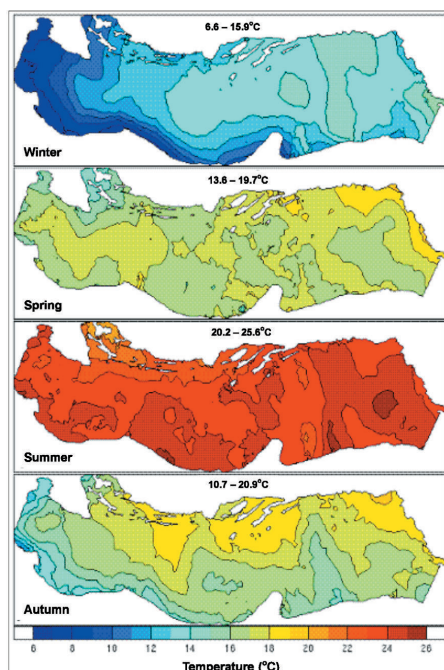


Figura 10: Temperature stagionali nel Mare Adriatico (Piccinetti et al., 2012)

Le escursioni termiche stagionali superano i 10 °C, chiaramente dovuto al flusso di calore scambiato con l'atmosfera. In estate, la temperatura superficiale è piuttosto uniforme su tutto il Mar Adriatico. La temperatura superficiale delle acque di mare aperto è di circa 22-25 ° C,

scendendo a 11,5 °C in prossimità del fondo. In Adriatico è ben sviluppato un termocline presente in primavera e in estate fino a 30 m di profondità, mentre nel Medio Adriatico arriva a una profondità di 50 m (Piccinetti et al., 2012).

RISORSE DEMERSALI

L'Adriatico riceve considerevoli sostanze nutritive di arricchimento dal deflusso fluviale che porta ad elevata produzione primaria e quindi all'eutrofizzazione. Questo fenomeno riguarda principalmente la costa del Nord e del Centro Adriatico che influenza così a cascata tutta la rete trofica e consente un'elevata produzione di pesce. È un dato di fatto che, il Mare Adriatico, rappresenta una delle aree più produttive mediterranee ai fini della pesca (Piccinetti et al., 2012).

In estate, quando le condizioni meteo-marine sono adatte (per esempio l'alta temperatura, un esteso periodo di mare calmo, l'afflusso di acqua dolce, ecc) la stratificazione, che separa le acque superficiali più calde e con una bassa salinità dalle acque più profonde, più salate e più fredde, può verificarsi che si vengono a creare le condizioni ideali per le fioriture algali eccezionali, e un'estesa ipossia e anossia. I danni alle risorse demersali, nonché alle risorse sedentarie e bentoniche possono essere considerevoli (Piccinetti et al., 2012).

C'è una grande variabilità nella distribuzione delle specie, la maggior parte delle quali è generalmente distribuita in piccole aree, nonostante intraprendano migrazioni stagionali. Molte specie completano il loro ciclo biologico attraversando tutto il bacino, con l'area di riproduzione localizzata lungo le coste italiane o croate. Le reclute di molte specie si aggregano lungo la costa Ovest in estate e quando crescono, dopo due o tre mesi, migrano verso il mare aperto a causa delle condizioni meno estreme in quest'area durante l'autunno e l'inizio dell'inverno. D'altra parte, ci sono diversi cambiamenti documentati nella struttura delle comunità demersali in Adriatico durante gli ultimi decenni. C'è stata una diminuzione della biomassa con il tempo, principalmente osservata nelle specie demersali commerciali, a seguito del crescente impatto della pesca fino al 2002. Inoltre, dal confronto di due survey condotti nel 1948 e nel 1998, è stata osservata una diminuzione di elasmobranchi. Alcuni pesci ossei hanno sostituito gli elasmobranchi in cima alle catture (per lo più specie di piccole dimensioni come le triglie). D'altra parte, l'abbondanza delle risorse, la distribuzione dei popolamenti delle specie e le fluttuazioni osservate nella biomassa ai livelli trofici più bassi e intermedi, come il pesce pelagico, invertebrati e pesci demersali di piccole e medie dimensioni, potrebbero risentire nel tempo dei cambiamenti dei parametri ambientali e

anomalie climatiche, nonché degli effetti diretti e indiretti della pesca (Piccinetti et al., 2012).

DISTRIBUZIONE DELLA SPECIE NEL MAR ADRIATICO

Mullus barbatus è una specie migratoria, ampiamente distribuita su tutto l'Adriatico. La densità della popolazione (espresso in termini di abbondanza e biomassa) durante la campagna MEDITS (primavera e il periodo di inizio estate) è la più alta lungo la costa orientale adriatica (Figura 11).

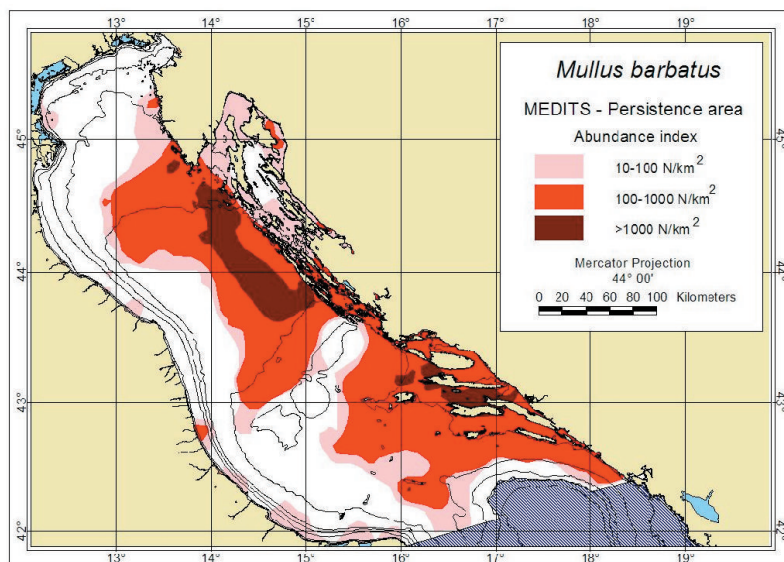
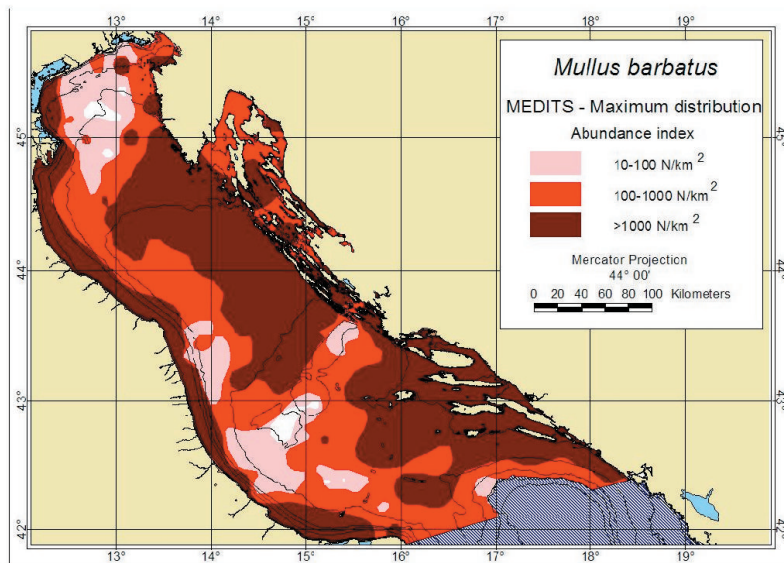


Figura 11: Area di massima distribuzione spaziale (sopra) e area di persistenza (sotto) di *M. barbatus* (Piccinetti et al., 2012)

I giovani sono distribuiti lungo le acque costiere poco profonde occidentali (Figura 12).

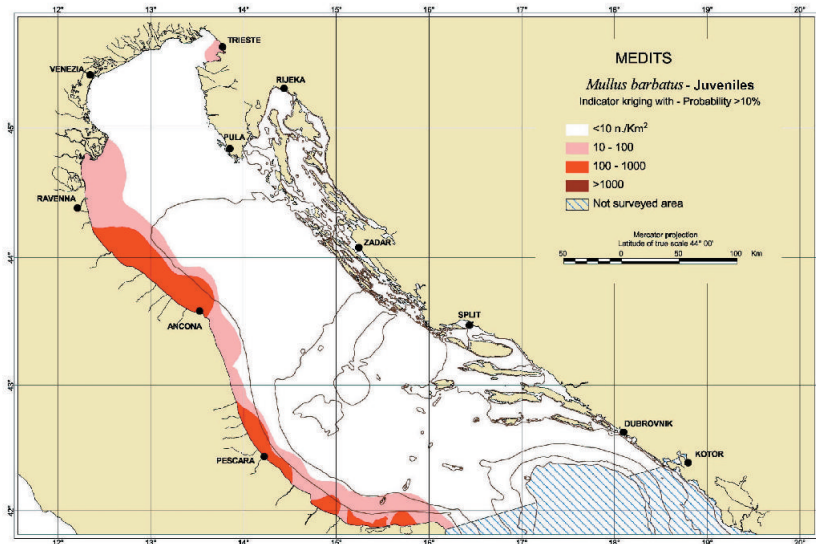


Figura 12: Area di distribuzione dei giovanili di *M. barbatus* (Piccinetti et al., 2012)

L'indice medio di biomassa è 22,2 kg per chilometro quadrato, e l'indice di abbondanza è di 682 esemplari per chilometro quadrato. I riproduttori dominano nella popolazione, e la frazione di reclute è piccola, con grande differenza di anno in anno.

Mullus surmuletus è distribuito principalmente nella zona costiera poco profonda lungo costa orientale e occidentale sul fondo roccioso (Figura 13).

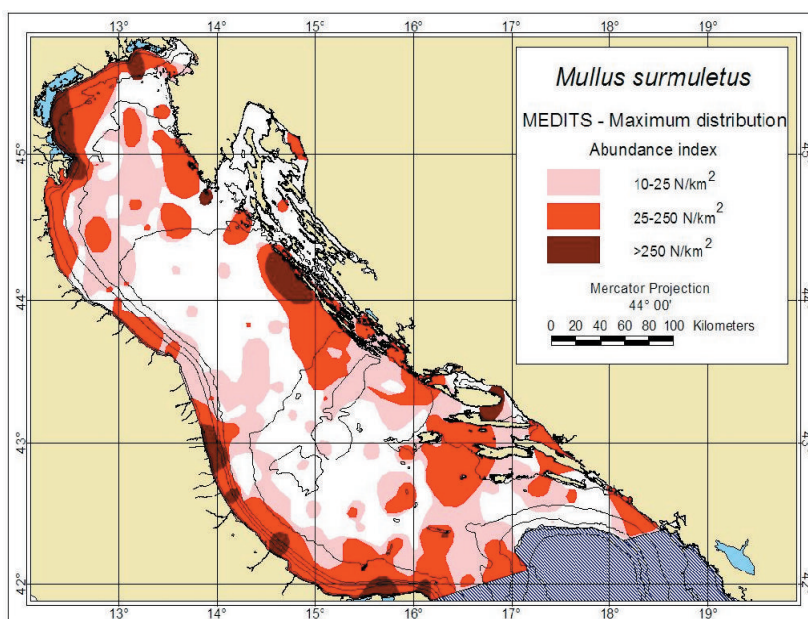


Figura 13: Area di distribuzione massima di *M. surmuletus* (Piccinetti et al., 2012)

Gli indici di abbondanza e biomassa della triglia di scoglio sono generalmente mantenuti su valori bassi senza particolari tendenze. La media del valore dell'indice abbondanza è di 14 esemplari per chilometro quadrato e biomassa di 0,4 kg per chilometro quadrato. Grazie al fatto che il campionamento è fatto prima del periodo di reclutamento e nella zona in cui le

reclute non sono distribuite, la maggior parte della popolazione è formata da spawners (Piccinetti *et al.*, 2012).

OTOLITI

L'orecchio interno, che si trova nella mascella di tutti i Vertebrati, funziona sia come sistema vestibolare che rileva le accelerazioni lineari ed angolari, consentendo agli organismi di mantenere l'equilibrio, che come sistema che rileva le onde sonore (Popper and Fay, 1993). Nei pesci l'orecchio interno è una doppia struttura incorporata nel cranio su entrambi i lati della testa vicino al mesencefalo. Ogni orecchio ha una complicata struttura di canali, sacche e condotti riempito con endolinfa, un fluido con proprietà viscosi (Figura 14).

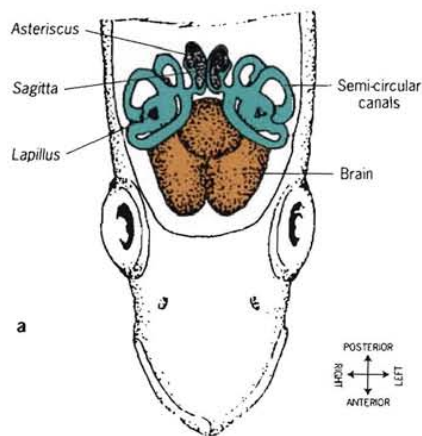


Figura 14: Vista dorsale dell'apparato vestibolare in una tipica specie di Teleosteo (Panfili et al., 2002)

L'anatomia di questi canali e la struttura degli organi meccanorecettori labirintici sono note in molte specie ittiche. I Teleostei hanno tre canali semicircolari disposti ortogonalmente tra loro, che rilevano le accelerazioni angolari. I canali si aprono in una serie di camere comunicanti o sacche otiche contenenti un tessuto sensoriale, la *macula*, che rileva sia le accelerazioni lineari sia i suoni (Panfili et al., 2002).

Negli Osteitti ci sono tre sacche otiche, ciascuna contenente una struttura calcarea, un otolite, che agisce come un meccanorecettore stimolando le kinocilia (cellule pilifere) della *macula*. Le tre sacche otiche sono il *sacculus*, *utricle* e *lagena*, che contengono rispettivamente gli otoliti *sagitta*, *lapillus* e *asteriscus* (Figura 15).

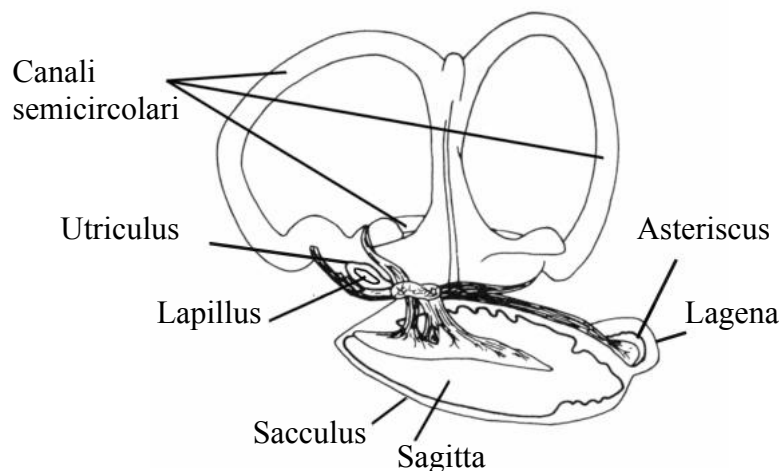


Figura 15: Vista mediale dell'orecchio interno (VanderKooy, 2009).

Ogni otolite è fissato sopra la *macula* da una membrana otolitica, all'interno della quale sporgono delle cilia sensoriali. La membrana otolitica consiste di due zone: una zona gelatinosa strutturata che copre la regione sensoriale della *macula*, che solitamente ha una forma reticolata, ed un'altra zona sub-cupolare, che consiste in una serie di fibre che formano un'ampia rete che copre la regione sensoriale e non sensoriale della *macula*. La zona gelatinosa si estende dalla superficie dell'otolite alle cime dei peli sensoriali e la sua principale funzione probabilmente è quella di meccanorecettore. Il lumen dell'intero sistema è riempito di endolinfa (Panfili et al., 2002).

DESCRIZIONE GENERALE

Gli otoliti dei tre sacchi otici differiscono in taglia e forma. Le differenze nella forma degli otoliti tendono a riflettere la filogenesi e lo sviluppo, sebbene ci sia una considerevole variazione inter- e intra-specifica. Le differenze inter-specifiche nella forma sembrano essere date sia da influenze genetiche sia ambientali (Lombarte and Leonart, 1993).

A causa di alcune delle loro caratteristiche (dimensioni, specificità morfologica, accessibilità, composizione chimica, microstruttura, stadio ontogenetico in cui sono formati e modalità di crescita) e la dipendenza di queste proprietà sulla variazione dei fattori ambientali, gli otoliti sono una delle più utili strutture anatomiche del pesce per vari studi, che portano ad un gran numero di applicazioni pratiche. Tali applicazioni non si limitano a ittiologia, ma sono ampiamente estesi allo studio sull'ecologia dell'alimentazione dei pesci predatori, e ad alcuni aspetti della paleontologia, stratigrafia, archeologia e zoogeografia (Tuset et al., 2008).

La morfometria degli otoliti viene anche usata nell'identificazione delle specie e per studi sulla variazione geografica nelle popolazioni e degli stock dei pesci (Campana and Casselman, 1993).

Nella maggior parte dei pesci la *sagitta* è il più grande otolite ed è spesso usato per la stima dell'età. La maggior parte degli studi che riguardano la formazione degli otoliti si focalizzano sulla *sagitta* e il *sacculus*. In letteratura, il termine "otolite" è spesso usato per descrivere uno qualsiasi delle tre paia di otoliti, generalmente la *sagitta*, ma è importante definirlo in ogni studio.

Gli otoliti sono generalmente compressi lateralmente e simmetrici tra destro e sinistro, eccetto che per i pesci piatti. Un otolite ha tre piani di orientamento, che seguono quelli dei pesci; sagittale, frontale e trasversale (Figura 16).

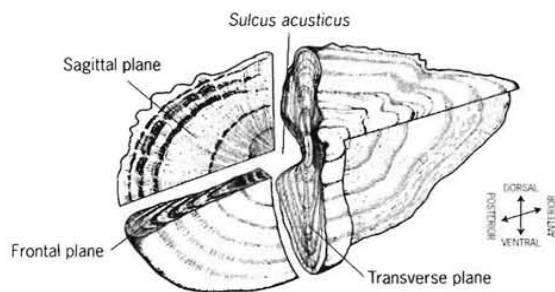


Figura 16: I tre piani di orientamento di una tipica *sagitta* (Panfili et al., 2002)

La faccia prossimale della *sagitta* ha un solco, il *sulcus acusticus*, che permette il contatto con l'epitelio sensoriale (*macula*) del *sacculus*. Una tipica *sagitta* è ellittica sul suo piano sagittale, ed è compressa nel suo asse interno-esterno, con una faccia prossimale convessa e una faccia distale concava, e con l'asse maggiore che è orientato nella direzione antero-posteriore. In molte specie di pesci epipelagici e pelagici come tonni, Ciprinidi e specie di acque profonde i lati dorsale e ventrale dell'otolite sono asimmetrici (Panfili et al., 2002).

COMPOSIZIONE

Gli otoliti sono formati extracellularmente dalla cristallizzazione del carbonato di calcio, che si presenta sottoforma di aragonite, in una matrice organica composta in larga parte di una proteina simile alla cheratina, l'otolina, che è ricca di residui di aspartato e glutammato.

L'otolite si accresce aggiungendo strati di proteine e carbonato di calcio, il cui risultato è una struttura lamellare come gli anelli della sezione di un tronco d'albero.

La maggior parte otoliti contengono più del 95% in peso di carbonato di calcio, con il 3-5% in forma di una matrice organica, e meno dell'1% come elementi in tracce non organici. La composizione degli elementi in traccia e degli isotopi stabili degli otoliti è stata studiata

ampiamente, poiché vi sono numerose applicazioni nel ricostruire la storia ambientale, la migrazione e l'identità di popolazione dei pesci (Campana, 2004).

Il carbonato di calcio può cristallizzare in una qualsiasi delle tre forme cristalline: calcite, aragonite, o vaterite. Tuttavia, la stragrande maggioranza degli otoliti sagitta e lapilli sono costituiti da aragonite, che ha un aspetto bianco latte. Differentemente dagli otoconi dei mammiferi, che sono composti di calcite.

Curiosamente, i diversi polimorfi del carbonato di calcio sembrano essere collegati ai vari otoliti. Mentre l'aragonite è la norma per sagitte e lapilli, la maggior parte degli asteriscii sono fatti di vaterite, visibili per il loro aspetto vetroso (Oliveira et al., 1996). La vaterite è anche il polimorfo principale in molti otoliti aberranti. La sagitta quando è composta di vaterite ha le stesse dimensioni rispetto a quella di aragonite però è molto meno densa e ciò comporta un'alterazione della funzione uditiva del pesce, in particolare un abbassamento o una perdita della sensibilità uditiva (Oxman et al., 2007).

