

ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE
Corso di laurea magistrale in
BIOLOGIA MARINA

**Struttura di età del genere *Mullus* in Alto-Medio
Adriatico mediante lettura di otoliti e frequenze di taglia**

Tesi di laurea in Biologia delle risorse alieutiche

Relatore

Dott. Marco Stagioni

Presentata da

Andrea Alia

II sessione
Anno Accademico 2014/2015

INDICE

PARTE 1 INTRODUZIONE

1.1 INTRODUZIONE ALLE SPECIE	3
1.1.1 Alimentazione.....	4
1.1.2 Ciclo riproduttivo	5
1.1.3 Pesca.....	5
1.2 AREA DI STUDIO	6
1.2.1 Distribuzione delle specie all'interno dell'area di studio	7
1.3 CAMPAGNA MEDITS	9
1.3.1 Metodi di campionamento	10
1.3.2 Analisi in laboratorio	12
1.4 INTRODUZIONE AGLI OTOLITI.....	12
1.4.1 Funzioni	14
1.4.2 Accrescimento dell'otolite.....	15
1.5 INTRODUZIONE AGLI STUDI DI STIMA DELL'ETA'	17
1.6 INTRODUZIONE AGLI STUDI SULLE FREQUENZE DI LUNGHEZZA.....	19
1.6.1 Chiavi età-lunghezza	19
1.6.2 Relazioni lunghezza-peso	20
1.6.3 Equazione di Von Bertalanffy	21
1.7 CAMPIONAMENTO	22
1.8 ESTRAZIONE E STOCCAGGIO DEGLI OTOLITI.....	27
1.9 SCOPO DEL LAVORO.....	28

PARTE 2 MATERIALI E METODI

2.1 LAVAGGIO DEGLI OTOLITI PER SONICAZIONE	30
2.2 ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI AL COMPUTER	31
2.3 MISURAZIONE DEI RADIUS	32
2.4 LETTURA PRELIMINARE DEGLI ANELLI DI ACCRESCIMENTO.....	33
2.5 SCELTA DEI CAMPIONI PER BRUCIATURA E COLORAZIONE	35
2.6 BRUCIATURA	35
2.7 TAGLIO DEGLI OTOLITI TRAMITE TRONCATRICE.....	36
2.7.1 Caratteristiche della troncatrice	36

2.7.2 Preparazione delle pasticche di resina	37
2.7.3 Preparazione dei vetrini per il taglio dell'otolite	38
2.7.4 Procedura da eseguire per il taglio.....	38
2.8 COLORAZIONE.....	39
2.8.1 Acquisizione immagini delle sezioni pre-trattamento	39
2.8.2 Tecniche di colorazione.....	40
2.8.3 Acquisizione delle immagini post-trattamento e lettura delle età.....	41
2.9 LETTURA ANNULI GIORNALIERI.....	42
2.9.1 Scelta e preparazione del campione.....	42
2.9.2 Lettura degli annuli a microscopio ottico	43
2.10 ANALISI STATISTICA	45
2.10.1 Analisi grafica.....	45
2.10.2 Analisi dati.....	46
PARTE 3 RISULTATI	48
3.1 PARTE GRAFICA.....	48
3.1.1 Struttura di età dei campioni delle due specie del genere Mullus	48
3.1.2 Distribuzione delle taglie e delle età per classi di profondità	51
3.1.3 Distribuzione delle taglie e delle età per classi di latitudine.....	53
3.2 STRUTTURE DI TAGLIA.....	55
3.3 RELAZIONE TAGLIA-PESO.....	56
3.4 RELAZIONE TAGLIA-ETA'	59
3.5 ACCRESCIMENTO	61
3.6 ALLOMETRIA	63
3.6.1 Rapporto radius-taglia	63
3.6.2 Rapporto radius-età.....	65
3.7 INCREMENTI DEI RADIUS	66
3.8 METODI DI LETTURA DEGLI OTOLITI	69
3.9 LETTURA ANNULI GIORNALIERI.....	71
PARTE 4 DISCUSSIONI	72
RINGRAZIAMENTI	78
BIBLIOGRAFIA.....	79

PARTE 1 – INTRODUZIONE

Il seguente lavoro è indirizzato allo studio degli otoliti di due specie di pesci ossei demersali commercialmente molto importanti, appartenenti al genere *Mullus*: *M. barbatus* e *M. surmuletus*, note rispettivamente con i nomi di triglia di fango e triglia di scoglio. Il lavoro è stato svolto presso il Laboratorio di Biologia Marina e Pesca di Fano (PU) i cui ricercatori partecipano ogni anno, durante il periodo estivo, al programma MEDITS sulla valutazione delle risorse demersali aliutiche dell'Alto-Medio Adriatico. I campioni di *M. barbatus* provengono dalla campagna MEDITS del 2012, mentre quelli di *M. surmuletus*, provengono sia dalla MEDITS 2012 che dalla MEDITS 2014 e dalla GRUND 2002.

1.1 INTRODUZIONE ALLE SPECIE – *Mullus barbatus* è una specie bentonica, gregaria, che vive comunemente a profondità comprese tra i 20 e i 300 m, anche se può arrivare fino a 500m, su fondali sabbioso-fangosi. *Mullus surmuletus*, invece, vive fino a massimo 400 m di profondità, ma è più comune entro gli 80 m prevalentemente su fondali duri. La caratteristica principale di queste due specie è la presenza di due lunghi barbigli a funzione tattile e olfattiva (Bombace & Lucchetti, 2011). I barbigli infatti aiutano i Mullidi a riconoscere il tipo di fondale e ad individuare le prede all'interno del sedimento. Inoltre è stato osservato come i barbigli di *M. barbatus* siano più complessi di quelli di *M. surmuletus*, probabilmente a causa della difficoltà riscontrata dalle triglie di fango nel trovare prede su fondali fangosi a scarsa visibilità (Lombarte & Aguirre, 1995). La testa è relativamente corta rispetto al corpo e la bocca, poco protrattile, è posizionata inferiormente al capo (Vrgoč *et al.*, 2004). Presentano poi due pinne dorsali ben distanziate e corte, una pinna caudale omocerca forcuta e due pinne pettorali ben sviluppate. La colorazione è prevalentemente rosata con macchie rossastre e strie gialle appena evidenti. La triglia di scoglio ha una colorazione molto variopinta e più marcata rispetto alla triglia di fango e in più presenta una striscia gialla ben evidente sulla prima pinna dorsale, come si può notare bene dalla Figura 1.1. Differenza morfologica ben evidente negli adulti delle due specie è anche la conformazione del muso: più corto e con profilo anteriore più verticale in *M. barbatus*, più allungato e con profilo più arrotondato in *M. surmuletus*. Gli unici problemi si riscontrano nel riconoscimento dei giovanili perché i caratteri morfologici tipici degli adulti non sono ancora ben evidenti (Bombace & Lucchetti, 2011).