Regioni di calcite negli otoliti sono molto più rari. La spiegazione della composizione degli otoliti dominata soprattutto dal carbonato di calcio si può collegare con la loro conservazione e stabilità. Sia il carbonato di calcio che gli otoliti sono stabili per molti anni se conservati in un luogo asciutto. Tuttavia, il carbonato di calcio è solubile all'acido, quindi anche una soluzione debolmente acida può comportare la dissoluzione dell'otolite (Campana, 2004).

FUNZIONE

I canali semicircolari nei pesci servono per mantenere l'equilibrio e hanno cellule nervose che sono sensibili alla pressione, gravità, movimenti angolari e vibrazioni sonore. La parte superiore dei labirinti auricolari ovvero i canali semi-circolari e l'*utricle* danno informazioni sulla postura mentre la parte inferiore che presenta il *sacculus* e la *lagena* è coinvolta nella ricezione dei suoni. Gli otoliti dei Teleostei, anche se più grandi, sono simili agli otoconi di altri Vertebrati (Panfili et al., 2002).

Il *sulcus acusticus* degli otoliti ha una diretta relazione con la *macula* dell'epitelio vestibolare che è direttamente connessa con il nervo auditivo (Figura 17).

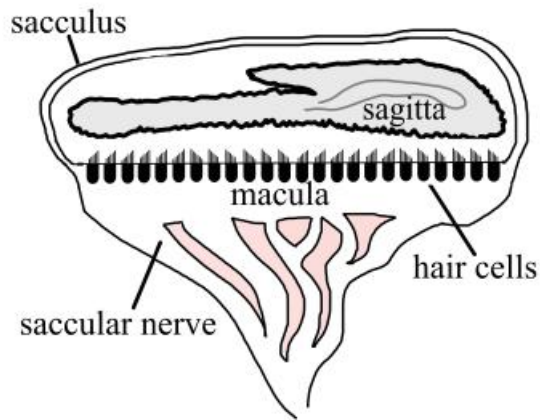


Figura 17: Struttura generale del sacculus (VanderKooy, 2009).

È stato ipotizzato che il suono raggiunge l'orecchio interno tramite due vie differenti. Dato che il corpo dei pesci è approssimativamente della stessa densità dell'acqua, esso si muove in acqua in risposta ad un campo sonoro contrastante. L'otolite, però, è più denso del resto del corpo, e così si muove con una differente fase rispetto alla *macula* e il corpo. In questo modo la sorgente del suono stimola direttamente l'orecchio interno e permette ai pesci di 'sentire'. In più poiché la vescica natatoria contiene gas meno denso del corpo, le pareti della vescica stessa vibrano. Questo produce uno stimolo indiretto attraverso lo spostamento degli otoliti (Popper and Lu, 2000).

MORFOMETRIA CLASSICA ED EFA

La morfometria si occupa di studiare come una qualsiasi forma varia e come cambia in associazione con altre variabili. Tradizionalmente, la morfometria era l'applicazione di analisi statistiche multivariate alle variabili quantitative come la lunghezza, la larghezza e l'altezza. Alla fine degli anni 80' e nei primi anni del 1990 tuttavia, si è verificato un cambiamento nel modo in cui le strutture morfologiche sono state quantificate e di come i dati sono stati analizzati. Questo cambiamento metteva in risalto metodi che catturavano la geometria delle strutture morfologiche d'interesse, e conservavano queste informazioni durante le analisi (Adams et al., 2004). Questi metodi geometrici possono essere raccolti in due gruppi: "outline methods" e "Landmark methods". Il primo racchiude tutti i metodi che si basano sull'analisi dei contorni per mezzo di una linea digitale (grande numero di punti) attorno al bordo di un oggetto, e la maggior parte delle analisi degli outline si basano sull'analisi di Fourier (Cadrin, 2000). Per la seconda tipologia di metodi geometrici ci si basa sui landmarks che sono punti ben definiti e che si suppone siano presumibilmente omologhi da un esemplare all'altro. Buoni landmark sono in genere messi sugli spigoli vivi, in corrispondenza delle estremità appuntite di strutture allungate, o altre strutture molto

piccole che possono essere considerate come punti. Diversi metodi che usano i landmark sono stati sviluppati per quantificare il cambiamento da una forma ad un'altra, ad esempio le griglie biortogonali e metodi di sovrapposizione (Cadrin, 2000).

Per la morfometria classica si misurano alcuni parametri descrittivi di forma come ad esempio: altezza, lunghezza, perimetro, area. Da questi parametri è possibile calcolare alcuni indici descrittivi di forma come ad esempio: Circolarità ($4\pi \times \text{Area} / (\text{Perimetro})^2$), Aspect Ratio (Asse Maggiore/Asse Minore), Rotondità ($4 \times \text{Area} / \pi \times (\text{Asse Maggiore})^2$) e Solidità (Area/Area circoscritta). La circolarità passa da valori da 0 a 1, con 1 si indica un cerchio perfetto mentre con valori che si avvicinano a 0 indicano una forma sempre più allungata. L'Aspect Ratio è il rapporto tra la dimensione più lunga e quella più corta di una figura bidimensionale. La Rotondità è l'inverso dell'Aspect Ratio mentre la Solidità indica quanto è irregolare il bordo rispetto ad un cerchio circoscritto.

Kuhl e Giardina (1982) sono stati i primi a descrivere gli Elliptic Fourier descriptors (EFDs) che possono determinare qualsiasi tipo di profilo chiuso e da allora furono effettivamente applicati per valutare varie forme biologiche negli animali e nelle piante (Ferson et al., 1985; Iwata et al., 1998, 2000, 2002; Yoshioka et al., 2004). L'Analisi Ellittica di Fourier scompone la forma del profilo in una serie di armoniche che sono descritte da 4 coefficienti di Fourier (Rohlf and Archie 1984).

Come raccomandato da Rohlf e Archie (1984), i coefficienti di Fourier (FC) vengono calcolati usando l'analisi ellittica di Fourier (EFA) e dovrebbero essere matematicamente normalizzati per evitare distorsioni nei risultati a causa delle diverse dimensioni, le rotazioni e le posizioni di partenza dei campioni.

Giardina e Kuhl (1982) svilupparono un metodo per fittare separatamente le coordinate x e y di un outline proiettato su un piano. Questo metodo è stato utilizzato molto in quanto ha grandi vantaggi rispetto agli altri approcci basati su Fourier: non è necessario che i punti siano ugualmente distanziati, e praticamente qualsiasi outline può essere fittato (Rohlf and Archie, 1984) e i coefficienti possono essere estratti indipendentemente dalla posizione dell'outline e normalizzati per le dimensioni.

Sia T il perimetro di un dato contorno chiuso, qui considerato come il periodo del segnale. Una serie di $\omega = 2\pi / T$ saranno la frequenza. Quindi, in ascissa, la curva t varia da 0 a T. Si può esprimere x (t) e y (t) come:

$$x(t) = \frac{a_0}{2} + \sum_{n=1}^{+\infty} a_n \cos(n\omega t) + b_n(\sin n\omega t)$$

con

$$a_n = \frac{2}{T} + \int_0^T x(t) \cos(n\omega t) dt$$

$$b_n = \frac{2}{T} + \int_0^T x(t) \sin(n\omega t) dt$$

allo stesso modo,

$$y(t) = \frac{c_0}{2} + \sum_{n=1}^{+\infty} c_n(\cos n\omega t) + d_n(\sin n\omega t)$$

con

$$c_n = \frac{2}{T} + \int_0^T y(t) \cos(n\omega t) dt$$

$$d_n = \frac{2}{T} + \int_0^T y(t) \sin(n\omega t) dt$$

Dal momento che un outline contiene un numero k finito di punti, si possono quindi calcolare i valori discreti per ogni coefficiente armonico delle n^{th} armoniche:

$$a_n = \frac{T}{2\pi^2 n^2} \sum_{p=1}^k \frac{\Delta x_p}{\Delta t_p} \left(\cos \frac{2\pi n t_p}{T} - \cos \frac{2\pi n t_{p-1}}{T} \right)$$

$$b_n = \frac{T}{2\pi^2 n^2} \sum_{p=1}^k \frac{\Delta x_p}{\Delta t_p} \left(\sin \frac{2\pi n t_p}{T} - \sin \frac{2\pi n t_{p-1}}{T} \right)$$

Quindi $\Delta x_l = x_l - x_k$ e in modo simile sono calcolati c_n e d_n . Mentre a_0 e c_0 corrispondono al valore delle coordinate del centroide dell'outline originale e sono calcolate:

$$a_0 = \frac{2}{T} \sum_{i=1}^p x_i$$

e

$$c_0 = \frac{2}{T} \sum_{i=1}^p y_i$$

Intuitivamente, per tutti i numeri interi positivi n , la somma del coseno e del seno della curva rappresenta l' n^{th} contenuto armonico delle proiezioni x e y del poligono con bordo k , e per ogni n , queste due curve definiscono un'ellisse nel piano. La ricostruzione del poligono originale è dato da un vettore che aggiunge queste ellissi per tutte le armoniche, e la ricostruzione ottenuta da N armoniche è la misura migliore possibile (Bonhomme et al. 2013).

Nell'analisi ellittica, si ottengono quattro coefficienti per armonica, due per x e due per y . Possiamo usare la prima armonica, che definisce il miglior modo in cui si adatta l'ellisse, per normalizzare i coefficienti delle armoniche e renderli invarianti rispetto alle dimensioni e la rotazione. I coefficienti armonici possono essere normalizzati per la posizione della prima coordinata dell'outline. Se è così, le forme sono allineate individualmente secondo la loro prima ellisse. In caso contrario, un punto omologo deve essere definito per ogni outline, ma ci deve essere una logica per ritenere che la posizione del punto di partenza viene conservata per tutti gli outline, cioè viene considerato un punto omologo (Bonhomme et al., 2013).

L'Analisi Ellittica di Fourier è un potente strumento per il confronto di forme a diversi livelli tassonomici, compreso a livello intraspecifico (Monti et al., 2001).

Dallo stato dell'arte è risaputo come la forma dell'otolite è influenzata da alcuni fattori come: il sesso, l'età, la classe di età, lo stock e l'ambiente (Cardinale et al., 2004).

La forma dell'otolite è altamente specie-specifica e spesso si possono notare variazioni clinali relative alla distanza, posizione geografica, e la profondità. Alcuni autori hanno fatto notare come la forma degli otoliti può essere controllata da diversi fattori, che includono alcune discontinuità nella crescita che è controllata dall'epitelio sensoriale. Questi stimoli sono indotti da variazioni nelle condizioni ambientali, come il fotoperiodo, la temperatura e le abitudini alimentari. Queste caratteristiche, rendono gli otoliti delle strutture ideali per l'identificazione degli stock, perché contengono una serie di caratteristiche misurabili, che

includono la densità ottica, micro-elementi, zonazione microstrutturale, e patterns di crescita, così come la morfometria lineare e di forma (Duarte-Neto et al., 2008).

L'analisi della forma degli otoliti è diventata uno strumento ampiamente utilizzato per l'identificazione degli stock ittici (Campana and Casselman, 1993; Leguá et al., 2013; Mérigot et al., 2007; Tracey et al., 2006) e per la discriminazione delle specie (Xin et al., 2014).

I potenziali benefici delle analisi morfometriche sono ben documentati, infatti, possono produrre test indipendenti, oggettivi e ripetibili d'ipotesi tassonomiche, filogenetiche ed evolutive che si basano su studi qualitativi; essi possono specificare, localizzare e quantificare il cambiamento attraverso l'evoluzione morfologica e l'ontogenesi; e permettono la separazione tassonomica (Haines and Crampton, 2000).

L'analisi delle immagini della forma degli otoliti svolge un ruolo rilevante nella branca della ricerca che si occupa della morfometria, perché migliora la raccolta dei dati e fornisce una migliore descrizione della forma e permette di sviluppare nuovi metodi di analisi (Duarte-Neto et al., 2008).

MEDITS 2012

Dal 2012, la lista di riferimento della MEDITS delle specie bersaglio include 83 specie, di cui 32 sono Elasmobranchi (l'elenco comprende anche tutte specie dei generi *Epinephelus* e *Scomber*, per i quali devono essere prese misure di lunghezza).

Per tutte le 83 specie deve essere raccolto il numero totale di individui, il peso totale e la lunghezza individuale.

Questo elenco è stato ulteriormente diviso in due gruppi:

- MEDITS G1 comprende 41 specie di cui 9 sono demersali (3 pesci, 4 crostacei e 2 cefalopodi) e 32 Selaci. Per queste specie deve essere raccolto il numero totale di individui, il peso totale del pescato, la lunghezza totale di ogni individuo e anche parametri biologici compreso il sesso, la maturità, peso individuale ed età (l'età è stato proposto solo per i Teleostei del Gruppo 1);

- MEDITS G2 include 42 specie per le quali devono essere raccolti solo il numero totale di individui, peso totale e lunghezza individuale.

Se un esemplare vivo di una specie rara o una specie soggetta a misure di conservazione è catturata, si devono ottenere la lunghezza, i dati di peso e sesso e riportare l'esemplare illeso in mare, dandogli una possibilità di sopravvivenza. Gli esemplari devono essere restituiti al mare preferibilmente entro 4-5 minuti (MEDITS Handbook, 2013).

L'incontro sulla MEDITS tenutosi a Nantes il 15-17 marzo 2011 ha deciso di aumentare le informazioni registrate nel corso dell'indagine MEDITS, compreso il controllo delle nuove variabili biologiche, come l'età delle specie di pesci ossei codificati G1 nel nuovo elenco delle specie bersaglio, e il peso individuale di tutte le specie codificate G1 nella stessa lista. I dati riguardanti le fasi di maturità per le stesse specie dovrebbero anche essere raccolte.

Il monitoraggio dell'età dei pesci ossei, che implica il campionamento degli otoliti, richiede un protocollo comune in modo da armonizzare la tecnica di campionamento, la dimensione del campione, e la registrazione delle informazioni.

È quindi importante identificare prima gli obiettivi della nuova implementazione. Il campionamento degli otoliti può essere finalizzato a:

- 1) stima degli indici di abbondanza in età e il monitoraggio della struttura dello stock nel tempo;
- 2) monitorare la distribuzione spaziale dei gruppi di età;
- 3) Utilizzare la lunghezza sui dati di età per stimare le curve di crescita;
- 4) stimare gli indici strutturali per essere utilizzati nelle procedure di gestione degli stock;

Il monitoraggio del peso individuale può essere finalizzato a:

- 1) stima del rapporto lunghezza-peso delle specie bersaglio;
- 2) stima della curva di crescita in peso, se anche gli otoliti sono campionati;
- 3) valutare le condizioni delle specie campionate come indicatore del benessere di popolazioni selvatiche;

Il monitoraggio della maturità può essere finalizzato a:

- 1) valutare gli indici di abbondanza, le tendenze e la distribuzione spaziale delle fasi di vita (ad esempio i riproduttori).

In termini di costi e sforzo di campionamento è preferibile un protocollo comune che consente la realizzazione contemporanea di tutti questi obiettivi.

Quindi si è deciso di adottare il campionamento casuale basato sulla lunghezza, in cui un numero fisso di esemplari sono raccolti a caso per ogni classe di taglia e per sesso, e ad ognuno vengono presi gli otoliti, peso individuale e le fasi di maturità (MEDITS Handbook, 2013).

Il numero ottimale di otoliti per classe di taglia non può essere dato in maniera universale. In accordo con Mandado e Vasquez (2011) un campione di 20 otoliti per ogni classe di taglia è consigliato per una specie con 30-40 classi di taglia.

Il numero di otoliti dipende dalle proporzioni delle classi di taglia all'interno della frequenza di taglia e dalla variazione massima della proporzione dei gruppi di età all'interno delle classi di taglia.

Il protocollo MEDITS per gli individui del genere *Mullus*, che sono specie target nella lista G1, prevede la divisione di classi di taglia a 0.5 cm e numero di otoliti estratti per classi di taglia e sesso uguale a 6 per gli individui giovanili e 14 per gli adulti.

Per ogni individuo di *M. barbatus* e *M. surmuletus* sono state prese quindi:

- 1) Lunghezza totale del pesce: misurata dal muso del pesce fino alla punta della coda ed espressa in millimetri (mm).
- 2) Peso totale: espresso in grammi (g)
- 3) Sesso: osservando la presenza delle gonadi o dei tubuli seminiferi ed espresso con le sigle M per maschio, F per femmina, N per non determinato e I per indeterminati perché immaturi.
- 4) Maturità sessuale: stabilita rispettando dei protocolli ben definiti ed espressa con i numeri da 1, per gli immaturi, e poi 2, 3 e 4 per gli individui a diverso grado di maturità. 2 e 4 sono anche seguiti dalle lettere A, B e C per fare un'ulteriore discriminazione ed essere più precisi.

ESTRAZIONE E STOCCAGGIO DEGLI OTOLITI DI *MULLUS* spp

Per estrarre gli otoliti si deve aprire il cranio dei pesci in questo modo si accede alla cavità dell'orecchio interno (Mahé et al., 2009). È importante conoscere l'anatomia dell'apparato vestibolare e la morfologia degli otoliti per rimuoverli in modo efficace senza apportare alcun danno (Stevenson and Campana, 1992). Il taglio del cranio può essere fatto in diversi modi:

1. Sezione frontale della testa
2. Sezione frontale inversa
3. Sezione trasversale

La sezione frontale della testa consiste nel taglio a 45° dalla fronte del pesce tenendolo fermo con pollice e indice. La sezione trasversale viene fatta con un taglio dalla parte dorsale verso la parte ventrale della testa (Mahé et al., 2009).

Tra tutte le tecniche di taglio, nei Laboratori di Biologia della Pesca di Fano, si utilizza la sezione frontale seguendo una linea non di 45° ma di 90° rispetto all'asse principale del corpo dell'animale, prendendo come punto di riferimento per il taglio il pre-opercolo (Figura 18).



Figura 18: Taglio della sezione frontale della testa di *Mullus barbatus*

La sezione frontale inversa è un'altra tecnica del taglio usata soprattutto per la triglia di fango e di scoglio. Una volta aperto il cranio e tolta la parte anteriore dell'encefalo è possibile individuare ed estrarre facilmente le due sagitte con delle pinzette (Figura 19).

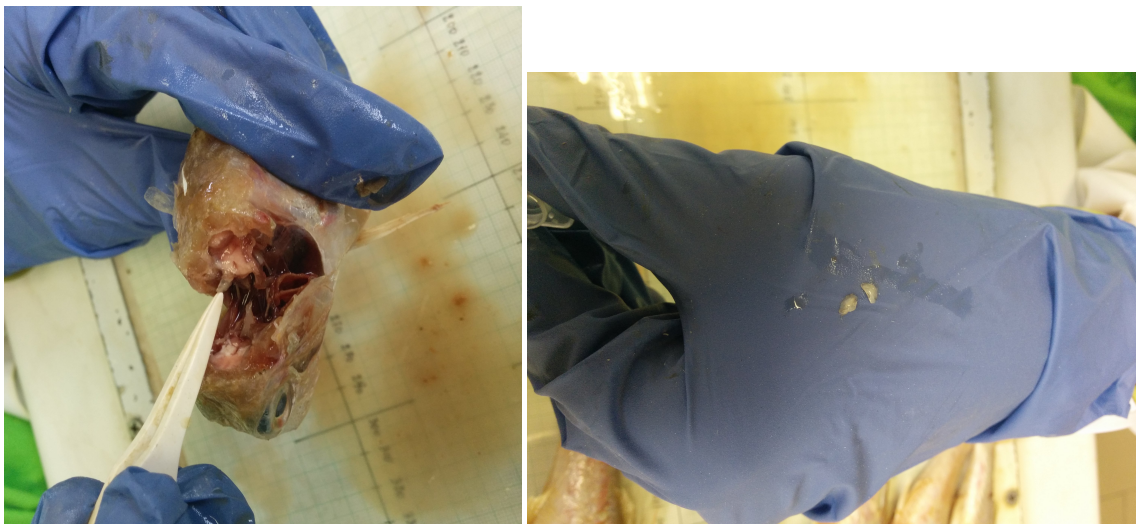


Figura 19: Estrazione degli otoliti con una pinzetta da laboratorio (sinistra). Coppia di otoliti appena estratti dall'esemplare (destra).

Una volta estratti gli otoliti il modo migliore per conservarli è metterli in un luogo completamente asciutto. Dopo la pulizia, vengono essiccati semplicemente esponendoli all'aria a temperatura ambiente o in un incubatore a bassa temperatura (Panfili et al., 2002).

Ci sono due modalità di stoccaggio: bustine di carta o in Eppendorf. In questo caso ciascun campione è stato conservato in delle Eppendorf che hanno il vantaggio di essere sufficientemente rigide da proteggerlo da eventuali urti (Mahè et al., 2009). Ogni campione è costituito da una coppia o un singolo otolite di ogni individuo e su ciascuna Eppendorf viene registrato il numero identificativo del campione di otoliti (es. OTO 001), le iniziali della specie (es. MB), la sigla del sesso (M, F, I o N) e la taglia dell'individuo da cui sono stati prelevati in mm (es M 180).

SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del mio lavoro è stato quello di analizzare i campioni di otoliti delle due specie del genere *Mullus* utilizzando sia la morfometria geometrica, in particolare l'Analisi Ellittica di Fourier (EFA), che l'analisi di morfometria classica con gli indici di forma. L'applicazione di questi metodi di indagine risulta molto utile quando si fanno studi sugli stock. L'analisi condotta aveva come scopo quello di verificare la simmetria tra l'otolite destro e sinistro in ognuna delle singole specie di *Mullus* e se varia la forma in base alla taglia dell'individuo. Con l'Analisi Ellittica di Fourier è stato possibile mettere a confronto le forme degli otoliti facendo i confronti multipli in base alla faccia, al sesso e alla classe di taglia. Inoltre è stato fatto un confronto tra le forme degli otoliti delle due specie. Dalle analisi EFA è stato possibile anche valutare se gli esemplari raccolti appartenessero tutti al medesimo stock o se invece provenissero da stock differenti.

MATERIALI E METODI

CAMPIONI MEDITS 2012

I campioni di otoliti della specie *Mullus barbatus* che sono stati analizzati provengono tutti dalla campagna MEDITS 2012 (Figura 20).

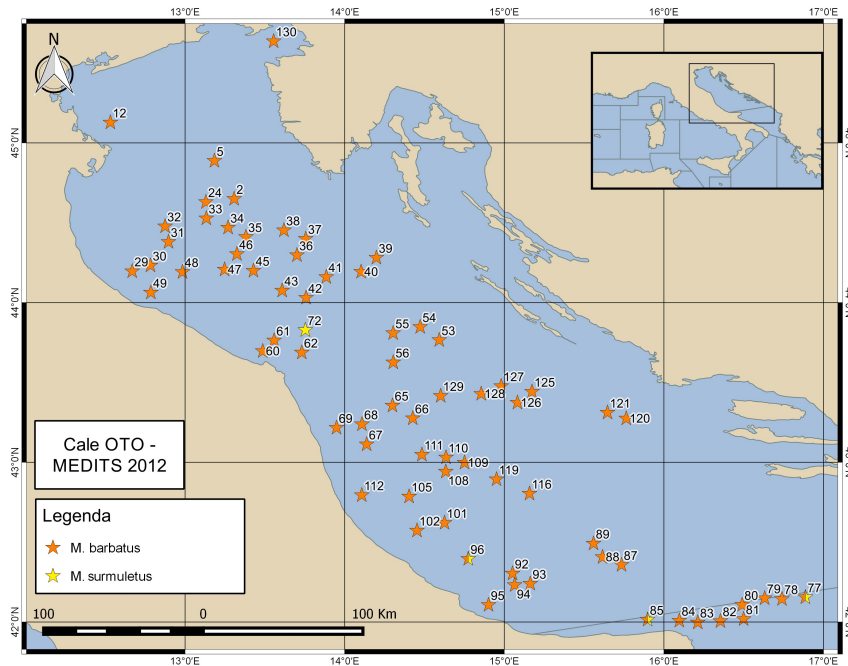


Figura 20 "Mappa delle cale MEDITS 2012 dove sono stati raccolti gli esemplari da cui sono stati estratti i campioni di otoliti di *M. barbatus* e *M. surmuletus*"

Data la quantità minima di esemplari della specie *Mullus surmuletus* raccolta nel 2012 (solo 5), i campioni di otoliti che sono stati presi in considerazione per le analisi successive comprendono quelli di altre due campagne, GRUND 2002 (75 campioni) e MEDITS 2014 (38 campioni), per un totale di 118 campioni analizzati. In tutta la campagna MEDITS 2012 in totale sono stati raccolti 3309 esemplari di Mullidi, e da questi sono stati estratti 600 otoliti da *M. barbatus* e 5 da *M. surmuletus*. In Figura 21 e 22 sono riportate le taglie sia di tutti gli individui di *M. barbatus* separati per sesso, che solo gli individui da cui sono stati estratti gli otoliti.

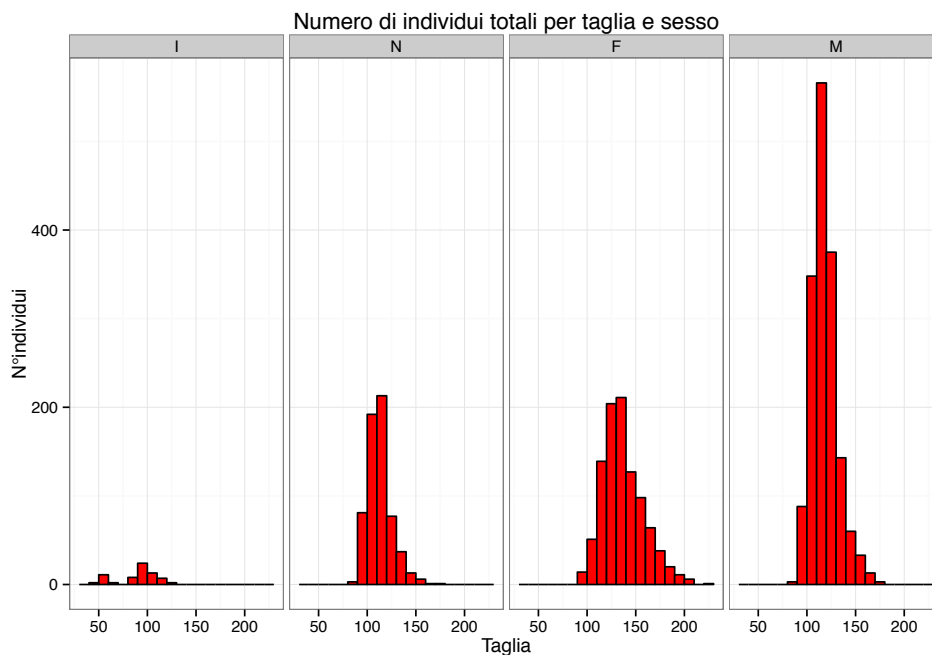


Figura 21: Grafico che riporta il numero di individui totali per taglia e separati per sesso.

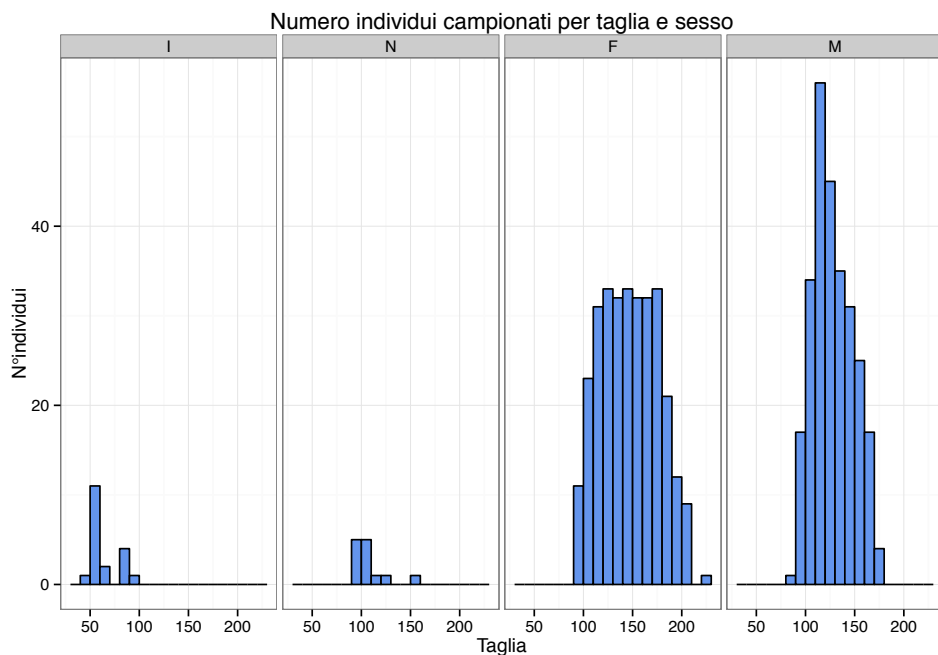


Figura 22: Grafico che riporta il numero di individui da cui sono stati estratti gli otoliti per taglia e separati per sesso.

LAVAGGIO DEGLI OTOLITI

Una volta estratti gli otoliti è importante pulirli al fine di rimuovere tutti i residui organici delle membrane rimasti su di essi (Mahè et al., 2009). Inoltre la pulizia degli otoliti è importante affinché si possano osservare nel modo migliore le microstrutture dell'otolite e per una migliore acquisizione dell'immagine (Stevenson and Campana, 1992).

Per il lavaggio è stato eseguito un metodo messo a punto dai ricercatori del Laboratorio di Biologia Marina di Fano che prevede l'utilizzo del sonicatore, di acqua distillata e acqua ossigenata (Figura 23).



Figura 23: Sonicatore Elma® utilizzato durante il lavaggio degli otoliti.

Questo metodo prevede di mettere 1 ml di acqua distillata filtrata a 0.45 μm all'interno di ogni Eppendorf per 15 minuti in modo da reidratare i tessuti molli rimasti attaccati all'otolite. Passati i 15 minuti le Eppendorf vengono posizionate all'interno del sonicatore colmo di acqua distillata non filtrata. Lasciate all'interno del sonicatore per 10 minuti, vengono poi svuotate per essere riempite di acqua ossigenata per 15 minuti. Nel frattempo le Eppendorf vengono agitate con un miscelatore, in modo che si eviti la formazione di bollicine sulla superficie dell'otolite, che ne impedisce il contatto con l'acqua ossigenata. Una volta passati i 15 minuti si svuotano di nuovo le Eppendorf e si riempiono con acqua distillata filtrata per un primo ciclo di lavaggio. Passati 15 minuti vengono messe nel sonicatore per 5 minuti. Questo ciclo viene ripetuto due volte con uguale procedura in modo da eliminare tutta l'acqua ossigenata rimasta. Alla fine del secondo ciclo di lavaggio i campioni sono controllati allo stereomicroscopio "WILD Heerbrugg" per vedere se sono rimasti residui di membrana che eventualmente viene rimossa con l'aiuto di uno spillo. Nel caso in cui i campioni ancora non siano ritenuti perfettamente puliti si procede con un ulteriore ciclo di lavaggio.

ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI

Per procedere con le analisi successive quali forma e dimensione, o per eventuali misure per il calcolo dell'età è necessario acquisire le immagini al computer, in questo modo è possibile utilizzare software di immagini come ad esempio ImageJ (Collins, 2007) per il calcolo dei principali parametri morfometrici. Il campione viene posto in immersione con acqua di mare filtrata a 0.45 μm , sotto lo stereomicroscopio a luce riflessa con ingrandimento 25 X, il quale è collegato ad un PC per mezzo di una telecamera per microscopi DCM500 posta su un



Figura 24:
Stereomicroscopio con telecamera annessa.

oculare del microscopio (Figura 24).

L'acquisizione dell'immagine viene fatta tramite il software ScopePhoto 3.0 che trasmette l'immagine della telecamera al PC fornendo la possibilità di agire su alcune impostazioni come l'esposizione alla luce, contrasto, luminosità e colori. Regolando l'esposizione alla luce è possibile ottenere una perfetta immagine che mette in risalto le parti dell'otolite che servono poi per le successive analisi.

La forma dell'otolite non essendo perfettamente piatta ma concava può dare alcuni problemi su quale parte mettere meglio a fuoco, se preferire i bordi, il core o il solco acustico. Dato che per le analisi

dell'età, che comprendono sia la misurazione del radius che la lettura degli anelli, sono importanti sia il core che il bordo, mentre per le analisi morfometriche è più importante focalizzarsi sul bordo, si è scelto di mettere a fuoco l'immagine in una via di mezzo tra il core e il bordo. Il rostro (R) è la parte anteriore ventrale e il postrosto (P) è la parte posteriore ventrale, mentre l'antirostro (A) si trova dorsalmente nella parte anteriore. Prima di acquisire le immagini è stata decisa una posizione comune a tutti gli otoliti con l'asse rosto-postrosto in orizzontale e con l'antirostro sempre verso l'alto (Figura 25).

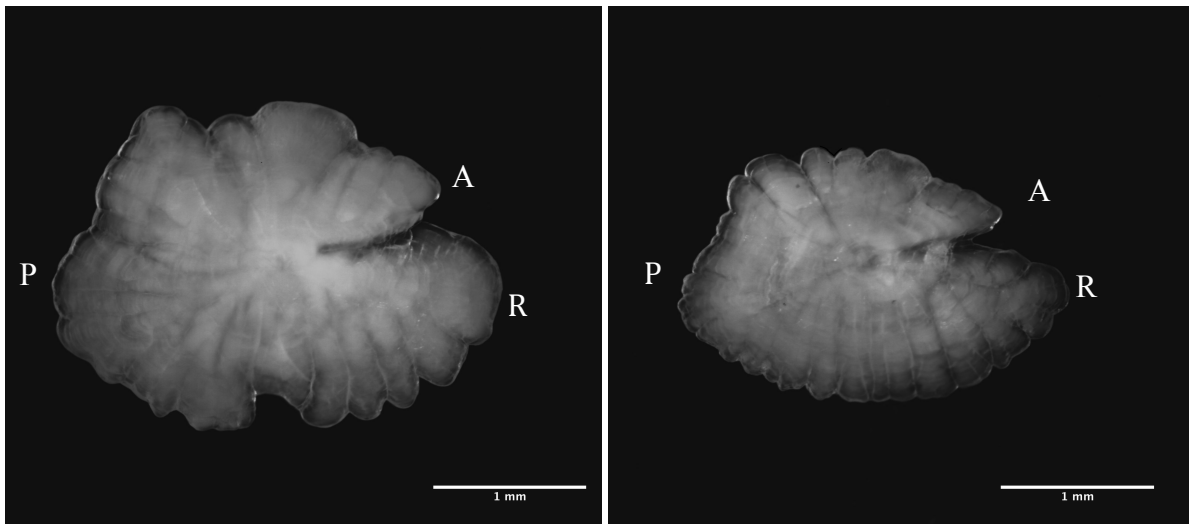


Figura 25: Esempio di otolite di *Mullus barbatus* (sinistra) e *Mullus surmuletus* (destra). L'asse rosto-postrosto è orizzontale con l'antirostro (A) verso l'alto.

Per tutti gli otoliti sono state acquisite due foto, una sul lato interno, dove è presente il solco acustico ed una sul lato esterno, inoltre per ogni otolite veniva riconosciuta la sua posizione all'interno del cranio del pesce distinguendo il destro dal sinistro. Ogni foto è stata inserita in un database e denominata con il proprio codice di appartenenza seguito dal codice corrispondente alla posizione dell'otolite nel cranio ("l" per i sinistri e "r" per i destri) e il lato ("1" per il lato interno e "2" per il lato esterno) (Figura 26).

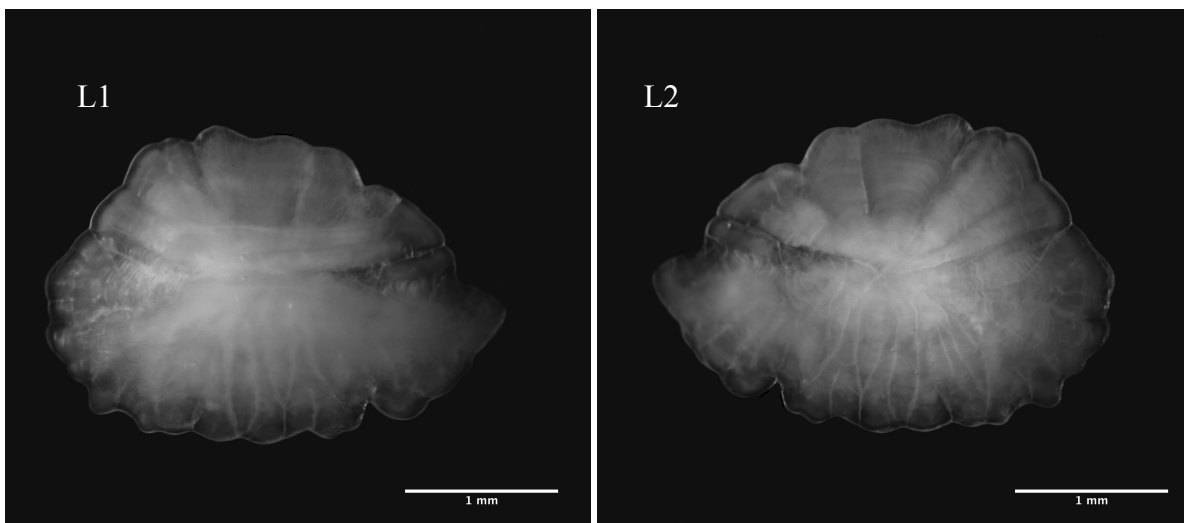


Figura 26: Esempio di otolite sinistro (L) con i due lati, quello interno (1) e quello esterno (2).

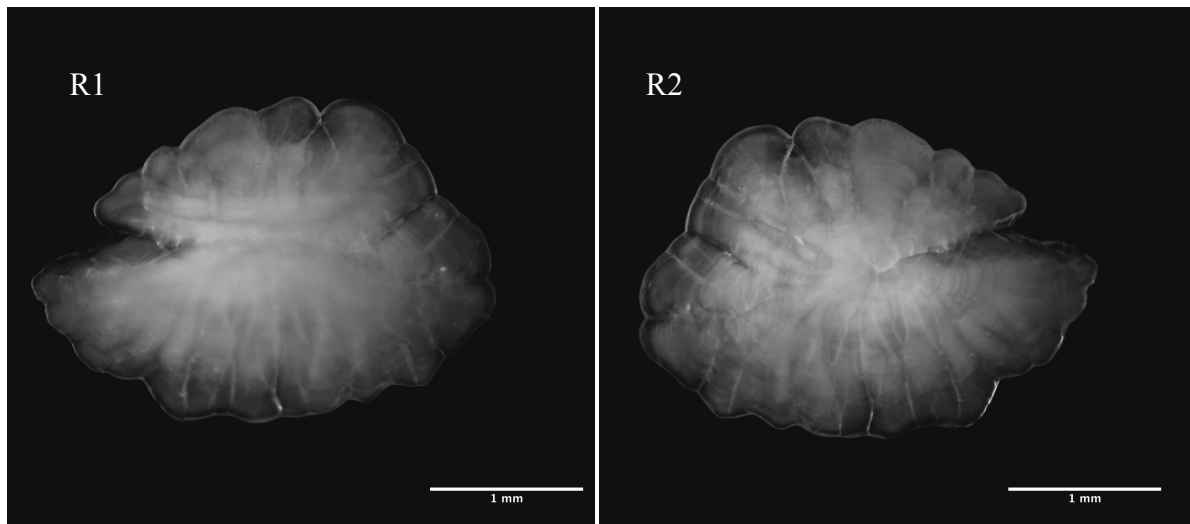


Figura 27: Esempio di otolite destro (R) con i due lati, interno (1) ed esterno (2).

Appena conclusa l'acquisizione, i campioni, sono stati prima asciugati e poi messi in acqua distillata al fine di rimuovere l'acqua salata, dopo alcune ore, tolta l'acqua distillata si lasciavano ad asciugare su una piastra elettrica a bassa temperatura.

IMAGEJ

Una volta acquisite, le immagini sono state elaborate con ImageJ (Collins, 2007).

ImageJ è un programma di elaborazione delle immagini basato su Java sviluppato presso il National Institutes of Health (NIH) da Wayne Rasband. Il programma ha le sue origini in un programma specifico precedente, OS chiamato NIH Image. ImageJ è scritto in Java, ed è open source. Il programma ha due opzioni di programmazione: la prima è la possibilità di aggiungere plugin Java, la seconda è un proprio linguaggio macro, che consente un semplice layer di programmazione. Il campo di applicazione del programma amplia continuamente perché può aprire un gran numero di formati d'immagine e può essere applicato alle immagini digitali da molte fonti, dalle telecamere ai sistemi confocali, e consente l'elaborazione di immagini sofisticate e l'analisi per la ricerca e l'istruzione (Sheffield, 2007). Per prima cosa tutte le immagini sono state calibrate utilizzando un particolare plugin sviluppato apposta per il tipo di ingrandimento utilizzato (25X) e per la modalità di acquisizione dell'immagine (immersione in acqua salata). Una volta calibrate le immagini tutti i risultati delle misure saranno in scala. Per il calcolo dei parametri di morfometria classica è stato messo a punto un altro plugin che aiuta ad automatizzare la procedura. Per ogni otolite dall'immagine originale venivano fuori sia gli Overlay che gli Outline (Figura 28).