Figura 1.1
Esemplare
adulto di
*Mullus
surmuletus*
relativo alla
campagna
MEDITS 2015



Figura 1.2
Esemplare
adulto femmina
di *Mullus
barbatus*
relativo alla
campagna
MEDITS 2015



La triglia di fango può crescere fino a circa 30 cm, ma generalmente viene catturata a dimensioni intorno ai 10-20 cm. In media, le femmine hanno una lunghezza del corpo maggiore rispetto ai maschi (Jardas, 1996), perché crescono più velocemente nel loro primo anno di vita, per cui quasi tutti gli individui più grandi intorno ai 20 cm, come quello di Figura 1.2, risultano essere femmine (Vrgoč *et al.*, 2004).

1.1.1 Alimentazione - I Mullidi mostrano anche caratteri comportamentali comuni, specialmente per quanto riguarda l'alimentazione, dal momento che entrambe le specie sono carnivore bentoniche. Si cibano principalmente di piccoli invertebrati che vivono sulla superficie o all'interno del fondale (Lombarte *et al.*, 2000). Studi sui contenuti stomacali di *Mullus barbatus* in Alto-Medio Adriatico, rivelano infatti un'alimentazione costituita prevalentemente da crostacei (soprattutto i taxon Amphipoda e Copepoda Harpactycoida), policheti e molluschi bivalvi seguiti poi da una serie di prede secondarie come foraminiferi, poriferi, nematodi, sipunculidi e echinodermi (Vallisneri *et al.*, 2006). I principali predatori

delle triglie nel mar Adriatico 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).

1.1.2 Ciclo riproduttivo – Le triglie si riproducono nel Mar Adriatico in tarda primavera-estate (Maggio, Giugno e Luglio) ad alcune miglia dalla costa (Vrgoč *et al.*, 2004). Gli stadi larvali, post-larvali e giovanili conducono una vita pelagica e hanno una colorazione azzurra, tipica delle specie pelagiche (Bombace & Lucchetti, 2011). Una volta schiusi dalle uova, iniziano poi una migrazione verso le acque più superficiali e la costa e tendono a concentrarsi in zone ricche di nutrienti come le foci dei fiumi (Vrgoč *et al.*, 2004). Il settlement, ossia il passaggio dalla vita pelagica alla vita bentonica, è accompagnato dal cambio di colorazione e dalla comparsa dei barbigli. I giovanili che cominciano a vivere sul fondo misurano tra i 40 e i 55 mm e hanno un peso di circa 1-1,5 g (Mahé *et al.*, 2005). Mentre gli adulti di *Mullus barbatus* non compiono migrazioni orizzontali significative durante tutto l'arco dell'anno, i giovanili compiono delle migrazioni dalle acque superficiali alle acque aperte nei mesi di Settembre e Ottobre (Jukic & Piccinetti, 1981). Le triglie di fango raggiungono la prima maturità sessuale nel loro primo anno vita, generalmente con una taglia compresa tra i 100 e i 140 mm. I maschi hanno generalmente due tipi di cicli sessuali: individui sotto i 140 mm hanno un ciclo riproduttivo annuale, mentre individui più grandi hanno un ciclo sessuale biennale. Le femmine invece hanno ciclo sessuale annuale (Vrgoč *et al.*, 2004). Le triglie di scoglio, invece, raggiungono la maturità sessuale intorno ai 150 mm, i maschi, e 170 mm, le femmine (Mahé *et al.*, 2005). In realtà sembrerebbe che i dati sull'accrescimento e la taglia alla prima maturità sessuale varino negli anni a secondo della disponibilità di cibo e dei mesi in cui avviene la deposizione delle uova, inoltre ci sono molte differenze tra la parte orientale e la parte occidentale del mar Adriatico (Jukic & Piccinetti, 1981).

1.1.3 Pesca – Le triglie sono un'importante componente tra le risorse demersali impattate dalla pesca a strascico e dalla piccola pesca. Lungo le coste italiane le triglie vengono pescate tramite reti a strascico, mentre le catture con il tramaglio e le altre reti da posta sono trascurabili (Sieli *et al.*, 2011). Vengono catturate per tutto l'arco dell'anno, con un picco molto accentuato a fine estate/inizio autunno quando avviene il reclutamento. L'attività di

pesca si concentra quindi proprio sulle giovani triglie in fase di migrazione verso il largo e provoca di conseguenza una consistente mortalità da pesca a livello di reclute (Bombace & Lucchetti, 2011). 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 risalenti ai primi anni 2000 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). Per cercare di diminuire l'impatto della pesca sulle giovani reclute sono state adottate diverse misure di gestione a livello nazionale ed europeo, come il divieto di pesca a strascico entro le tre miglia dalla costa e i 50 m di profondità, l'aumento della taglia delle maglie rombiche delle reti e il divieto di pesca durante la stagione del reclutamento. Inoltre il Regolamento CE 1967/2006 ha fissato la taglia minima di cattura per le specie del genere *Mullus* del Mediterraneo a 11 cm e la taglia minima delle maglie delle reti da pesca a 40 mm per le maglie quadrate e a 50 mm per le maglie rombiche (Sieli *et al.*, 2011). La taglia minima viene definita come la lunghezza approssimativa del pesce giunto a maturità sessuale (Neumann *et al.*, 2012) e che quindi si già almeno riprodotto una volta.