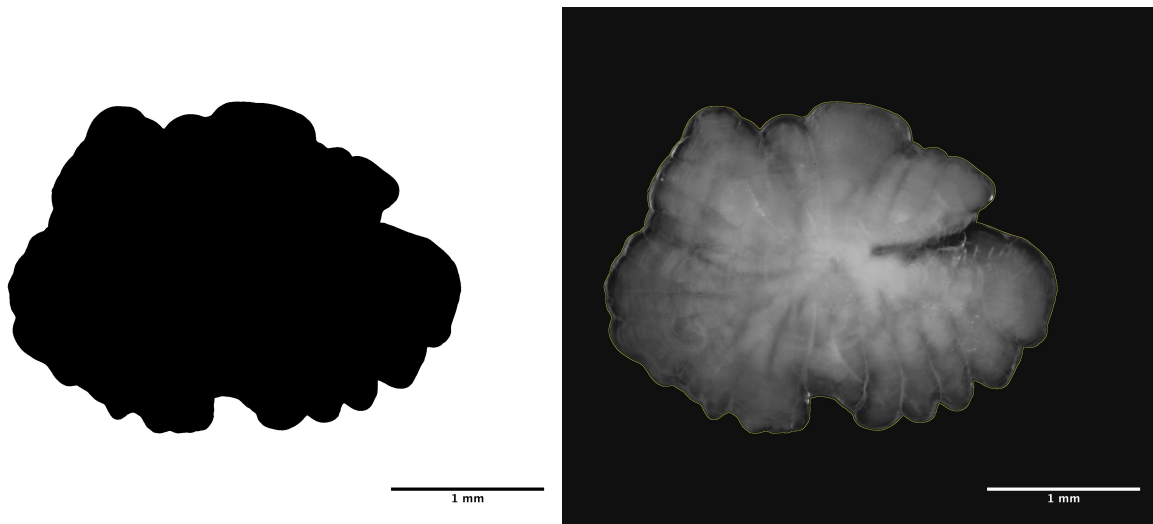


Figura 28: Esempio di immagine Outline (sinistra) e di Overlay (destra).

Per gli Overlay in ogni otolite una linea marcava il perimetro dell'immagine e come output in automatico il programma calcolava i vari indici di forma presi in considerazione come: Area, Perimetro, Circolarità, Feret, Feretx, Ferety, FeretAngle, MinFeret, Aspect Ratio (AR), Rotondità e Solidità. Il Feret è definito come la distanza più lunga tra due punti qualsiasi del bordo selezionato. L'angolo ($0 - 180^\circ$) del diametro del Feret viene considerato come FeretAngle, mentre il diametro minimo è il MinFeret. Sono visualizzate anche le coordinate di partenza del diametro Feret (FeretX e FeretY) (Ferreira and Rasband, 2012).

Dato che il programma utilizza la scala dei grigi per mettere in evidenza le linee perimetrali dell'immagine, non sempre la linea corrispondeva al perimetro, questo perché ci potevano essere delle trasparenze nel bordo dell'otolite che il software non riconosceva o dei pezzi di membrana rimasti attaccati al bordo anche dopo aver fatto il lavaggio. Gli Outline consistono nell'immagine completamente nera con sfondo bianco con il bordo dato dall'Overlay che, invece, è rappresentato dall'immagine originale con il bordo dell'otolite evidenziato. Dopo aver lanciato una prima volta il plugin si è passati al ritocco di immagine per fare in modo che al rilancio successivo del plugin non venissero fuori gli errori di prima. I ritocchi venivano fatti solo nei punti in cui il bordo non era stato visualizzato correttamente dal programma. Utilizzando opportunamente il contrasto e la luminosità si poteva vedere bene il bordo e rimarcarlo con il bianco nel caso in cui il problema fosse dovuto a delle trasparenze, se il problema invece era dovuto a qualche residuo di membrana attaccato al bordo, in quel caso con il nero si cancellava proprio all'altezza del bordo.

Alcuni otoliti presentavano un buco dato dall'unione del rostro con l'antirostro (Figura 29).

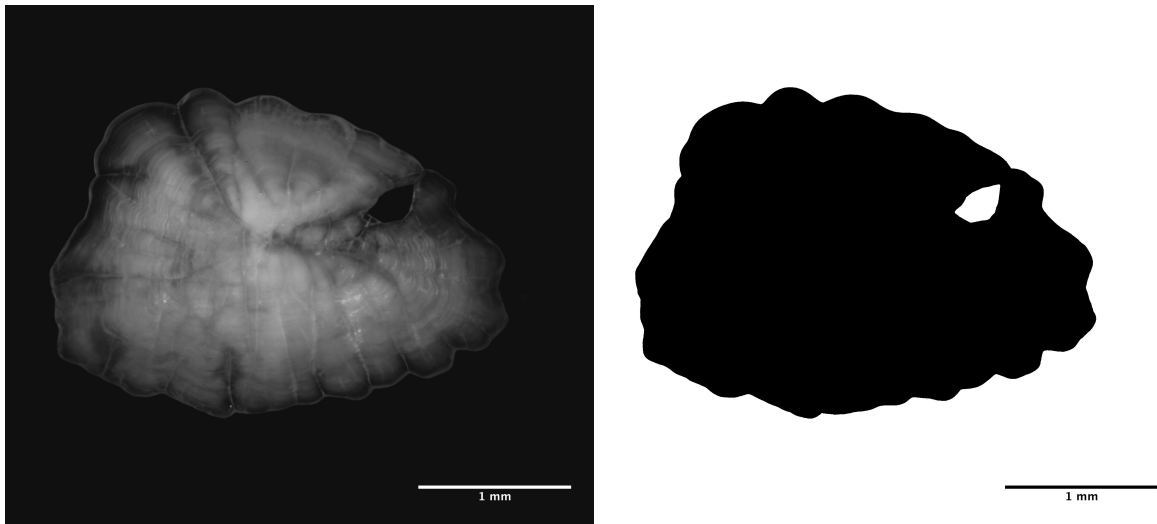


Figura 29: Esempio di otolite con il buco. Immagine originale (sinistra) e Outline (destra).

Questo buco aveva dimensioni variabili ma in ogni caso avrebbe falsato il dato reale dell'area, così si è deciso di toglierlo dal totale dell'area. Con lo stesso programma ImageJ ogni buco era evidenziato e quindi, una volta calcolata l'area corrispondente, si sottraeva a quella totale dell'otolite. Anche negli Outline è stato aggiunto il buco per avere un'immagine precisa che rispecchiasse quella originale. È stato visto anche come l'Area del buco cambiasse in funzione del Feret e della Taglia e vedere se la tendenza fosse quella di restringersi fino a chiudersi con l'aumentare di questi due parametri che sono strettamente correlati.

SCELTA DEI CAMPIONI

Prima di procedere con le analisi si è deciso di fare una scrematura dei campioni. Dei 600 campioni di *Mullus barbatus* un campione è stato tolto in quanto gli otoliti avevano un aspetto completamente diverso dalla tipica sagitta, presumibilmente erano altri otoliti come lapilli o asterisci. Dei restanti 599 sono stati tolti tutti i campioni rotti, in quanto non avrebbero dato nessun tipo di informazione riguardante la forma, e tutti gli otoliti di vaterite essendo degli otoliti aberranti che non rappresentano la vera forma dell'otolite (Figura 30).

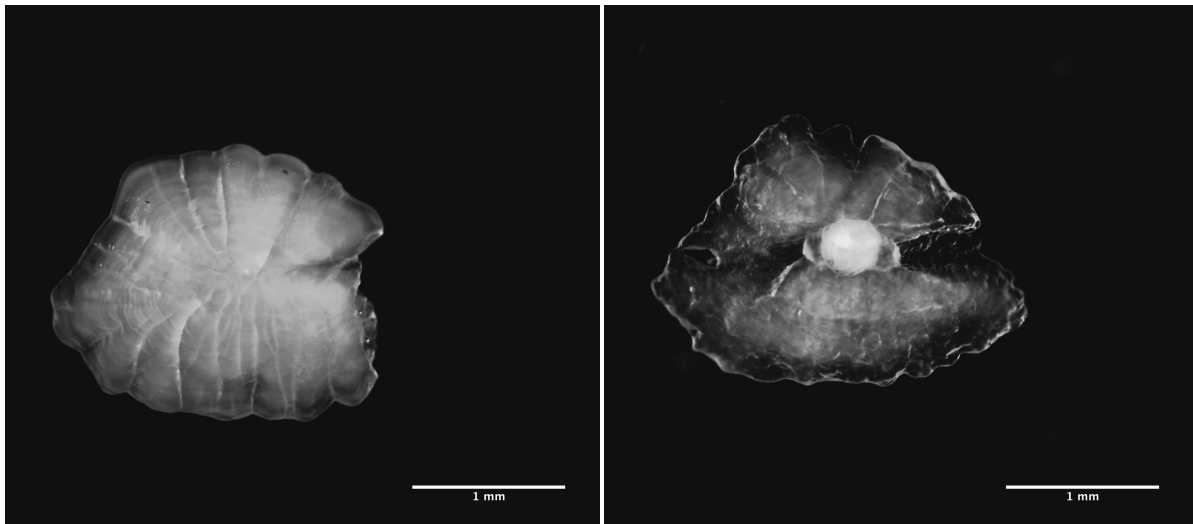


Figura 30: Esempio di otolite rotto (sinistra) e di otolite di vaterite (destra).

Dall'analisi sono stati tolti anche quei campioni con un singolo otolite poiché non avrebbero dato nessuna informazione sulla simmetria. Quindi dei 600 campioni in totale e dei 1164 otoliti di *Mullus barbatus* estratti durante la campagna MEDITS 2012, per le analisi, ne sono stati presi in considerazione solo 1084 che corrispondono a 542 campioni. Per *Mullus surmuletus* invece, i campioni in totale raccolti tra le campagne GRUND 2002, MEDITS 2012 e MEDITS 2014, erano 118 per un totale di 193 otoliti estratti. Di questi sono stati presi in considerazione solo 94 otoliti che rispecchiavano le stesse specifiche precedentemente descritte, quindi 47 campioni. Per fare i confronti tra le due specie si è deciso di considerare una sola faccia (l1) ed è stato preso lo stesso numero d'immagini, visto che di *M. surmuletus* avevamo soltanto 47 campioni tutti al di sopra dei 100 mm, sono stati presi 47 campioni anche per *M. barbatus* in maniera random sopra i 100 mm, in modo tale che il confronto fosse il più possibile bilanciato.

ANALISI STATISTICA

Prima di procedere all'analisi, tutti i dati meristici riguardanti le due specie del genere *Mullus* sono stati raccolti in dei fogli di Excel. I dati comprendevano: il CODICE, la TAGLIA e il SESSO.

Svolte le analisi con il programma ImageJ è stato creato un foglio Excel che comprendeva tutti i risultati dei vari parametri geometrici quali: Area, Perimetro, Circolarità, Feret, FeretX, FeretY, FeretAngle, MinFeret, AR, Rotondità e Solidità.

I dati sono stati elaborati con R Studio (2015). Per la parte grafica si è scelto di utilizzare il pacchetto ggplot2 (Wickham, 2009), per le analisi non parametriche è stato utilizzato il

pacchetto nparcomp (Konietschke et al., 2014), mentre per l'Analisi Ellittica di Fourier è stato utilizzato il pacchetto Momocs (Bonhomme et al., 2013).

Le analisi degli otoliti delle due specie sono state condotte separatamente.

Inizialmente è stato creato un Dataset che comprendesse tutti i dati meristici e tutti i dati degli indici di forma in un solo file, in questo modo tutti i dati avevano un'unica corrispondenza data dal codice dell'otolite.

Per semplificare le analisi inoltre tutti gli Outline sono stati posizionati con il rostro rivolto verso destra e il postrosto a sinistra. In questo modo erano perfettamente sovrapponibili, e per le analisi sulla simmetria non ci sarebbe stato bisogno di separarle facendo prima le facce l1-r2 e poi l2-r1.

Dall'osservazione dei dati meristici dei campioni di *M. barbatus* si è visto come era possibile dividerli in tre classi di taglia in base al sesso. I campioni con taglia inferiore ai 100 mm raggruppavano tutti gli Indeterminati (I) oltre che maschi (M), femmine (F) e non determinati (N) e non c'erano maschi (M) superiori ai 180 mm. Così si è deciso di fare tre classi di taglia: da 0 a 100 mm (che comprendevano tutti i sessi), da 100 a 180 mm (maschi, femmine e non determinati) e da 180 a 250 mm (solo femmine). Nelle analisi successive i confronti multipli sono stati fatti sia tra tutte le classi di taglia ma anche solo per la classe 100 - 180 mm nella quale ci sarebbero stati solo i maschi le femmine e i non determinati.

Per *Mullus surmuletus* invece, dopo che sono stati scelti i campioni con i criteri descritti prima, è stato visto che non c'erano individui Indeterminati (I) ed erano tutti con taglia sopra i 100 mm. Inoltre anche per loro è stata mantenuta la divisione di classi di taglia tra 100 - 180 mm e 180 - 250 mm poiché si è visto come con questa divisione i campioni si distribuivano in due gruppi omogenei. Per questi campioni però, sono stati fatti i confronti tra le facce, tra le facce in relazione al sesso e alla classe di taglia, ma non sono state considerate le relazioni con la singola classe di taglia 100 - 180 mm.

ANALISI DELLA MORFOMETRIA CLASSICA

Gli indici di forma che sono stati considerati per le analisi sono stati: Area, Perimetro, Feret, MinFeret, AR (Aspect Ratio), Rotondità, Circolarità e Solidità.

La maggior parte della variabilità in un insieme di dati morfometrici multivariati provenienti da popolazioni naturali è data dalla dimensione individuale. In morfometria, la taglia deve essere considerata come un'importante fonte di variabilità poiché è associata con la crescita individuale. Tutto questo contrasta con lo scopo di tali studi che sono solitamente focalizzati sulla forma, la quale non deve essere influenzata dalla taglia. Nel caso generale di crescita

allometrica (un tipo di variazione ontogenetica), vi è una variazione di forma relativa alla variazione nella taglia. L'influenza della taglia sulla forma, causata dalla crescita allometrica, può essere eliminata mediante procedure statistiche appropriate (Leonart, 2000).

Per eseguire le analisi statistiche, la taglia del pesce e gli effetti dell'allometria andrebbero evitati normalizzando tutte le misurazioni a una taglia media dell'animale, tenendo conto delle relazioni allometriche (Lombarte, 1993).

Prima di procedere all'analisi per ogni indice è stata calcolata la correlazione con la taglia. Per gli indici che avevano una correlazione maggiore di 0.8 sono state applicate le dovute trasformazioni.

Gli indici fortemente correlati e quindi da trasformare erano: Area, Perimetro, Feret e MinFeret; mentre per gli altri indici non c'era una forte correlazione. È stata anche calcolata la taglia media per poi procedere con le trasformazioni.

Ogni indice Y_{ij} , dove i rappresenta la variabile e j l'individuo, è trasformato in Y'_{ij} tramite l'equazione:

$$Y'_{ij} = Y_{ij} [X_0/X_j]^{b_i}$$

Dove X_j è la taglia dell'individuo j , X_0 è la taglia media di riferimento e b_i è il parametro allometrico relativo alla variabile dipendente Y_i con la variabile indipendente X . Y'_{ij} quindi è il valore che dovrebbe misurare Y_{ij} se la taglia del pesce fosse X_0 , considerando la sua crescita allometrica e residua. Per esempio per l'Area è stato prima trovato il coefficiente b dal modello lineare del logaritmo dell'Area e della taglia. Quindi sostituendo all'equazione di prima si ottiene:

$$\text{Area_trans} = \text{Area} [\text{taglia_media}/\text{taglia}]^b$$

dove l'Area_trans è il valore corrispondente dell'Area che avrebbe ogni individuo rapportato ad una determinata taglia media, che nel nostro caso è di 134 mm per *Mullus barbatus* mentre è di 177.7 mm per *Mullus surmuletus*. Questa trasformazione è stata fatta anche per Perimetro, Feret e MinFeret.

A questo punto per ogni indice sono stati fatti i confronti sulle facce (l1, l2, r1 e r2), confronti multipli facce – sesso, facce – classi di taglia, facce – classe di taglia (100 – 180 mm) e facce – sesso – classe di taglia (100 – 180 mm). Per *M. surmuletus* non sono stati considerati i confronti all'interno della singola classe di taglia 100 – 180 mm.

Per ognuno di questi confronti si è voluto procedere facendo prima il Test di Shapiro (Shapiro and Wilk, 1965) per vedere se i valori si distribuivano normalmente. Questo perché si è voluto verificare che fosse soddisfatto uno degli assunti della statistica parametrica cioè la normalità delle distribuzioni. Fatto il Test di Shapiro dal p-value si vede se i valori si distribuiscono normalmente, infatti, più è significativo più la distribuzione non è normale.

Nel caso in cui la distribuzione non fosse normale sono stati trasformati i dati: radice quadrata, logaritmo, quadratica. Se dopo la trasformazione, i valori si fossero distribuiti normalmente allora si passava alla verifica dell'altro assunto, cioè l'omogeneità della varianza, tramite il Bartlett test (Bartlett, 1954), in caso contrario non si poteva procedere con il test parametrico.

Per verificare l'altro assunto per i test parametrici ovvero l'omoschedasticità (omogeneità delle varianze) si è scelto di usare il Bartlett test. Nel caso in cui il p-value sia > 0.05 accettiamo o meglio non rifiutiamo l'ipotesi nulla. L'ipotesi nulla, infatti, sostiene che tutte le varianze sono tra loro omogenee.

A questo punto verificate tutte le assunzioni della statistica parametrica si è potuto passare all'analisi della varianza (ANOVA). Con l'ANOVA quindi sono stati fatti i confronti tra le medie dei gruppi per vedere se c'erano o no differenze significative.

Dopo l'ANOVA per valutare quali gruppi presentassero differenze tra loro è stato fatto un test post-hoc, in particolare il Test HSD di Tukey.

Il Test HSD di Tukey è un test post-hoc, ossia viene eseguita dopo l'analisi della varianza (ANOVA). Ciò significa che, per mantenere l'integrità, non si dovrebbe eseguire il test HSD di Tukey a meno che non si sia prima effettuata un'analisi ANOVA. In statistica, i test post-hoc sono utilizzati solo per ulteriori analisi dei dati. Lo scopo del test HSD di Tukey è quello di determinare quali gruppi del campione differiscono. Mentre l'ANOVA può dire se i gruppi del campione differiscono, non può dire quali gruppi differiscono. Cioè, se i risultati dell'ANOVA sono positivi, nel senso che c'è una differenza significativa tra i gruppi, non ci dice però quali gruppi in questo campione differiscono significativamente. Non è probabile che tutti i gruppi differiscono rispetto all'altro, solo pochi possono avere differenze significative. L'HSD di Tukey può chiarire quali gruppi nel campione nello specifico hanno differenze significative (Tukey, 1994).

Laddove veniva a mancare una delle assunzioni per i test parametrici cioè, o la normalità delle distribuzioni o l'omogeneità della varianza, si è deciso di procedere con l'analisi con un Test multiplo non parametrico. Il pacchetto nparcomp (Konietschke et al., 2014) di R ha una vasta gamma di test non parametrici, tra questi è stata utilizzata la funzione `gao_cs`.

Questa funzione può essere utilizzata per eseguire i test non parametrici multipli per tutti i confronti a coppie sviluppata da Gao et al. (2008), che è una modifica della procedura di confronto graduale multiplo di Campbell e Skillings (1985, CS).

I Test non parametrici sono test che non necessitano che le grandezze confrontate seguano una certa distribuzione (es. gaussiana). I metodi non parametrici sono particolarmente adatti a confrontare campioni di cui non si conosce o non si può ipotizzarne l'andamento della

distribuzione, quando cioè le variabili hanno evidenti scostamenti dalla normalità cioè o sono fortemente asimmetriche o presentano più di un picco. I metodi non parametrici sono meno efficaci ma più generali e vengono utilizzati quando non possono essere applicati i metodi parametrici in compenso però i vantaggi dei test non parametrici sono che richiedono assunzioni meno stringenti sui dati rispetto a quelle necessarie per i consueti test parametrici e sono più semplici da applicare.