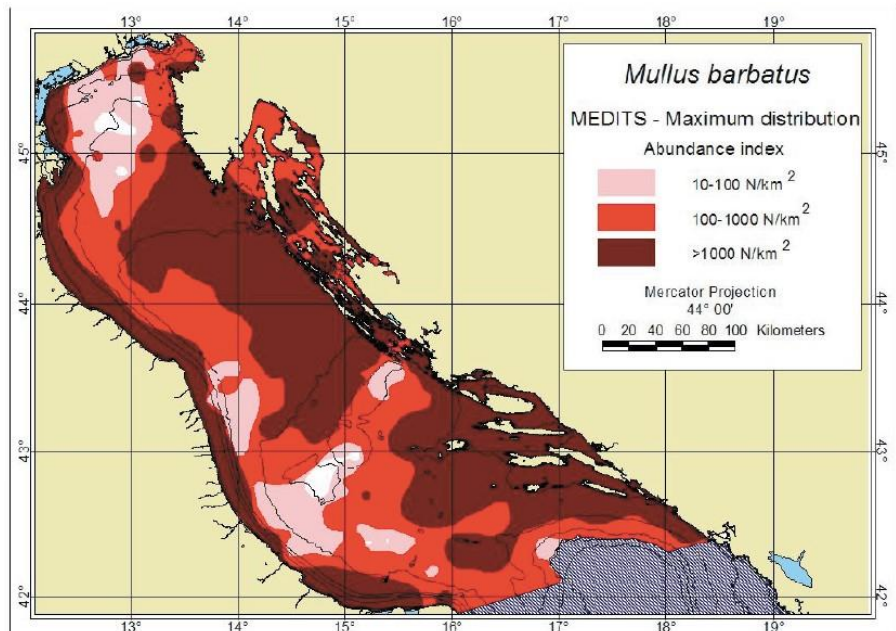
1.2 AREA DI STUDIO – Il mar Adriatico è un mare epicontinentale, cioè un bacino semi-chiuso all'interno di un continente. La costa orientale è generalmente alta e rocciosa, mentre la costa occidentale è bassa e per gran parte sabbiosa (Pinardi *et al.*, 2006). La parte nord-occidentale del bacino è caratterizzata invece da un grande afflusso di acqua dolce da parte del fiume Po, che abbassa la salinità e porta ad un'alta produttività primaria per l'alto carico di nutrienti che porta con sé (Piccinetti *et al.*, 2012). La parte settentrionale del bacino (con latitudine superiore a 43.5°N) ha una profondità media di 35 m, mentre il medio Adriatico (tra 43.5° a 42°N di latitudine) ha profondità mediamente più alte, intorno ai 140 m, con due depressioni profonde fino a 260 m. La depressione nord è la fossa di Pomo, mentre la depressione sud è la sella di Pelagosa (Pinardi *et al.*, 2006). Le acque superficiali dell'Adriatico subiscono un evidente ciclo stagionale della temperatura, con i valori massimi durante il periodo estivo e la profondità massima dello strato rimescolato raggiunta durante l'inverno. Le escursioni termiche sono infatti superiori ai 10°C, con le temperature estive delle acque aperte che raggiungo i 22-25° in superficie e gli 11.5° vicino al fondo e le temperature invernali che risultano più basse di 11° in tutta la colonna d'acqua (Piccinetti *et al.*, 2012). In estate, quando le condizioni meteo-marine sono favorevoli (alte temperature,

mare calmo, influsso di acque dolci, ecc..), c'è stratificazione delle acque, che separa le acque superficiali più calde a bassa salinità dalle acque più fredde profonde a salinità più alta. La stratificazione può comportare la formazione di bloom algali eccezionali e condizioni estese di ipossia e anossia. Danni alle risorse demersali così come alle risorse sedentarie e bentoniche possono essere considerevoli (Simunovic *et al.*, 1999).

Le caratteristiche geomorfologiche del bacino, gli scambi geopolitici lungo la costa orientale, l'esistenza di divisioni nazionali del bacino e la distribuzione delle risorse della pesca hanno portato all'individuazione di due sub-aree geografiche (GSA – Geographical Sub Areas): la GSA 17, condivisa tra Italia, Croazia, Slovenia e Bosnia-Erzegovina, e la GSA 18, condivisa tra Italia, Albania e Montenegro (Piccinetti *et al.*, 2012). L'area di studio ricopre l'intera area della GSA 17, per un totale di area investigata pari a 91127 km².

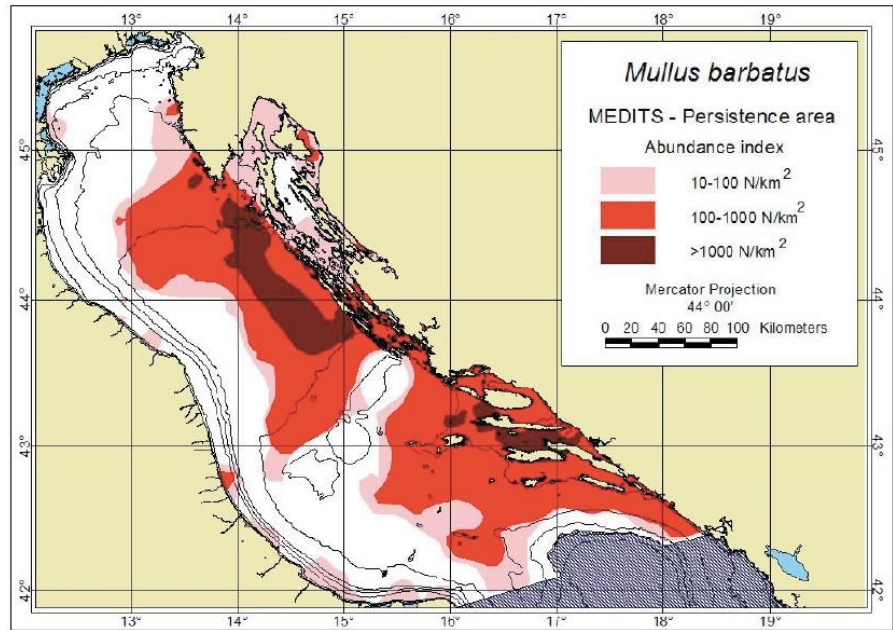
1.2.1 Distribuzione delle specie all'interno dell'area di studio – *Mullus barbatus* e *Mullus surmuletus* sono due specie simpatriche con una distribuzione geografica simile che include le aree costiere e la piattaforma continentale del mar Mediterraneo e del nord-est Atlantico (Lombarte *et al.*, 2000). Per quanto riguarda la loro distribuzione nel mar Adriatico *M. barbatus* è ampiamente distribuita su tutto il bacino, come è ben evidente dalla Figura 1.3, con un indice di abbondanza stimato intorno ai 682 individui per km².

Figura 1.3 – Distribuzione in termini di abbondanza di *Mullus barbatus* in Alto-Medio Adriatico (Piccinetti *et al.*, 2012)



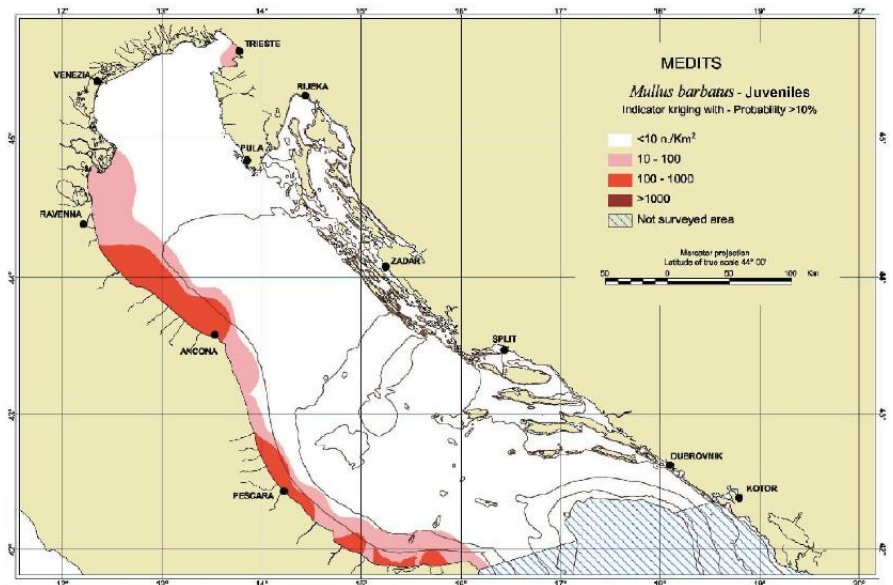
Mentre la Figura 1.3 mostra le zone ricoperte dalla specie durante i suoi spostamenti, la Figura 1.4 mostra le zone di persistenza della specie, che comprendono le acque orientali del

Figura 1.4 – Aree di persistenza di *Mullus barbatus* (Piccinetti *et al.*, 2012)



bacino a largo delle coste croate. Infine la Figura 1.5 mostra la distribuzione dei giovanili della specie, che a contrario degli adulti occupano maggiormente la costa occidentale italiana.

Figura 1.5 – Aree di distribuzione dei giovanili (Piccinetti *et al.*, 2012)



Mullus surmuletus, invece, è principalmente distribuito lungo le acque superficiali costiere sia orientali che occidentali su fondali rocciosi, con un indice medio di abbondanza di gran lunga inferiore a quello di *M. barbatus*, intorno ai 14 individui per km² (Piccinetti *et al.*, 2012). Anche la sua distribuzione sia di abbondanza, visibile in Figura 1.6, che di persistenza, visibile in Figura 1.7, risulta essere a patch.

Figura 1.6 –
Distribuzione in
termini di
abbondanza di
Mullus surmuletus
(Piccinetti *et al.*,
2012)

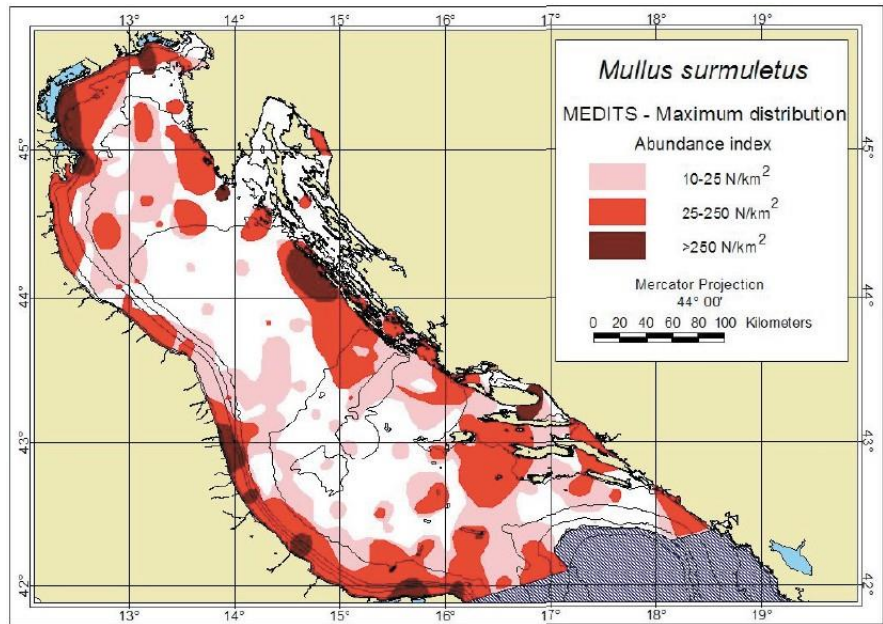
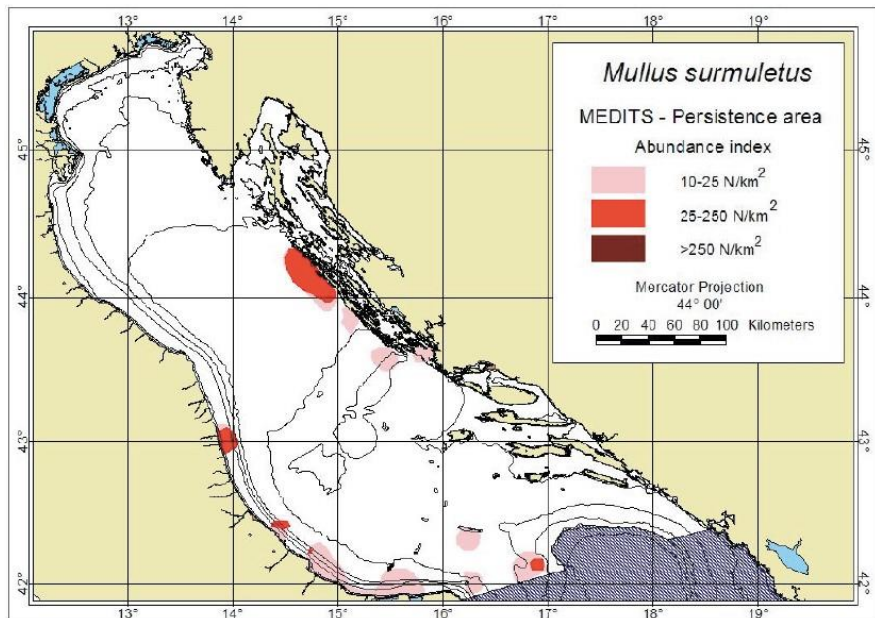


Figura 1.7 – Aree di
persistenza di
Mullus surmuletus
(Piccinetti *et al.*,
2012)