EFA

L'analisi degli Outline richiede necessariamente che il profilo su cui i punti vengono campionati debba essere strutturalmente definito e ciò che viene estratto sono le informazioni geometriche contenute nel profilo stesso e nel suo complesso.

Tuttavia, quando si confrontano le forme, gli outlines devono avere delle caratteristiche strutturali simili. In particolare, gli approcci basati su Fourier sono abbastanza potenti per estrarre queste informazioni geometriche. Essi si basano sull'idea di serie di Fourier: decomporre una funzione periodica in una somma di più semplici funzioni trigonometriche come seno e coseno. Queste funzioni semplici hanno frequenze che sono multipli interi, cioè, sono armoniche, l'una rispetto all'altra. Le armoniche inferiori forniscono approssimazioni su grossa scala per la funzione periodica originale, mentre le armoniche ad alta frequenza fittano bene per le variazioni a piccola scala (Bonhomme et al., 2013).

Per l'Analisi Ellittica di Fourier (EFA) è stato utilizzato un pacchetto di R Studio (2015) specifico per le forme che si chiama "Momocs" (Bonhomme et al., 2013).

Importare gli Outline

I dati di ingresso per l'analisi morfometrica degli outline sono, per le forme bidimensionali, una serie di coordinate cartesiane di pixel (x; y) campionate su ogni outline. Il pacchetto "Momocs" permette di convertire un insieme d'immagini .jpg in bianco e nero (Bonhomme et al., 2013).

Gli Outline, a questo punto, vengono inclusi in un oggetto di classe 'Coo' e possono essere visualizzati in un grafico. Prima dell'Analisi Ellittica di Fourier sono stati centrati, allineati e scalati. Infine, è stato stimato il numero di armoniche dopo aver esaminato lo spettro delle "harmonic power" di Fourier. La potenza è proporzionale all'ampiezza armonica e può essere considerata come una misura delle informazioni sulla forma. Incrementando le armoniche, la potenza diminuisce e aggiunge sempre meno informazioni. Siamo in grado di

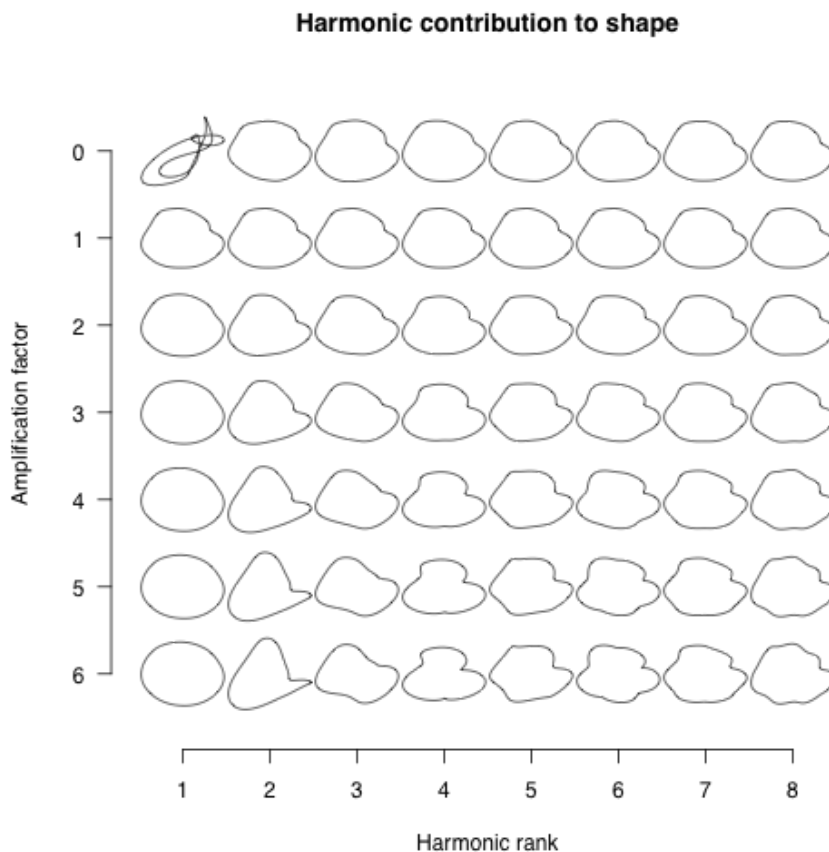
valutare il numero di armoniche che dobbiamo selezionare, quando la loro potenza cumulativa raccoglie il 99% della potenza cumulativa totale. La potenza di una data armonica è calcolata come:

$$Power_n = \frac{A_n^2 + B_n^2 + C_n^2 + D_n^2}{2}$$

(Bonhomme et al., 2013).

Analisi Ellittica di Fourier

Una volta calcolato il numero di armoniche che descrivono la forma si può passare all'Analisi Ellittica di Fourier, nella quale sono stati estratti tutti i coefficienti armonici. Ogni coefficiente armonico dà un contributo nella definizione della forma finale dell'otolite. Quindi prima di passare all'analisi multivariata è interessante vedere come contribuiscono i coefficienti armonici e quale variazione geometrica rappresentano (Figura 31)



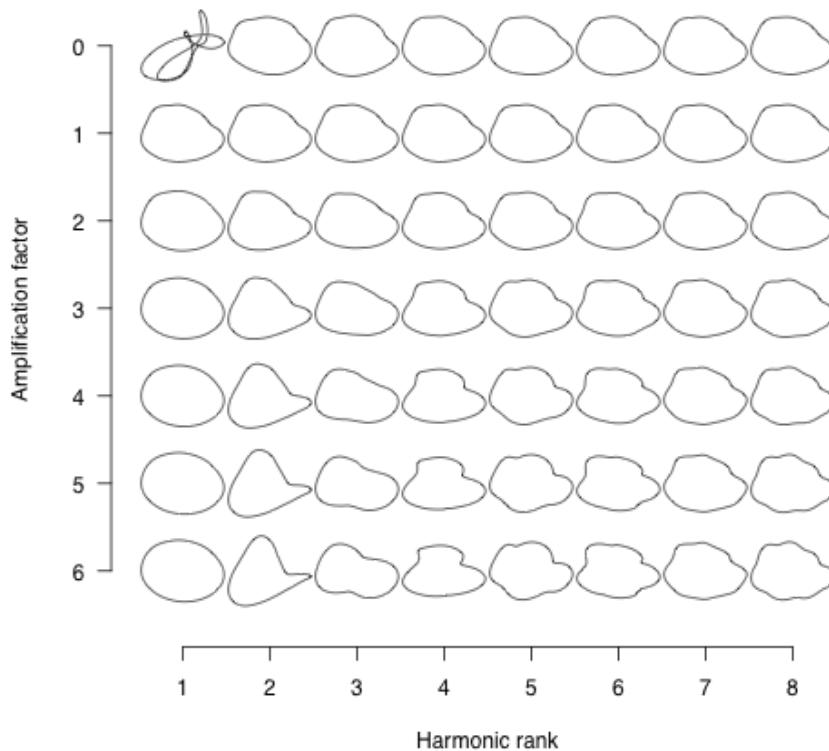


Figura 31: La figura mostra l'effetto di ogni armonica sulla ricostruzione della forma degli otoliti di *M. barbatus* (sopra) e *M. surmuletus* (sotto). Ogni armonica è rappresentata sull'asse x; quindi i coefficienti corrispondenti sono moltiplicati per i valori sull'asse y che sono fattori di amplificazione. Sono mostrate le forme corrispondenti alla loro rimozione (0), le forme normali (1) o l'effetto amplificato nella ricostruzione della forma (2 o superiore). Quando la prima armonica viene rimossa, la forma ricostruita è ovviamente molto brutta. Amplificare i coefficienti aiuta a comprendere il loro contributo alla forma finale, ad esempio, la seconda armonica moltiplicata 6 volte indica che contribuisce a descrivere la curvatura tra il rostro e l'antirostro.

Sui coefficienti armonici è stata fatta l'Analisi delle Componenti Principali (PCA). L'Analisi delle Componenti Principali (PCA) è stata introdotta da Pearson (Pearson, 1901) come uno strumento matematico che trasforma i dati linearmente correlati in variabili non correlate chiamati componenti principali. La PCA è ampiamente utilizzata nella ricerca per l'analisi della forma degli otoliti, in particolare per l'identificazione degli stock dagli otoliti. Di solito, la PCA è applicata sui coefficienti di Fourier al fine di valutare le differenze di forma negli otoliti. La PCA può essere applicata anche su variabili morfometriche, sul contorno di un'immagine bidimensionale a bassa risoluzione o per uniformare l'orientamento del bordo degli otoliti (Benzinou, 2013). Le PCA sono state plottate in dei grafici nei quali la nuvola di punti, che rappresentano le singole forme degli otoliti, si distribuiva in un morfospazio creato con delle forme medie fittizie, per cui ogni punto si colloca il più vicino possibile a quella data forma che più lo rappresenta. Per testare le differenze tra le varie forme si è fatta l'analisi multivariata della varianza (MANOVA), con ogni coefficiente armonico considerato come una variabile.

RISULTATI

MORFOMETRIA CLASSICA

Mullus barbatus

	FACE	FACE - SESSO	FACE - CLASSE DI TAGLIA	FACE - 100 - 180 mm	FACE-SESSO-100-180 mm
AREA			(32/66)		
PERIMETRO					
FERET					
MINFERET			(32/66)		
AR	(2/6)		(37/66)	(1/6)	(2/66)
CIRC			(48/66)		
ROUND	(2/6)		(35/66)	(2/6)	(2/66)
SOLIDITY		(6/120)	(42/66)		

Tabella 1: Schema riassuntivo dei risultati delle analisi sulla morfometria classica di *Mullus barbatus*. Le celle rosse indicano che i risultati sono tutti non significativi ($p\text{-value} > 0.05$) mentre in verde sono significativi ($p\text{-value} < 0.05$) e tra parentesi è riportato il numero dei confronti che risultano significativi rispetto al totale dei confronti.

Nella Tabella 1 sono riportati tutti i risultati dei confronti fatti per la specie di *Mullus barbatus*. I risultati sugli indici di forma mostrano che ci sono differenze significative nell'Aspect Ratio (AR) in tutti i confronti tranne che nei confronti tra le facce per ogni sesso. In quest'ultimo confronto solo la Solidità risulta significativa, mentre per quanto riguarda il confronto delle facce per ogni classe di taglia i parametri Area, MinFeret, AR, Circolarità, Rotondità e Solidità risultano molto significativi. Nelle Figure 32 e 33 sono riportati i confronti tra l'Area del buco, che si forma dall'unione del rostro e l'antirostro, con il Feret e la Taglia. È riportata anche la retta di regressione lineare e i punti sono colorati diversamente in base alla classe di taglia.

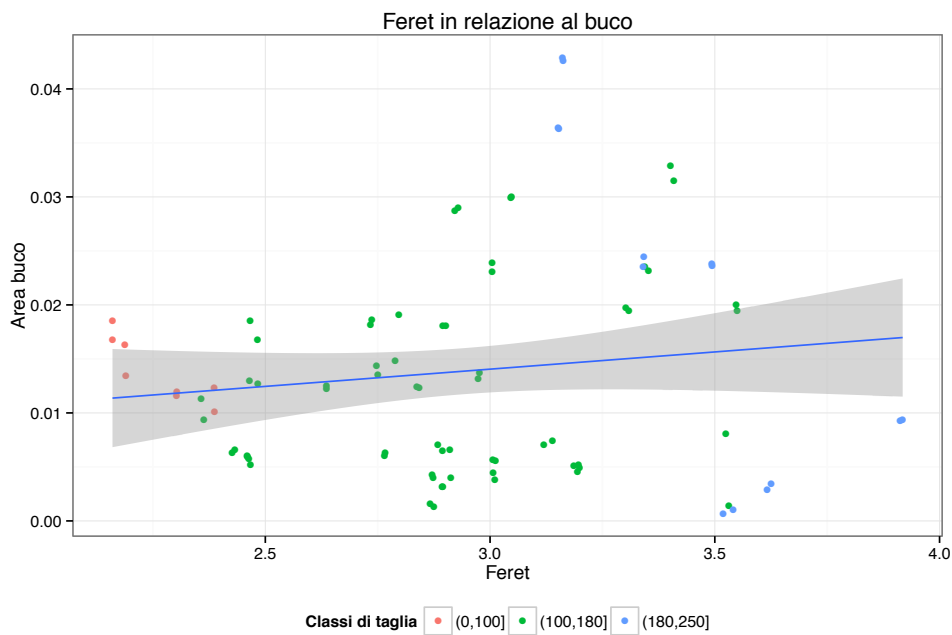


Figura 32: Rapporto tra Area del buco e Feret con retta di regressione. I punti sono colorati in base alla classe di taglia.

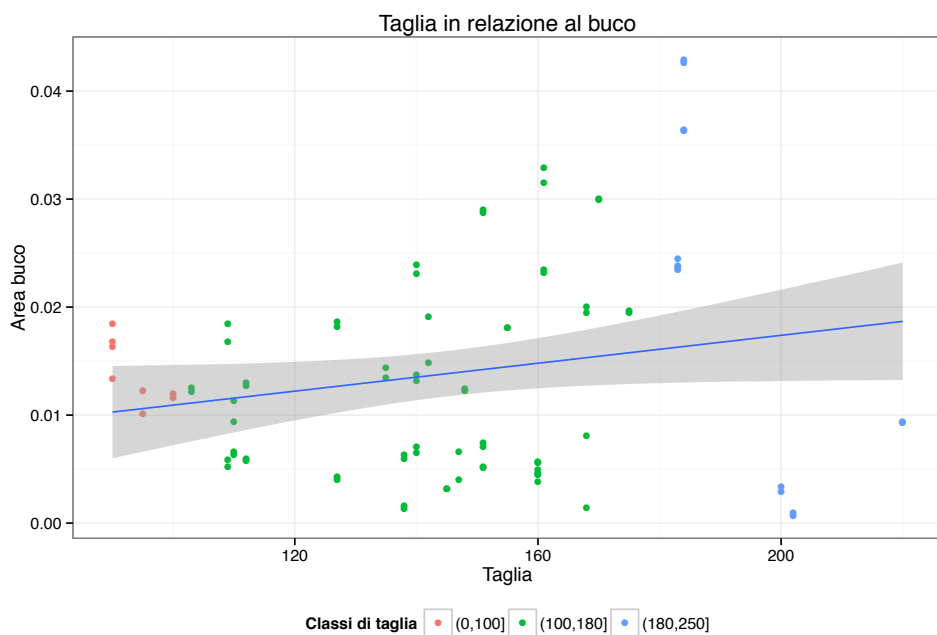


Figura 33: Rapporto tra Area del buco e Taglia con retta di regressione. I punti sono colorati in base alla classe di taglia.

Mullus surmuletus

Nella Tabella 2 sono riportati tutti i risultati dell'analisi di morfometria classica fatta sugli otoliti di *Mullus surmuletus*. Tutti i confronti non sono significativi tranne per il Perimetro quando si confrontano le facce con il sesso. A differenza dei *Mullus barbatus* qui non sono stati fatti i confronti all'interno di una singola classe di taglia.

	FACE	FACE – SESSO	FACE – CLASSE DI TAGLIA
AREA			
PERIMETRO		(8/66)	
FERET			
MINFERET			
AR			
CIRC			
ROUND			
SOLIDITY			

Tabella 2: Schema riassuntivo dei risultati delle analisi sulla morfometria classica di *Mullus surmuletus*. Le celle rosse indicano che i risultati sono tutti non significativi ($p\text{-value} > 0.05$) mentre in verde sono significativi ($p\text{-value} < 0.05$) e tra parentesi è riportato il numero dei confronti che risultano significativi rispetto al totale dei confronti.

Anche per questa specie l'Area del buco è stata rapportata al Feret e alla Taglia come è riportato nelle Figure 34 e 35.

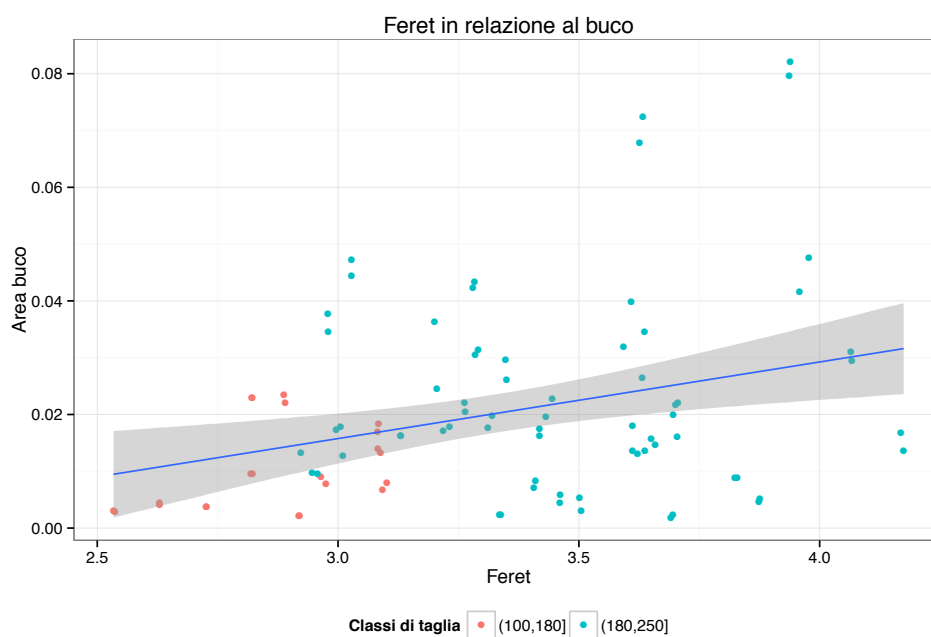


Figura 34: Rapporto tra Area del buco e Feret con retta di regressione. I punti sono colorati in base alla classe di taglia.

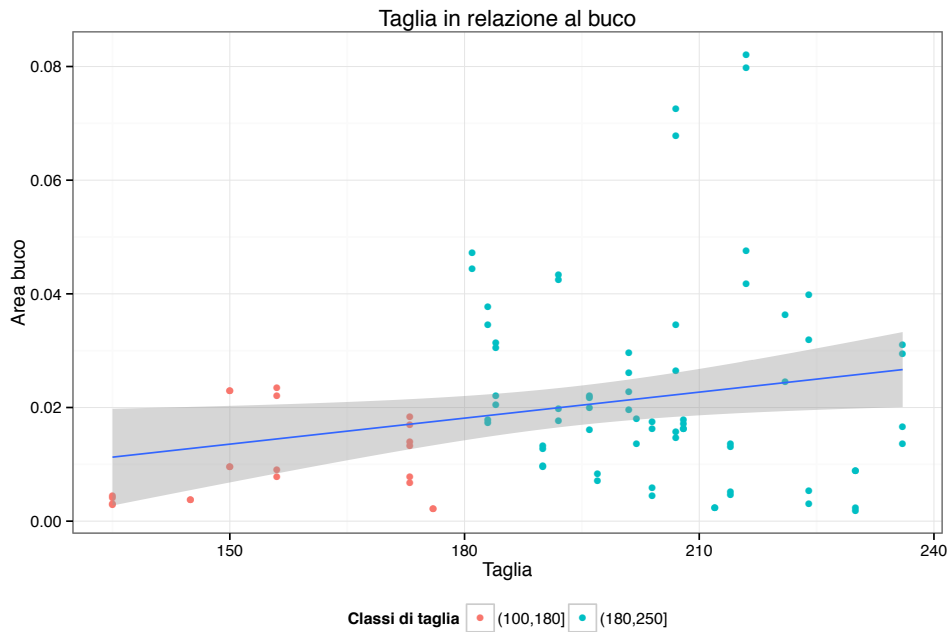


Figura 35: Rapporto tra Area del buco e Taglia con retta di regressione. I punti sono colorati in base alla classe di taglia.

EFA

Per prima cosa su tutte e due le specie è stata calcolata la potenza armonica per vedere quante armoniche descrivono la forma dell'otolite (Figura 36).