1.3 CAMPAGNA MEDITS – La pesca a strascico è un’attività che si è ben sviluppata sin dall’inizio del XX secolo all’interno di tutto il bacino dell’Adriatico e le risorse demersali sono state sfruttate principalmente dalle flotte italiane, croate, slovene e albanesi. Purtroppo mancano i dati sui primi sbarchi e le sole informazioni sulle risorse demersali vengono dalle campagne sperimentali sulla pesca a strascico. La prima campagna di questo tipo in mare Adriatico si chiamava “Hvar Expedition” ed è stata condotta negli anni 1948-1949 (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. In seguito, nel 1982, è iniziata la campagna “Pipeta”, dal nome del peschereccio utilizzato per la ricerca, che ricopriva l’intero Nord e Centro Adriatico. La ricerca è poi continuata col programma GRUND, un comune programma di ricerca italiano che aveva previsto un monitoraggio delle risorse demersali sulla base di una metodologia comune di campionamento e analisi dati per tutti i mari italiani. Dal 2001 ricerche sulla costa orientale dell’Adriatico sono partite come parte del progetto FAO AdriaMed, che avevano lo stesso programma del GRUND e si svolgevano una volta l’anno nello stesso periodo, autunno-inverno (Piccinetti *et al.*, 2012). Infatti il periodo di campionamento, per quanto riguarda i campioni di *M. surmuletus* della campagna GRUND 2002, è andato dal 02 Ottobre 2002 al 20 Gennaio 2003. Il programma GRUND finì poi nel 2007 (Piccinetti *et al.*, 2012). Nel frattempo però, dal 1994, la Comunità Europea aveva iniziato a finanziare un progetto di ricerca internazionale, chiamato MEDITS, al fine di analizzare lo stato delle risorse demersali di una gran parte del Mediterraneo comprendente più Paesi quali Italia, Francia, Spagna, Grecia, Albania, Slovenia e Croazia (Jukic-Peladic *et al.*, 2001) ed è questo programma di investigazione che tuttora prosegue e viene svolto nel periodo primaverile-estivo. MEDITS sta per “MEDiterranean International Trawl Survey” cioè studio internazionale sulla pesca a strascico. In Adriatico prevede come area di investigazione tutta la GSA 17, con la collaborazione del Laboratorio di Biologia Marina e Pesca di Fano, dell’Istituto di Oceanografia e Pesca di Spalato e dell’Istituto per le Risorse da Pesca della Slovenia (Piccinetti *et al.*, 2012).

La MEDITS in Adriatico viene effettuata generalmente nel periodo estivo con la motonave “Andrea”. La MEDITS del 2012 è stata infatti effettuata dal 16 Giugno al 01 Agosto, mentre la MEDITS 2014 è stata rimandata per problemi tecnici ed effettuata tra il 14 Agosto e il 23 Novembre.

1.3.1 Metodi di campionamento – Il campionamento prevede che le cale vengano posizionate seguendo uno schema di campionamento stratificato per la profondità e che all’interno di ciascuno strato vengano scelte delle posizioni in maniera random. Il numero di posizioni all’interno di ogni strato è proporzionale all’area ricoperta dallo strato. Questi strati di profondità sono: 10-50 m, 51-100 m, 101-200 m e 201-300 m (AA. VV., 2013). Il protocollo MEDITS prevede un numero standard di cale per ogni Stato partecipante al

progetto per ogni GSA. La campagna MEDITS 2012 ha previsto un numero di 130 cale totali (Figura 1.8), mentre per la MEDITS 2014 il numero è aumentato a 180.

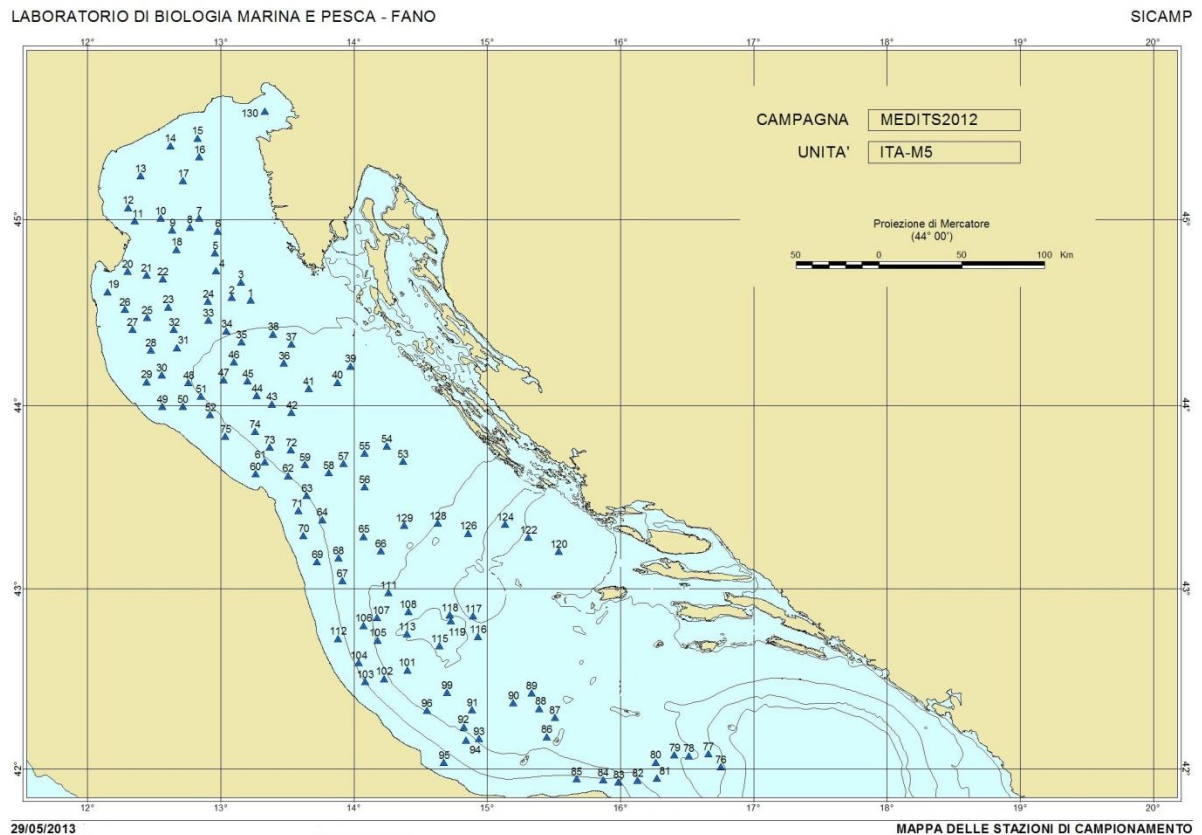


Figura 1.8 – Mappa delle cale della MEDITS 2012

Per ogni cala che viene effettuata viene compilato un foglio di barca che contiene non solo dati sulla cala stessa ma anche dati della barca, sulle reti e ovviamente sul pescato. Questi sono quindi: 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 (dal 2012 82 specie tra elasmobranchi, osteitti, crostacei e cefalopodi) che delle specie non bersaglio e del benthos. Per ciascuna specie target vengono presi dei parametri biologici secondo il protocollo internazionale MEDITS. Viene preso sia il numero di individui pescati che il peso totale del pescato. 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 (AA. VV., 2013), come è stato fatto per *Mullus barbatus* per diverse cale. Il pesce viene poi riposto in cassette all'interno del congelatore di bordo per poter essere analizzato successivamente in laboratorio.

1.3.2 Analisi in laboratorio – Tra le specie bersaglio si possono fare due gruppi distinti in base alle misurazioni che bisogna prendere su ciascun individuo:

- MEDITS G1: specie per le quali è necessario prendere sia il numero totale e peso totale degli individui pescati, sia la lunghezza totale di ogni individuo, peso, sesso, maturità sessuale ed età (solo per alcuni). *Mullus barbatus* e *Mullus surmuletus* fanno parte di questo gruppo con tutti i dati che sono stati raccolti in tabelle Excel e trattati successivamente per le analisi di struttura della popolazione.

- MEDITS G2: specie per le quali è sufficiente prendere numero di individui e peso totale e lunghezza totale e peso di ogni individuo (AA. VV., 2013).

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 pinna caudale ed espressa in millimetri (mm).

2) Peso totale – espresso in grammi (g)

3) Sesso – stabilito 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 1, per gli immaturi, 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.

Per quanto riguarda l'età è stato necessario il seguente studio sugli otoliti, in quanto ottimi indicatori dell'accrescimento dell'animale.

1.4 INTRODUZIONE AGLI OTOLITI – Gli otoliti sono delle concrezioni di carbonato di calcio e altri sali inorganici, che si sviluppano intorno ad una matrice proteica nell'orecchio interno dei vertebrati (Tuset *et al.*, 2008). Nella maggior parte delle specie il carbonato di calcio (CaCO_3) rappresenta il 95% in peso dell'otolite, con il 3-5% di matrice organica e meno dell'1% di elementi in traccia. La composizione di elementi in traccia ha ampliato molto gli studi sugli otoliti, per l'applicazione nella ricostruzione di paleoambienti, rotte migratorie e popolazioni di origine dei pesci (Campana, 2004). Il carbonato di calcio viene depositato sotto forma di cristalli di aragonite, disposti radialmente rispetto al centro dell'otolite. In alcuni casi però l'aragonite è rimpiazzata da un altro polimorfo del carbonato di calcio, la vaterite (Panfili, 1992). Molto poco si conosce sui meccanismi che causano il

cambio da aragonite a vaterite. Potrebbe essere dovuto a cambiamenti ambientali o alcuni hanno ipotizzato che sia dovuto all'esposizione a forti stress da trauma meccanico, carenza di cibo, cambi di densità o stress termico (Oxman *et al.*, 2007).

Nell'orecchio interno dei Pesci Ossei, rappresentato in Figura 1.9a, esistono tre paia di otoliti (Fig. 1.9b) ciascuno dei quali è situato in una camera alla base dei canali semicircolari: i *lapilli*, che si trovano all'interno della camera chiamata *utricle*, le *sagittae*, che si trovano all'interno del *sacculus*, e gli *asterischi* che si trovano nella *lagena* (Panfili, 1992).

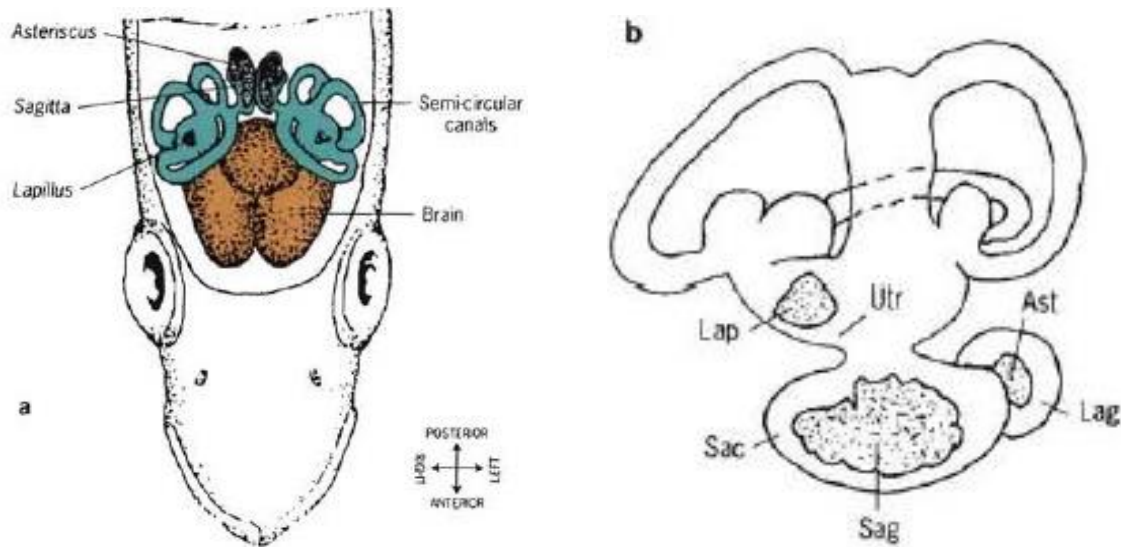


Figura. 1.9 - Posizione dell'otolite nell'orecchio interno del pesce a) Vista dorsale dell'apparato vestibolare; b) Otoliti all'interno dell'apparato. Ast=asteriscus, Lag=lagena, Lap=lapillus, Sac=sacculus, sag=sagitta, Utr=utricle (Panfili *et al.*, 2002).

La sagitta è l'otolite più grande dei tre, quindi di conseguenza è anche più manovrabile e più facile da estrarre. I ricercatori hanno anche dimostrato che le sagitte contengono gli incrementi più ampi e a risoluzione maggiore a livello microstrutturale (Stevenson & Campana, 1992) per cui vengono maggiormente studiate rispetto ai lapilli e agli asterischi. La sagitta ha una forma ellittica, compressa lateralmente, con una faccia convessa prossimale (interna) e una faccia concava distale (esterna). La faccia interna possiede una sorta di scavatura lungo l'asse principale, chiamata *sulcus acusticus* (Panfili, 1992), come è possibile osservare da Figura 1.10. Dalla figura è possibile osservare anche l'estremità anteriore dell'otolite, detta rostro, e l'estremità posteriore, detta post-rostro.

Ciascun otolite possiede forma e dimensioni peculiari specie-specifiche (Panfili, 1992). Alcune differenze nelle dimensioni degli otoliti sono legate allo stadio di crescita del pesce,

ma è possibile vedere otoliti di pesci molto grandi essere più piccoli di quelli di pesci molto piccoli (Popper *et al.*, 2005). Anche la forma dell'otolite varia molto sia tra le specie che all'interno della stessa specie. Per forma si intendono non solamente i margini esterni dell'otolite, ma anche la forma del solco acustico, il tipo di apertura del solco e la posizione (Tuset *et al.*, 2008).