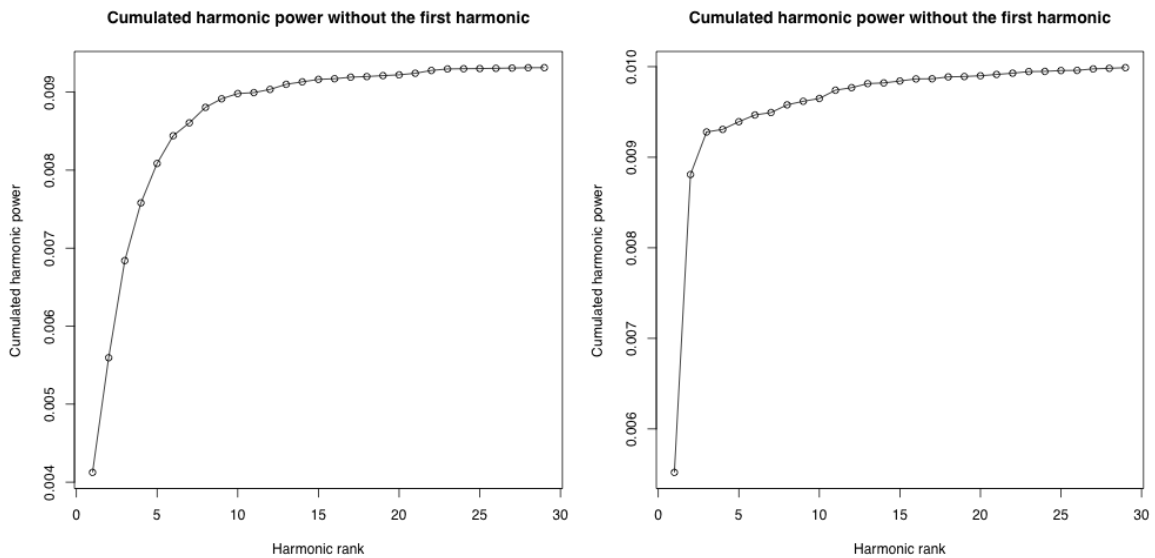


Figura 36: Test per verificare quante armoniche descrivono la forma dell'otolite di *Mullus barbatus* (sinistra) e *Mullus surmuletus* (destra).

Si è deciso di considerare 25 armoniche per *M. surmuletus* mentre 20 armoniche per *M. barbatus* per il calcolo dell'Elliptic Fourier Analysis. In Figura 37 e 38 sono riportati i confronti delle forme medie delle facce in *M. barbatus* mentre in Figura 39 e 40 sono riportate quelle di *M. surmuletus*. In Figura 41 invece è riportato il confronto tra le forme medie delle due specie.

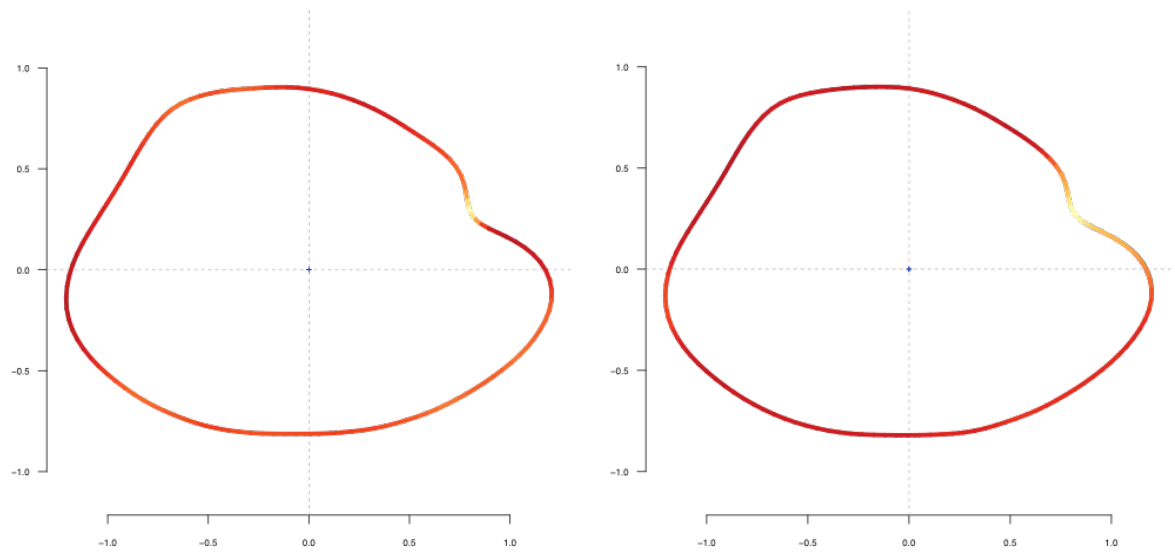


Figura 37: Confronti tra le forme medie degli otoliti di *M. barbatus*. Tra l1 – r1 (sinistra) e l2 – r2 (destra). La parte rossa indica una maggiore differenza.

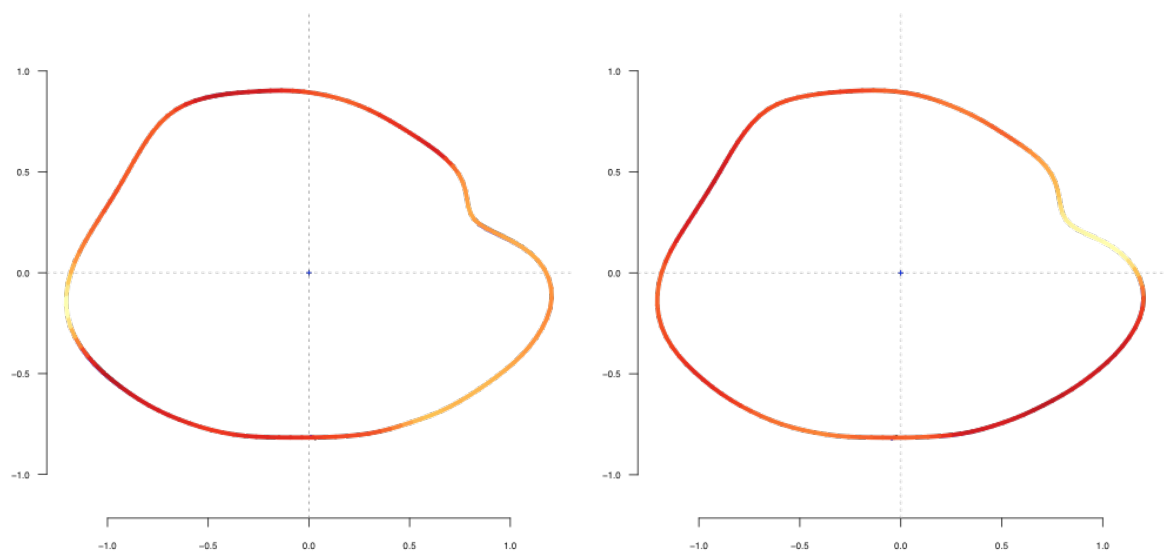


Figura 38: Confronti tra le forme medie degli otoliti di *M. barbatus*. Tra l2 – r1 (sinistra) e l1 – r2 (destra). La parte rossa indica una maggiore differenza.

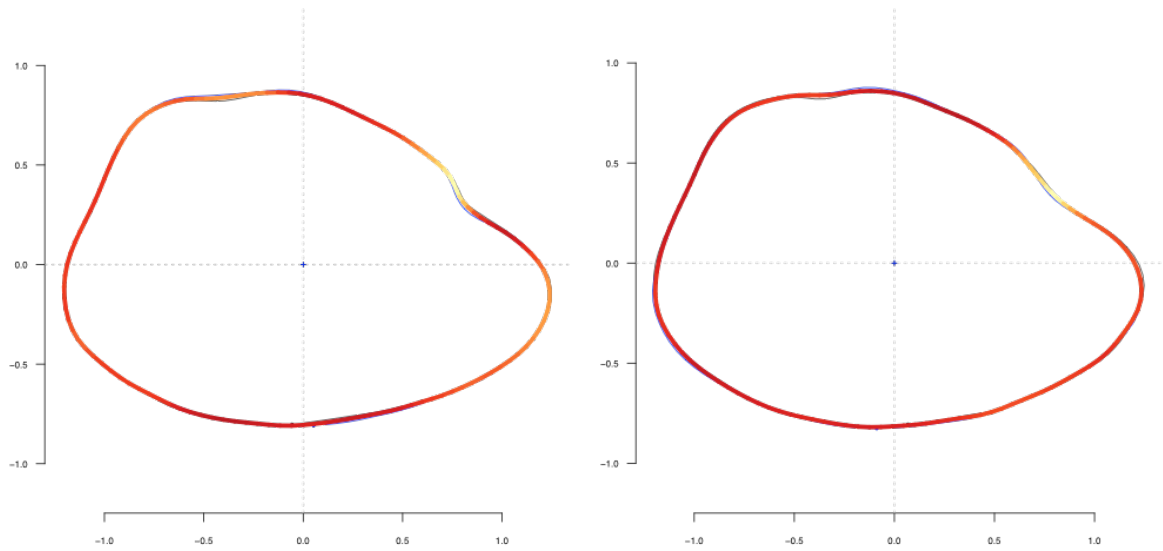


Figura 39: Confronti tra le forme medie degli otoliti di *M. surmuletus*. Tra l1 – r1 (sinistra) e l2 – r2 (destra). La parte rossa indica una maggiore differenza.

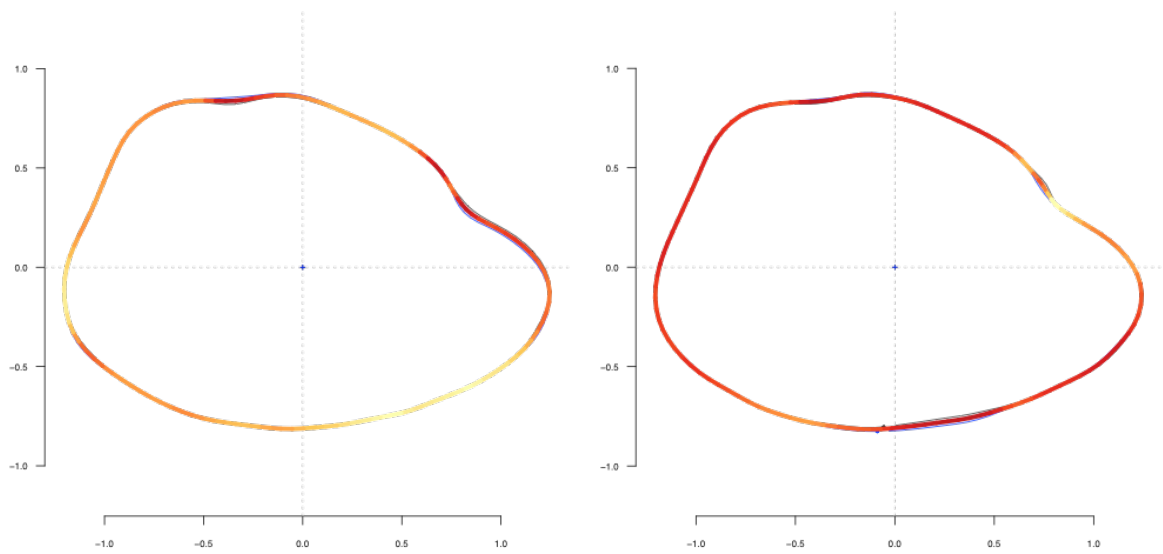


Figura 40: Confronti tra le forme medie degli otoliti di *M. surmuletus*. Tra l2 – r1 (sinistra) e l1 – r2 (destra). La parte rossa indica una maggiore differenza.

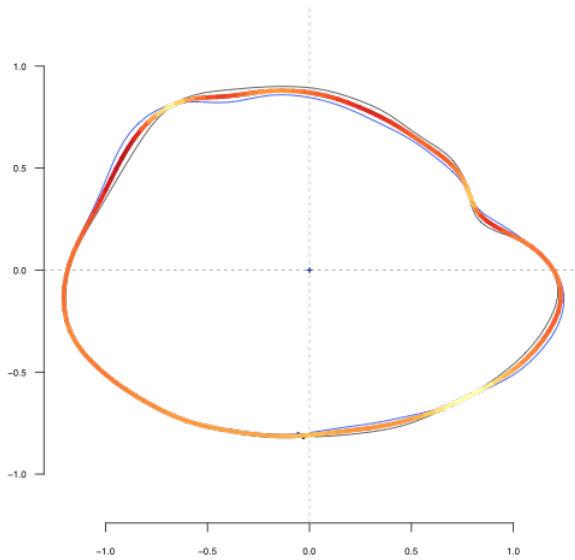


Figura 41: Confronto tra le forme medie delle due specie di triglia. La linea blu appartiene a *M. surmuletus* mentre la linea nera a *M. barbatus*. La parte rossa indica, dove ci sono differenze maggiori mentre la parte più chiara dove le linee si sovrappongono.

Di seguito sono riportate le varie PCA fatte sui coefficienti armonici. In ogni Figura è possibile vedere il contributo espresso in percentuale delle prime due Componenti Principali (PC), il morfospazio e il baricentro dei punti con l'ellissi che esprime il livello di confidenza al 95%. Per le PCA di *M. barbatus* data la grande quantità di dati i singoli punti non sono stati riportati.

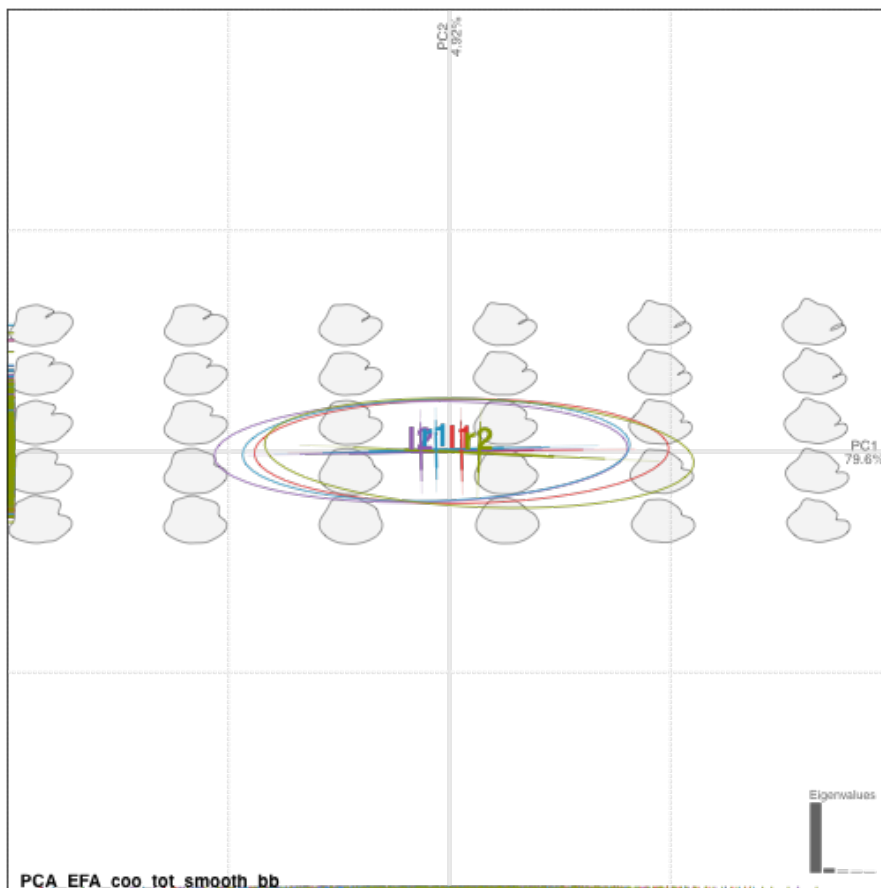


Figura 42: PCA sul confronto delle facce in *M. barbatus*

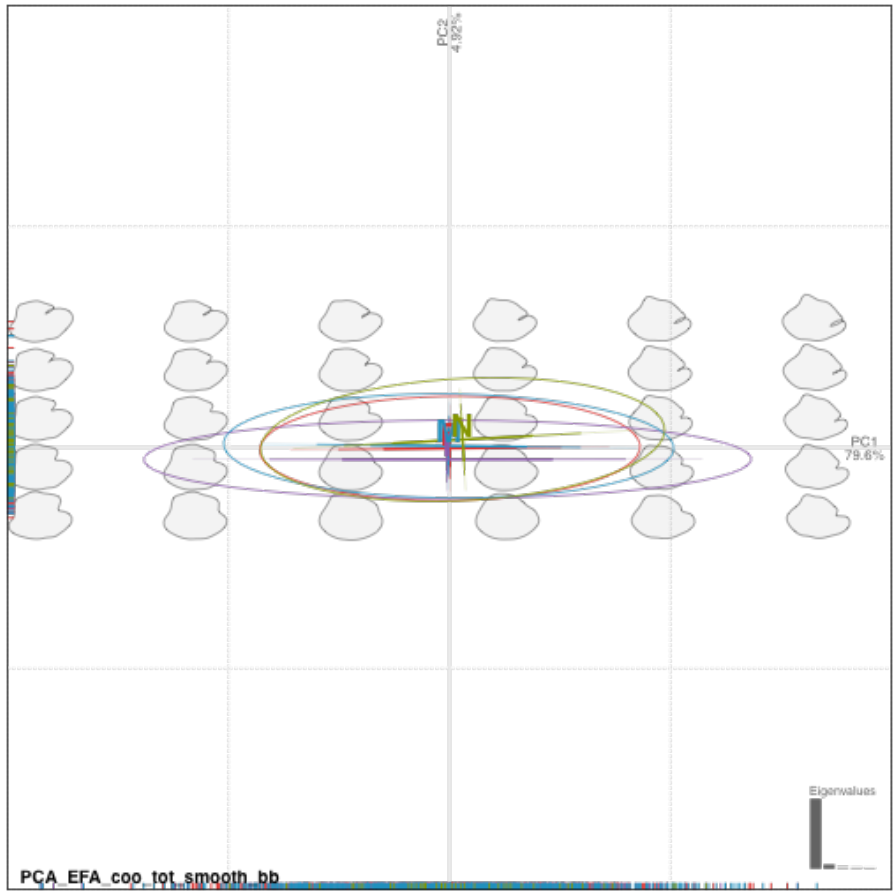


Figura 43: PCA sul confronto del sesso in *M. barbatus*

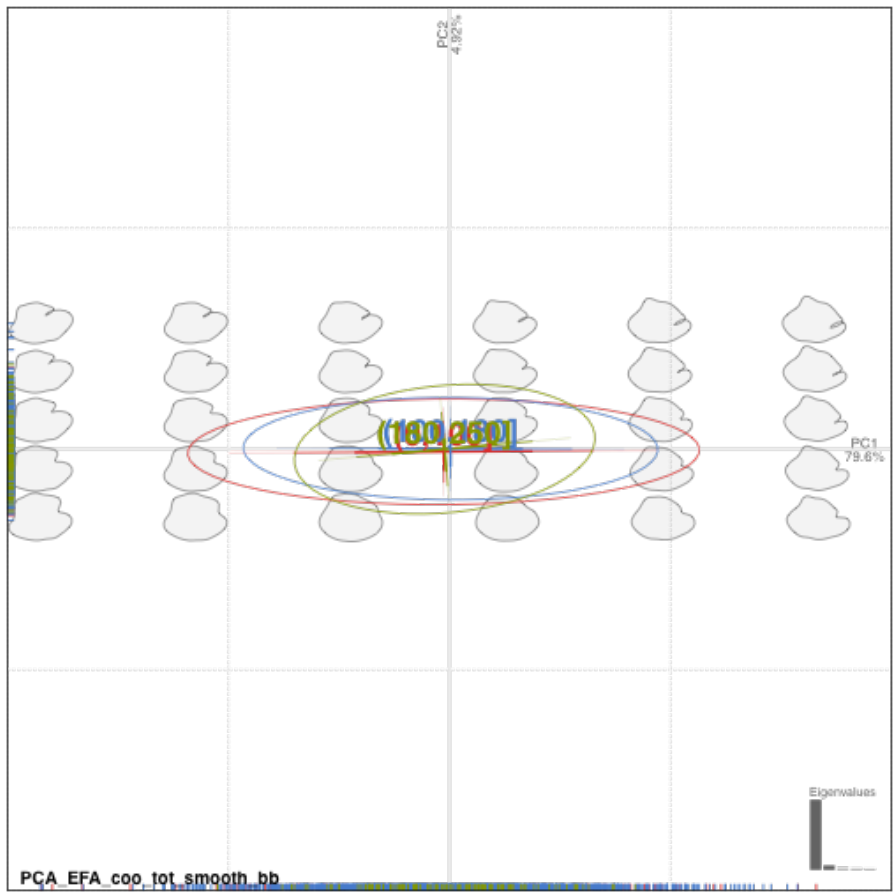


Figura 44: PCA sul confronto delle classi di taglia in *M. barbatus*

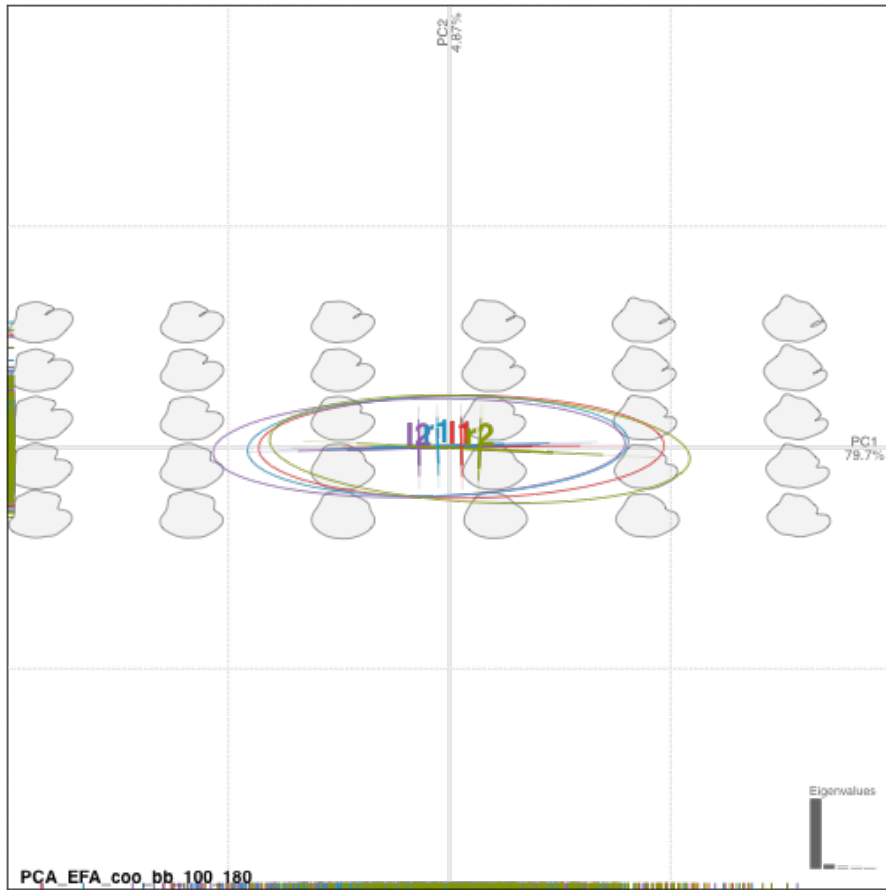


Figura 45: PCA sul confronto delle facce all'interno della classe di taglia (100 – 180 mm) in *M. barbatus*