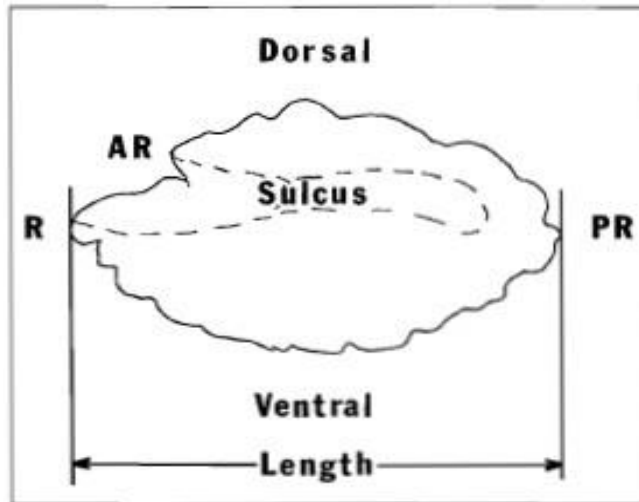


Figura 1.10 – Vista interna di una sagitta destra di un teleosteo con il solco che si sviluppa dal margine anteriore lungo l'asse antero-posteriore. Il rostro R è la parte anteriore dell'otolite e il postrosto PR la parte posteriore. Opposto al rostro nella parte dorsale c'è l'antirostro AR (Stevenson & Campana, 1992)

E' stato notato, inoltre, come ci sia in realtà molta più diversità nella forma degli otoliti sacculari che tra gli otoliti dell'utricolo e della lagena. Questo perché il *sacculus* è l'organo maggiormente implicato nella ricezione dei suoni e quindi pesci che possiedono specializzazioni per alcuni tipi di suoni finiscono per mostrare specializzazioni anche degli otoliti (Popper *et al.*, 2005).

Queste differenze interspecifiche nella forma sembrano essere dovute sia alla genetica che alle condizioni ambientali, soprattutto temperatura e pressione (Panfili *et al.*, 2002). Lombarte e Cruz (2007) hanno visto infatti come un otolite di grandi dimensioni sia correlato alla necessità di avere una comunicazione acustica migliore nelle acque profonde, per compensare la mancanza o riduzione della luce.

1.4.1 Funzioni – L'orecchio interno è costituito quindi da tre canali semicircolari e tre organi contenenti gli otoliti (Popper & Lu, 2000) e svolge un ruolo molto importante sia nel mantenimento dell'equilibrio sia come sensore di pressione, gravità, movimenti angolari e vibrazioni acustiche (Panfili *et al.*, 2002). Il trasduttore dell'informazione acustica è la cellula ciliata sensoriale. La sommità apicale di questa cellula si estende dentro il lumen della camera che contiene l'otolite, a livello del *sulcus acusticus*, ed ha una serie di ciglia che, piegandosi, producono un potenziale recettoriale all'interno della cellula che a sua volta

stimola il nervo acustico (Popper & Lu, 2000). L'epitelio con le cellule sensoriali attaccato all'otolite si chiama *macula*. E' così che gli otoliti partecipano alla ricezione degli stimoli dovuti alle accelerazioni angolari, alla gravità e ai suoni (Panfili, 1992).

Alterazioni morfologiche degli otoliti dovuti a deposizione di vaterite, soprattutto nella forma e nella densità (la vaterite è meno densa dell'aragonite), possono causare problemi all'udito, all'orientamento e comportamentali (Oxman *et al.*, 2007). Gli otoliti sono la parte più densa del pesce e si pensa che questa densità giochi un ruolo fondamentale per le funzioni uditive e motorie del pesce (Popper *et al.*, 2003). Lo studio di Oxman del 2007 sui salmoni mostra proprio come un pesce con entrambi o anche un solo otolite di vaterite presenti una capacità uditiva significativamente inferiore rispetto ad un pesce con entrambi gli otoliti di aragonite e che tale mancanza sia spiegabile con la differenza di densità, e quindi di peso, degli otoliti di vaterite rispetto a quelli normali.

1.4.2 Accrescimento dell'otolite – L'otolite si forma da una o più cellule primordiali esocitate dalle cellule epiteliali dell'orecchio interno (Mann *et al.*, 1983). Questi nuclei sono stati denominati granuli primordiali e sono le componenti iniziali del *primordium* dell'otolite. Uno o più *primordia* può costituire il “core”, o nucleo, dell'otolite. Inoltre alcuni pesci possono avere anche più di un core (Panfili *et al.*, 2002).

L'accrescimento dell'otolite avviene per deposizione di materiale sulla sua superficie sotto forma di anelli concentrici di spessore variabile intorno al core. Questa deposizione è ciclica e dipende dai ritmi interni del metabolismo del calcio e della sintesi proteica. La crescita non è uniforme in tutte le direzioni, ma avviene secondo dei gradienti direzionali e seguendo assi privilegiati: infatti la crescita maggiore si ha lungo l'asse antero-posteriore e la minore lungo l'asse prossimo-distale (Panfili, 1992). I pattern di crescita di maggiore interesse sono:

1. Annuli giornalieri – il ciclo di base di deposizione di carbonato di calcio sulla superficie dell'otolite è un ciclo nictemerale, messo in evidenza in numerose specie (Panfili, 1992). L'unità di accrescimento giornaliero di compone di: una zona più ricca in carbonato di calcio, detta “L-zone”, e una zona più ricca in proteine, detta “D-zone” (Panfili *et al.*, 2002). La formazione giornaliera di questi annuli sembra quindi essere regolata dal fotoperiodo e altri fattori esterni (Panfili, 1992) con il tasso di formazione degli incrementi che dipende dal tasso di accrescimento somatico delle larve (Brothers *et al.*, 1976). Tra i fattori che regolano sia il tasso di crescita dell'otolite che del pesce

ci sono in primo luogo la temperatura e il fotoperiodo, seguite dalla disponibilità di cibo e stress ambientali (Morales-Nin *et al.*, 1995). Le dimensioni di questi anelli variano da meno di 1 μm a qualche μm (Panfili, 1992) e non sempre è possibile osservarli in tutte le specie (Panfili *et al.*, 2002). Quando però è possibile osservarli possono determinare l'età delle larve con grande accuratezza e precisione (Brothers *et al.*, 1976). Diversi autori hanno provato anche ad usarli per determinare l'età negli adulti, ma, dopo il primo anno di vita, cambia lo spessore degli incrementi e la morfologia dell'otolite per cui possono essere di difficile interpretazione (Morales-Nin, 1992).