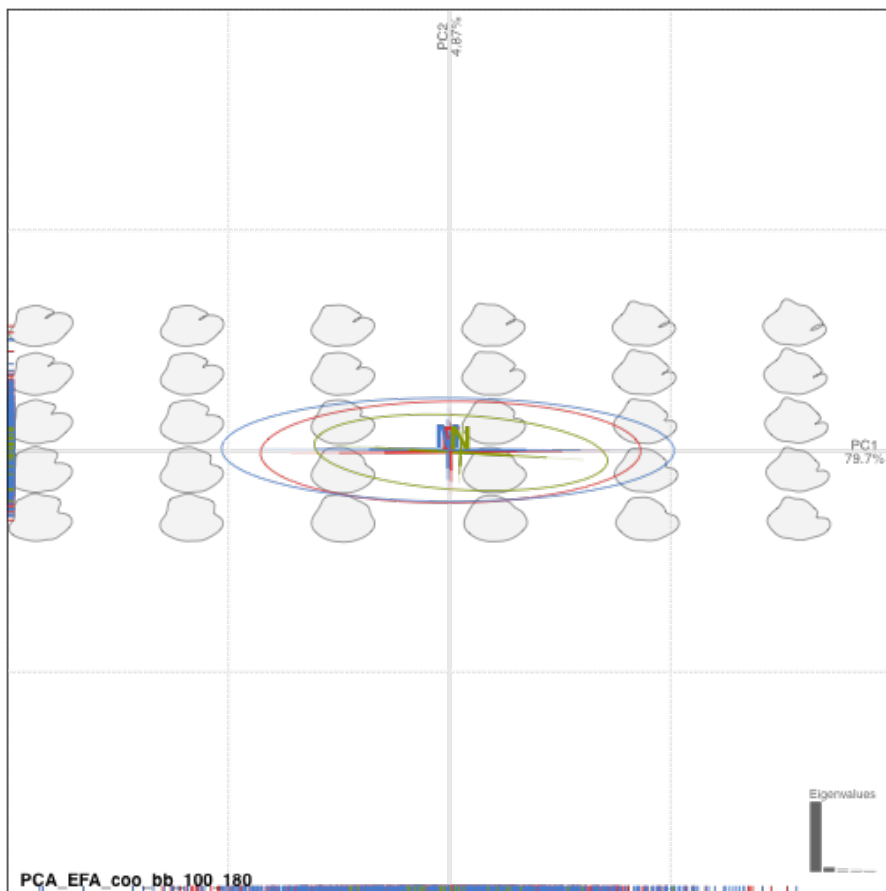


Figura 46: PCA sul confronto del sesso all'interno della classe di taglia (100 – 180 mm) in *M. barbatus*

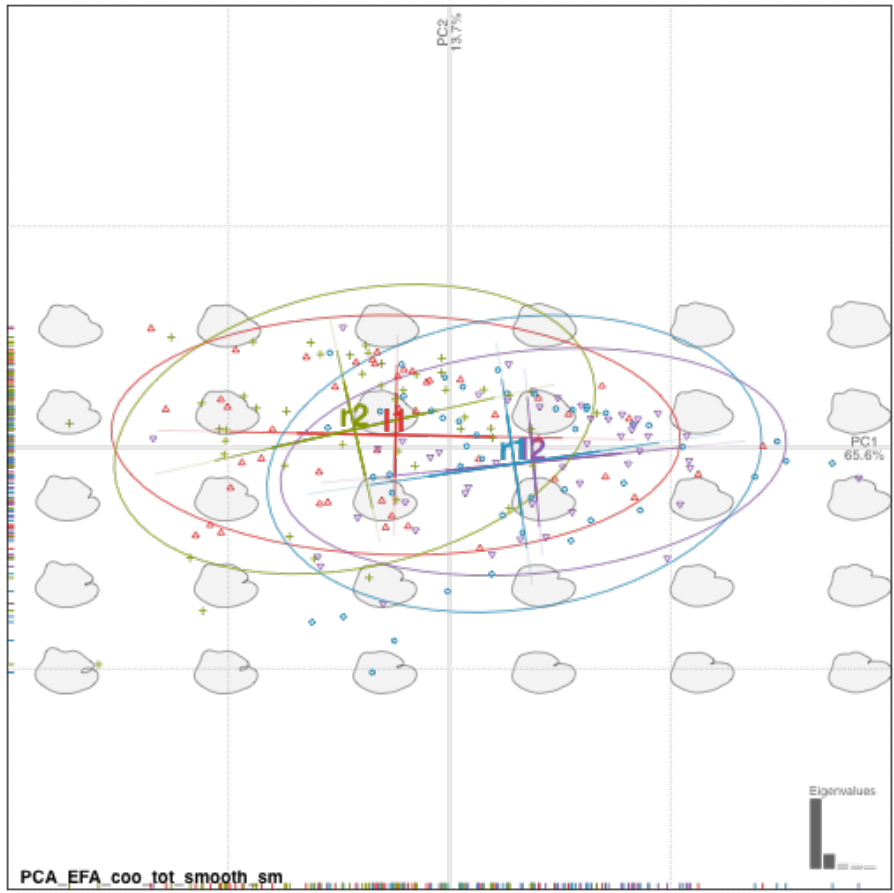


Figura 47: PCA sul confronto delle facce in *M. surmuletus*

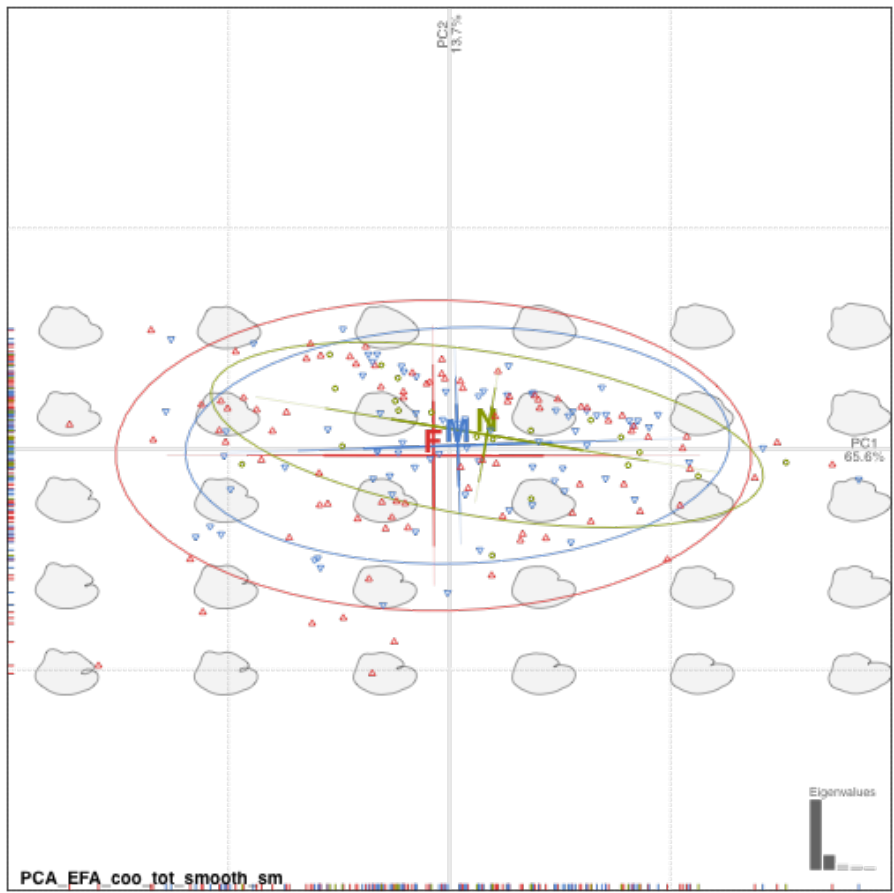


Figura 48: PCA sul confronto del sesso in *M. surmuletus*

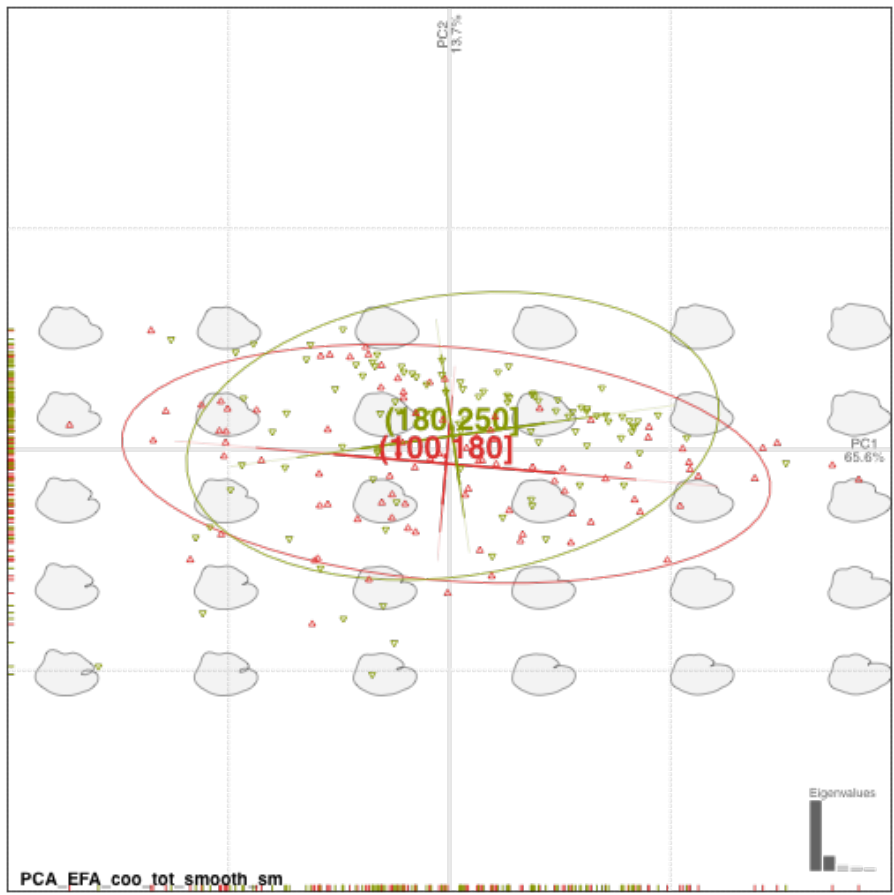


Figura 49: PCA sul confronto delle classi di taglia in *M. surmuletus*

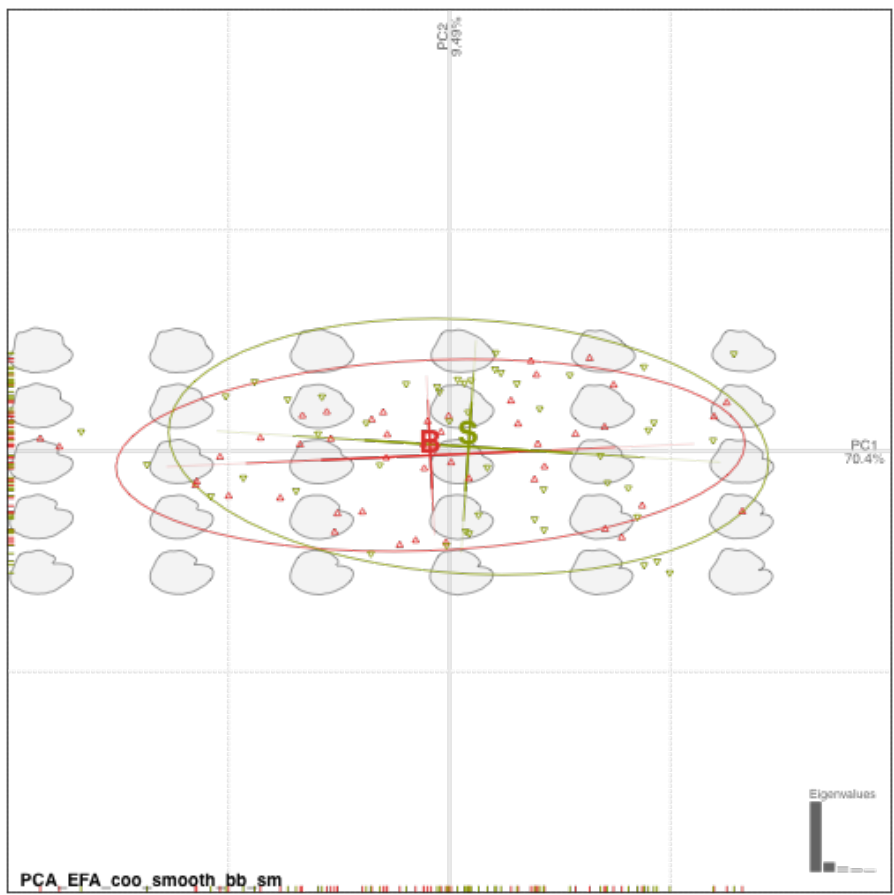


Figura 50: PCA sul confronto delle forme degli otoliti (I1) delle due specie di *Mullus*

Nella Tabella 3 sono mostrate tutte le MANOVA fatte sulle PCA dell'EFA per tutte e due le specie. Nella Tabella 4 sono mostrati i risultati della MANOVA fatta solo per i campioni di *M. barbatus* all'interno della classe di taglia (100 – 180 mm). Mentre nella Tabella 5 è mostrato il risultato della MANOVA fatta sulla PCA del confronto della singola faccia I1 delle due specie.

	FACE	SESSO	CLASSE DI TAGLIA	FACE – SESSO	FACE – CLASSE DI TAGLIA
<i>Mullus barbatus</i>	***	***	***	***	***
<i>Mullus surmuletus</i>	***	***	***	***	***

Tabella 3: Sono mostrati tutti i risultati delle MANOVA fatte sulle PCA dell'EFA per le due specie di triglia. Le celle verdi mostrano che i risultati sono tutti significativi con un p-value < 0.05 e le stelline indicano il livello di significatività Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1.

	FACE – SESSO – 100 – 180 mm	FACE – CLASSE DI TAGLIA – 100 – 180 mm
<i>Mullus barbatus</i>	***	***

Tabella 4: Sono mostrati tutti i risultati delle MANOVA fatte sulle PCA dell'EFA per la specie *M. barbatus* all'interno della classe di taglia (100 – 180). Le celle verdi mostrano che i risultati sono tutti significativi con un p-value < 0.05 e le stelline indicano il livello di significatività Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1.

	FACE I1
<i>Mullus barbatus</i> e <i>Mullus surmuletus</i>	***

Tabella 5: Risultato della MANOVA fatta sulle PCA nel confronto delle facce I1 delle due specie di *Mullus*.

DISCUSSIONI

MORFOMETRIA CLASSICA

Mullus barbatus

Dalle analisi fatte (Tabella 1) è possibile notare due aspetti principali. Il primo è che l'Aspect Ratio (AR) e la Rotondità che è il suo inverso, risultano significativi nel confronto tra le facce, nel confronto tra le classi di taglia e all'interno della singola classe 100 – 180 mm, in particolare il confronto tra $r2 - 11$ ed $r2 - 12$, però non risultano differenze significative nel confronto tra le facce e il sesso. All'interno della stessa classe di taglia le differenze significative si avevano nel confronto tra $r2M$ con le facce $11F$ e $12F$. Il secondo aspetto che viene fuori è che la maggior parte delle differenze significative si riscontrano nei confronti tra le facce e le classi di taglia come ci si sarebbe potuto aspettare. Questo secondo aspetto può essere spiegato dal fatto che, se si prendono otoliti d'individui giovani e si confrontano con otoliti d'individui più grandi ci sono delle differenze per via della normale crescita dell'otolite che, assume una forma differente. È possibile dire che sia per l'Area che per il MinFerret le maggiori differenze si riscontrano nel confronto tra le classi di taglia (0 – 100 mm; 100 – 180 mm) e (180 – 250 mm). Questi due indici erano fortemente correlati con la taglia, ma prima di fare le analisi sono stati normalizzati a una taglia media: è possibile quindi che la forma degli otoliti cambi durante l'ontogenesi indipendentemente dalla taglia degli individui. Un'altra spiegazione può essere data dal fatto che nella normale crescita dell'otolite è stata riscontrata la tendenza all'unione del rostro con l'antirostro e quindi alla formazione di un buco all'interno che, nel calcolo dell'Area non veniva considerato sottostimando tale indice morfometrico. Inoltre dal rapporto tra l'Area del buco con il Feret e la Taglia (Figura 32 e 33) si può notare come si raggiunge un picco della superficie dell'Area del buco nella classe di taglia 180 – 250 mm per poi diminuire drasticamente. Si potrebbe ipotizzare che a seguito dell'unione del rostro con l'antirostro, e quindi alla formazione del buco all'interno della superficie dell'otolite, indipendentemente dal Feret e dalla Taglia la tendenza sembra essere quella di chiudere il buco. Per il MinFerret invece si potrebbe ipotizzare che la tendenza dell'otolite è quella di passare da una forma tondeggiante ad una un po' più allungata. Un altro aspetto particolarmente interessante riguarda sia la Circolarità che la Solidità, dove tutti i confronti tra le diverse classi di taglia sono significativi, mentre all'interno della stessa classe di taglia non si notano differenze. Questo dato conferma che l'otolite man mano che cresce assume una forma diversa, avvalorando il fatto che può esserci un cambio di forma da più tondeggiante a più allungata. Sia nell'Aspect Ratio (AR) che nella Rotondità si riscontrano maggiori differenze anche tra le classi (0 – 100

mm) e (100 – 180 mm). In generale ritengo che dalle analisi della morfometria classica non emergano particolari differenze tra l'otolite destro e l'otolite sinistro degli esemplari dello stesso sesso avvalorando quindi la condizione di simmetria.

Mullus surmuletus

Quello che si può vedere chiaramente nella Tabella 2 è che tutti i confronti fatti risultano non significativi tranne nel caso dei confronti tra le facce per sesso prendendo come fattore il perimetro e solo 8 confronti su 66, in particolare nel confronto tra gli N con gli M (che però può essere spiegato come una singola anomalia). Sicuramente un aspetto importante da tener presente è che si avevano a disposizione pochi esemplari (47) e nessun individuo giovane con taglia minore ai 100 mm. A differenza degli otoliti di *Mullus barbatus* si può comunque valutare che non vi siano differenze negli indici di forma presi in considerazione tra le classi di taglia (100 – 180 mm) e (180 – 250 mm). Questo dato potrebbe indicare che la forma dell'otolite di *M. surmuletus* si mantenga pressoché costante non subendo particolari variazioni con l'accrescersi della taglia dell'animale. Anche per questa specie vale la simmetria tra l'otolite destro e sinistro all'interno dello stesso sesso. Dal confronto tra l'Area del buco con il Feret e la Taglia (Figura 34 e 35) anche per *M. surmuletus* si può ipotizzare che la tendenza sembra essere quella di chiudere il buco che si forma tra il rostro e l'antirostro.

EFA

Mullus barbatus

Considerando le forme medie degli otoliti destri e sinistri (r e l) nel confronto tra le facce interne ed esterne (1 e 2), si vede come le facce interne (l1 e r1) e le facce esterne (l2 e r2) (Figura 37) siano abbastanza diverse tra loro rispetto al confronto tra faccia interna e faccia esterna destra e sinistra (l1 – r2 e l2 – r1) (Figura 38). Questo dato è supportato dalla PCA fatta sui confronti delle facce (Figura 42) dove si può vedere come il baricentro dei punti l1 sia più vicino a r2 e quelli di l2 a r1. La PC1 spiega il 79.6 % della variabilità che sembra essere data dall'orientamento dell'otolite infatti si vede nel morfospazio come l'asse rostro – postrosto vada cambiando l'orientamento. La PC2 invece spiega il 4.92 % della variazione e in particolare si vede come questa sia dovuta dalla presenza della curvatura tra il rostro e l'antirostro. Negli altri due confronti tra i sessi e tra le classi di taglia (Figura 43 e 44) il discorso è simile e si nota anche come graficamente i baricentri siano molto vicini o anche

sovrapposti. All'interno della classe di taglia (100 – 180 mm) (Figura 45 e 46) la tendenza è praticamente la stessa cambia di poco la percentuale della variazione della PC1 che è del 79.7 % e della PC2 che è 4.87 %. Per quello che riguarda i risultati della MANOVA (Tabella 3) indicano che ci sono differenze estremamente significative in tutti i confronti fatti sia tra tutte le facce che anche quelle all'interno di una sola classe di taglia (100 – 180 mm) (Tabella 4). Questi risultati vanno in controtendenza rispetto a quello che ci saremmo potuti aspettare indicando che non c'è una simmetria tra l'otolite destro e quello sinistro. Dai risultati delle PCA però si può dire che non vi siano chiare separazioni delle forme a sostegno del fatto che gli esemplari appartengono tutti allo stesso stock.

Un aspetto da considerare è anche il fatto che prima delle analisi si è deciso di “flippare” tutte le immagini in modo da avere il rostro a destra per tutte le facce. Per l'acquisizione il rostro delle facce r1 e l2 si trovava a sinistra mentre per le facce r2 e l1 si trovava a destra (Figura 26 e 27). È possibile che i risultati della PCA siano dovuti a un discorso di metodo di acquisizione: diversa esposizione e/o inclinazione alla luce incidente, diverso orientamento generale dell'otolite sul supporto di ripresa amplificato forse dalla spinta idrostatica dovuta alla ripresa in immersione. L'EFA è sicuramente uno strumento molto potente per vedere le forme degli otoliti e quindi anche i dettagli vengono accentuati ed è probabile che questo poi risulti in una eccessiva ricerca del dettaglio e che quindi inevitabilmente darà delle differenze. Le differenze tra l'otolite destro e sinistro possono esser dovute alla normale crescita e formazione, ma è in generale apprezzabile una forma media che sia uguale per tutti (non si dovrebbe dare per scontato che l'otolite destro e sinistro siano speculari o simmetrici).

Mullus surmuletus

Per *Mullus surmuletus* la tendenza sembra essere la stessa descritta prima per *M. barbatus*, infatti, nel confronto con le forme medie si vede come la faccia interna sinistra (l1) e la faccia esterna destra (r2), come anche il reciproco, siano più simili delle due facce esterne ed interne a confronto (l2 – r2 e l1 – r1) (Figura 39 e 40). Questo dato trova riscontro nella PCA (Figura 47), dove si vede chiaramente una vicinanza dei baricentri l1 – r2 e l2 – r1. La PC1 spiega il 65.6 % della variazione mentre la PC2 il 13.7 % e come per *M. barbatus* la prima componente principale sembra essere correlata alla rotazione dell'otolite con la direzione rostro – postrosto che va ruotando, mentre la seconda componente principale è correlata alla curvatura tra il rostro e l'antirosto. Nei confronti tra i sessi e le due classi di taglia (Figura 48 e 49) si vede una maggiore separazione probabilmente perché i campioni essendo di

meno hanno una maggiore variabilità. Anche in questo caso comunque non ritengo che possa esserci una chiara separazione delle forme da poter dire che appartengono a stock differenti. Anche in questo caso per tutti i confronti fatti, la MANOVA ha dato livelli di significatività molto elevati (Tabella 3). Per *M. surmuletus* valgono le considerazioni fatte prima per *M. barbatus*. Le difficoltà nell'acquisizione per avere un'immagine perfetta, e soprattutto la potenza del test statistico e dell'analisi EFA che vanno a focalizzarsi sui minimi dettagli.

CONFRONTO TRA SPECIE

Dal confronto tra le due specie si vede come effettivamente le due forme medie degli otoliti siano differenti con l'otolite di *M. surmuletus* che è più allungato nell'asse rostro – postrostro e più stretto sull'asse verticale rispetto a *M. barbatus* (Figura 41). Dalla PCA si vede come i baricentri siano separati ma che i punti si distribuiscono uniformemente nel morfospazio (Figura 50). La PC1 spiega il 70.4 % della variabilità che riguarda sempre l'orientamento dell'asse rostro – postrostro mentre la PC2 il 9.49 % sempre per ciò che riguarda la curvatura tra il rostro e l'antirostro. La MANOVA sulla PCA (Tabella 5) indica sempre differenze molto significative. Per questo confronto è stata presa in considerazione solo la faccia II perché era interessante vedere proprio la differenza tra le due forme in generale, che hanno una struttura di base simile ma che si differenziano soprattutto nella forma più allungata di *M. surmuletus* e più tondeggianti di *M. barbatus*.

CONCLUSIONE

In conclusione si può dire che l'analisi di morfometria classica ha dato dei risultati congrui con quello che ci si aspettava. Per *M. barbatus* si è visto come la forma degli otoliti degli individui più piccoli ai più grandi cambia in funzione dei parametri quali: Area, MinFerret, AR, Circolarità, Rotondità e Solidità. In generale per tutte e due le specie di *Mullus* possiamo dire che per gli indici di forma considerati vi sia una simmetria tra l'otolite destro e sinistro. I risultati dell'analisi EFA invece hanno evidenziato delle differenze significative che dimostrano una superiore potenza discriminante nei confronti dell'analisi di morfometria classica. La particolare sensibilità dell'analisi dei contorni impone un controllo di qualità rigoroso durante l'acquisizione delle forme per minimizzare il “bias” dovuto ad errori sistematici e/o casuali dell'operatore e delle attrezzature utilizzate, in particolare il posizionamento degli otoliti e la loro illuminazione. Questo studio pone le basi per un solido

protocollo di acquisizione e trattamento delle immagini che potrà essere applicato trasversalmente ad altre specie di interesse per la ricerca.

BIBLIOGRAFIA

Adams, D.C., Rohlf, F.J., Slice, D.E. (2004). Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Ital. J. Zool.*, 71: 5-16.

AdriaMed (2001). The Geographical Management Units of the Adriatic Sea. Paper presented at the GFCM-SAC Working Group on Management Units (Alicante, 23rd-25th January 2001). FAO-MiPAF Scientific Cooperation to Support Responsible Fisheries in the Adriatic Sea. GCP/RER/010/ITA/OP-02: 12 pp

Arneri, E., Jukić, S. (1986) Some preliminary observations on the biology and dynamics of *Mullus barbatus* in the Adriatic Sea. *FAO Fish. Rep.*, 345: 79-86 pp.

Bartlett, M. S. (1954). A note on the multiplying factors for various χ^2 approximations. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 296-298.

Benzinou, A., Carbini, S., Nasreddine, K., Elleboode, R., Mahé, K. (2013). Discriminating stocks of striped red mullet (*Mullus surmuletus*) in the Northwest European seas using three automatic shape classification methods. *Fisheries Research*, 143, 153-160.

Bertrand, J. A., De Sola, L. G., Papaconstantinou, C., Relini, G., Souplet, A. (1997). An international bottom trawl survey in the Mediterranean: the MEDITS programme. *ACTES DE COLLOQUES-IFREMER*, 76-96.

Bertrand, J. A., De Sola, L. G., Papaconstantinou, C., Relini, G., Souplet, A. (2002). The general specifications of the MEDITS surveys. *Scientia Marina*, 66(S2), 9-17.

Bombace, G., Lucchetti, A. (2011). *Elementi di biologia della pesca*. Edagricole, Milano (MI)

Bonhomme, V., Picq, S., Gaucherel, C., Claude, J. (2013). Momocs: outline analysis using R. *Journal of Statistical Software: InReview*.

- Cadrin, S.X. (2000). Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10: 91–112
- Campana, S.E., Casselman, J.M. (1993). Stock discrimination using otolith shape analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50: 1062–1083.
- Campana, S.E. (2004). *Photographic Atlas of Fish Otoliths of the Northwest Atlantic Ocean*. NRC Research Press, Ottawa, Ontario. 284 pp.
- Campbell, G., Skillings, J. H. (1985). Nonparametric stepwise multiple comparison procedures. *Journal of the American Statistical Association*, 80(392), 998-1003.
- Cardinale, M., Doering-Arjes, P., Kastowsky, M., Mosegaard, H. (2004). Effects of sex, stock, and environment on the shape of known-age Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 61(2), 158-167.
- Chérif, M., Ben Amor, M.M., Selmi, S., Gharbi, H., Missaoui, H., Capapé, C. (2011). Food and feeding habits of the red mullet, *Mullus barbatus* (Actinopterygii: Perciformes: Mullidae), off the northern Tunisian coast (central Mediterranean). *Acta Ichthyol. Piscat.* 41 (2): 109–116.
- Collins, T. J. (2007). ImageJ for microscopy. *Biotechniques*, 43(1 Suppl), 25-30.
- Duarte-Neto, P., Lessa, R., Stosic, B., and Morize, E. (2008). The use of sagittal otoliths in discriminating stocks of common dolphinfish (*Coryphaena hippurus*) off northeastern Brazil using multishape descriptors. – *ICES Journal of Marine Science*, 65: 1144–1152.
- Ferreira, T., Rasband, WS. (2010–2012). “ImageJ User Guide — IJ 1.46”, imagej.nih.gov/ij/docs/guide/.
- Ferson, S., Rohlf, F. J., Koehn, R. K. (1985). Measuring shape variation of two-dimensional outlines. *Systematic Zoology*, 59-68.

Gao, X., Alvo, M., Chen, J., Li, G. (2008). Nonparametric multiple comparison procedures for unbalanced one-way factorial designs. *Journal of Statistical Planning and Inference*, 138(8), 2574-2591.

Haidar, Z. (1970) L'oecologie du rouget (*Mullus barbatus* L.) en Adriatique orientale. *Acta Adriat.*, 14 (1): 1-94.

Haines, S.J., Crampton, J.S. (2000). Improvements to the method of Fourier shape analysis as applied in morphometric studies. *Palaeontology*, Vol. 43, Part 4, pp. 765 – 783.

Iwata, H., Niikura, S., Matsuura, S., Takano, Y., Ukai, Y. (1998). Evaluation of variation of root shape of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) based on image analysis using elliptic Fourier descriptors. *Euphytica*, 102(2), 143-149.

Iwata, H., Niikura, S., Matsuura, S., Takano, Y., Ukai, Y. (2000). Diallel analysis of root shape of Japanese radish (*Raphanus sativus* L.) based on elliptic Fourier descriptors. *Breeding science*, 50(2), 73-80.

Iwata, H., Nesumi, H., Ninomiya, S., Takano, Y., Ukai, Y. (2002). The Evaluation of Genotype x Environment Interactions of Citrus Leaf Morphology Using Image Analysis and Elliptic Fourier Descriptors. *Breeding science*, 52(4), 243-251.

Jardas, I. (1996) *Jadranska ihtiofauna. Školska knjiga, Zagreb*, 536 pp

Jukić, S. (1972) Ishrana oslića (*Merluccius merluccius*), bukve (*Boops boops*) trlje (*Mullus barbatus*) i arbuna (*Pagellus erythrinus*) u Kaštelanskom zaljevu. *Acta Adriat.*, 14 (4): 1-40

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(1), 95-104.

Jukić, S., Piccinetti, C. (1981) Quantitative and qualitative characteristics of demersal resources in the Adriatic sea with some population dynamic estimates. *FAO, Fish. Rep.*, 253: 73-91.

Kuhl, F. P., Giardina, C. R. (1982). Elliptic Fourier features of a closed contour. *Computer graphics and image processing*, 18(3), 236-258.

Konietschke, F., Placzek, M., Schaarschmidt, S., Hothorn, L.A. (2014). nparcomp: An R Software Package for Nonparametric Multiple Comparisons and Simultaneous Confidence Intervals. *Journal of Statistical Software*, 61(10), 1-17.

Labropoulou, M., Machias, A., Tsimenides, N., Eleftheriou, A. (1997). Feeding habits and ontogenetic diet shift of the striped red mullet, *Mullus surmuletus* Linnaeus, 1758. *Fisheries Research* 31: 257 – 267.

Leguá, J., Plaza, G., Pérez, D., Arkhipkin, A. (2013). Otolith shape analysis as a tool for stock identification of the southern blue whiting, *Micromesistius australis*. *Latin Am. J. Aquat. Res*, 41, 479-489.

Lleonart, J., Salat, J., Torres, S.J. (2000). Removing Allometric Effects of Body Size in Morphological Analysis. *J. theor. Biol.* 205, 85-93

Lombarte, A., Aguirre, H. (1997). Quantitative differences in the chemoreceptor systems in the barbels of two species of Mullidae (*Mullus surmuletus* and *Mullus barbatus*) with different bottom habitats. *Marine Ecology Progress Series*. 150: 57-64.

Lombarte, A., Lleonart, J. (1993). Otolith size changes related with body growth, habitat depth and temperature. *Environmental Biology of Fishes* 37, 297-306

Mahé, K., Bellail, R., Dufour, J. L., Boiron-Leroy, A., Diméet, J., Duhamel, E., Elleboode, R., Félix, J., Grellier, P., Huet, J., Labastie, J., Le Roy, D., Lizaud, O., Manten, M. L., Martin, S., Metral, L., Nédelec, D., Vérin, Y., Badts, V. (2009). Synthèse française des procédures d'estimation d'âge, French summary of age estimation procedures. Program SIDEPECHE Halieutics Information system Sclerochronology.

Mandado M., Vázquez, A. (2011). On otoliths sampling. NAFO SCR Doc. 11/023: 9pp

MEDITS-Handbook (2013). Version n. 7, MEDITS Working Group : 120 pp.

Mérigot, B., Letourneur, Y., Lecomte-Finiger, R. (2007). Characterization of local populations of the common sole *Solea solea* (Pisces, Soleidae) in the NW Mediterranean through otolith morphometrics and shape analysis. *Marine Biology*, 151(3), 997-1008.

Monti, L., Baylac, M., Lalanne-Cassou, B. (2001). Elliptic Fourier analysis of the form of genitalia in two *Spodoptera* species and their hybrids (Lepidoptera: Noctuidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 72(3), 391-400.

Oliveira, A.M., Farina, M., Ludka, I.P., Kachar, B. (1996). Vaterite, calcite and aragonite in the otoliths of three species of piranha. *Naturwissenschaften*, 83: 133–135.

Oxman D.S., Barnett-Johnson R., Smith M.E., Coffin A., Miller D.L., Josephson R., Popper A.N. (2007). The effect of vaterite deposition on sound reception, otolith morphology, and inner ear sensory epithelia in hatchery-reared Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64: 1469-1478.

Panfili, J., De Pontual, H., Troadec, H., Wrigh, P. J. (2002). *Manual of fish sclerochronology*.

Pearson, K. (1901). On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine* 2 (6), 559-572.

Piccinetti, C., Vrgoč, N., Marceta, B., Manfredi, C. (2012). Recent state of demersal resource in the Adriatic Sea. Institute of Oceanography and Fisheries, Split, Croatia, 220 pp

Popper, A.N., Fay, R.R. (1993). Sound detection and processing by fish: critical review and major research questions. *Brain Behavior and Evolution* 50, 13-221.

Popper, A.N., Lu, Z.M. (2000). Structure-function relationships in fish otolith organs. *Fisheries Research* 15-25.

Regolamento (CE) 1967/2006 del Consiglio del 21-12-2006, relativo alle misure di gestione per lo sfruttamento sostenibile delle risorse della pesca nel Mar Mediterraneo e recante modifica del regolamento (CEE) n. 2847/93 e che abroga il regolamento (CE) n. 1626/94. *Gazzetta Ufficiale Comintà Europea* n. L 409 del 30/12/2006 pp. 9 - 64

Reig-Bolaño, R., Marti-Puig, P., Lombarte, A., Soria, J. A., Parisi-Baradad, V. (2010). A new otolith image contour descriptor based on partial reflection. *Environmental biology of fishes*, 89(3-4), 579-590.

Relini, G., Bertrand, J., Zamboni, A. (1999) Synthesis of the knowledge on bottom fishery resources in Central Mediterranean (Italy and Corsica). *Biol. Mar. Medit.*, 6 (suppl. 1).

Relini G., Carpentieri, P., Murenu, M. (2008). Manuale di Istruzioni MEDITS (MEDITS Instruction Manual). *Biol. Mar. Medit.*, 15 (suppl. 2): 1-78.

Rohlf, F. J., Archie, J. W. (1984). A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Systematic Biology*, 33(3), 302-317.

RStudio. (2015). RStudio: Integrated development environment for R. Accessed from <http://www.rstudio.org/> on 1May15. Computer software.

Shapiro, S. S., Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 591-611.

Sheffield, J. B. (2007). ImageJ, a useful tool for biological image processing and analysis. *Microscopy and Microanalysis*, 13(S02), 200-201.

Sonin, O., Spanier, E., Levi, D., Patti, B., Rizzo, P., Andreoli, M.G. (2007). Nanism (dwarfism) in fish: a comparison between red mullet *Mullus barbatus* from the southeastern and the central Mediterranean. *Marine Ecology Progress Series* 343: 221-228

Stevenson, K. D., Campana, S. E. (1992). Otolith Microstructure Examination and Analysis. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 117: 126 p.

Tracey, S. R., Lyle, J. M., Duhamel, G. (2006). Application of elliptical Fourier analysis of otolith form as a tool for stock identification. *Fisheries Research*, 77(2), 138-147.

Tserpes, G., Fiorentino, F., Levi, D., Cau, A., Murenu, M., Zamboni, A., Papaconstantinou, C. (2002). Distribution of *Mullus barbatus* and *M. surmuletus* (Osteichthyes: Perciformes) in the Mediterranean continental shelf: implications for management. *SCI. MAR.*, 66 (Suppl. 2): 39 – 54

Tukey, J. W. (1994). *Collected works: Multiple comparisons, 1948-1983*. D. R. Brillinger (Ed.). Wadsworth Advanced Books & Software.

Tuset, V. M., Lombarte, A., Assis, C. A. (2008). Otolith atlas for the western Mediterranean, north and central eastern Atlantic. *Scientia Marina*, 72(S1), 7-198.

VanderKooy, S., Guindon-Tisdell, K. (Eds.). (2009). *A practical handbook for determining the age of Gulf of Mexico fishes*. Ocean Springs, Mississippi: Gulf States Marine Fisheries Commission.

Vrgoč, N., Arneri, E., Juki-Peladic, S., Krstulovic Šifner, S., Mannini, P., Marceta, 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. GCP/RER/010/ITA/TD-12. *AdriaMed Technical Documents*, 12: 91 pp.

Wickham, H. (2009). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer Science & Business Media.

Xin, Y., Liang, C., Jinhu, L., Bo, Z., Xiujuan, S., Shuozen, D. (2014). Application of otolith shape analysis for stock discrimination and species identification of five goby species (Perciformes: Gobiidae) in the northern Chinese coastal waters. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology* Vol. 32 No. 5, P. 1060-1073

Yoshioka, Y., Iwata, H., Ohsawa, R. Y. O., Ninomiya, S. (2004). Analysis of petal shape variation of *Primula sieboldii* by elliptic Fourier descriptors and principal component analysis. *Annals of Botany*, 94(5), 657-664.