2. Anelli stagionali – La deposizione di anelli di accrescimento nei tessuti calcificati dei pesci ossei è almeno parzialmente causata dai cambiamenti stagionali dell'ambiente, sia in termini di variabili abiotiche (su tutte la temperatura) che di variabili biotiche, come la disponibilità di cibo (Morales-Nin, 1992). È proprio l'esistenza di anelli di crescita stagionale sugli otoliti che ha permesso di studiare l'età dei pesci. È possibile notare infatti la presenza di zone ialine e zone più opache. Generalmente in zone di climi temperati la zona ialina viene assimilata in un periodo di deposizione lenta, cioè l'inverno, mentre la zona opaca in un periodo di deposizione veloce, cioè primavera-estate (Panfili, 1992). Nel periodo di deposizione lenta non solo vengono depositati incrementi sottili e poco definiti, ma sono più frequenti segni di discontinuità di crescita (Morales-Nin, 1990). Lo spessore degli anelli può risultare anche di qualche centinaia di μm . Le variazioni strutturali e chimiche di questi anelli sono controllati da cambiamenti nella fisiologia del pesce dovuti a fluttuazioni stagionali dell'ambiente. La temperatura è senza dubbio il fattore dominante e gioca un ruolo molto importante anche sulle varie attività del pesce e sulla crescita (Panfili, 1992).
3. Discontinuità nella struttura – dovute a vari stress che non sono necessariamente regolari durante la storia di vita del pesce (Panfili, 1992). Questi stress possono comunque essere registrati sull'otolite come dei falsi anelli stagionali, che quindi non devono ingannare durante la lettura per la stima dell'età. Un anello netto che a volte si forma vicino al core è quello relativo al periodo del settlement. Infatti è possibile che la transizione dall'ambiente pelagico all'ambiente epibentico, che porta anche alla transizione da stadio postlarvale a giovanile, porti a dei cambiamenti nell'orecchio

interno dovuti sia al cambio habitat e nicchie ecologiche che al cambio di alimentazione (Lombarte & Popper, 2004).

1.5 INTRODUZIONE AGLI STUDI DI STIMA DELL'ETA' - Dagli anni '90 ci sono stati sviluppi significativi nella biologia della pesca, basati per gran parte su studi di otoliti con le nuove tecnologie (Begg *et al.*, 2005). L'otolite è l'unica struttura che costantemente registra eventi giornalieri nelle prime fasi di vita dell'animale ed eventi annuali per tutta la vita. Con l'avvento dei nuovi sistemi di analisi di immagini al computer (utilizzati anche in questo lavoro per l'acquisizione delle immagini degli otoliti), il compito di migliorare l'identificazione, le conte degli annuli giornalieri e annuali e i calcoli dell'ampiezza degli otoliti è divenuto più veloce e più preciso (Stevenson e Campana, 1992). Vantaggio degli otoliti è che non sembrano essere soggetti a riassorbimento di carbonato di calcio dopo la sua deposizione, eccetto in alcuni casi estremi, di conseguenza vengono largamente utilizzati per stimare l'età del pesce (Panfili *et al.*, 2002). Lo stimolo di sviluppare la ricerca degli otoliti si è avuto a seguito del Terzo Simposio Internazionale sulla Ricerca e le Applicazioni degli Otoliti dei Pesci, tenutosi nel Giugno 2004 presso Townsville (Australia) con la partecipazione di 280 ricercatori. Il simposio ha fatto il punto sulle conoscenze dello stato dell'arte fino al 2004 e ha proposto delle direzioni future per incrementare la ricerca in questo campo importantissimo con tutte le sue applicazioni sia in ambito ecologico che nella valutazione e gestione della pesca e nella determinazione della sostenibilità delle risorse. Gli otoliti possono essere utilizzati per condurre diversi studi. Si possono fare infatti studi sulla struttura e funzione, sull'età e la crescita, sulla composizione chimica e sulla morfometria classica. Storicamente gli otoliti sono stati principalmente usati per analisi sull'età focalizzandosi sulla stima, le analisi e l'interpretazione dell'età dei pesci e dei dati di crescita al fine di determinare le caratteristiche della storia di vita e lo stato di conservazione di uno stock (Begg *et al.*, 2005). Studi sull'età possono fornire anche dati di base su: la struttura di età dello stock, l'età di prima maturità, la frequenza di deposizione delle uova, le risposte individuali o dello stock ai cambiamenti ambientali, il successo del reclutamento, i cambiamenti della popolazione dovuti alla pesca e altri ancora (Morales-Nin, 1992).

Uno degli aspetti significativi per ottenere dei dati accurati è determinare l'età con l'errore più basso. Stime non accurate dell'età hanno causato spesso errori importanti nella gestione

delle risorse alieutiche, portando ad un aumento della perdita delle principali specie commerciali (Polat *et al.*, 2005).

L'età può essere determinata da uno o più dei seguenti 3 metodi:

1. Metodo anatomico – consiste nel contare gli anelli di accrescimento regolari che si formano nei tessuti duri come gli otoliti o anche le scaglie e le vertebre.
2. Analisi delle frequenze di taglia – monitorando la progressione nel tempo di individui nelle classi di taglia.
3. Stima diretta – attraverso misurazioni dirette del tasso di crescita di specifici individui estratti dallo stock originario. I due metodi diretti più utilizzati sono la Cattura-Marcatura-Ricattura (CMR) o il monitoraggio della crescita di pesci in cattività.

L'uso dell'analisi delle frequenze di taglia con la simultanea interpretazione degli anelli di accrescimento probabilmente fornisce i risultati migliori (Morales-Nin, 1992) ed è per questo che ci si è posti tale obiettivo in questo lavoro.

Per quanto riguarda la stima delle età delle specie del genere *Mullus* in Adriatico, diversi studi sono stati condotti in collaborazione con i ricercatori sloveni e croati sui dati provenienti dalle varie campagne di ricerca. Gli unici dati sull'età provengono da studi sull'accrescimento nella taglia degli individui, considerando gli individui che hanno raggiunto la taglia di prima maturità di 1 anno e che il tasso di accrescimento tra maschi e femmine è molto diverso, con i maschi che a parità di età risultano essere di 10-20 mm più piccoli (Vrgoc *et al.*, 2004). In Figura 1.11 viene rappresentata una tabella in cui sono riportate le varie età con le relative taglie separate per sesso proposte da vari autori. Si può subito notare come vi sia una grande differenza tra i ricercatori sull'interpretazione delle età.

Author	Sex	Age (yr)							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Scaccini, 1947b	M	12.63	17.47	20.42	23.31	23.32	24.19	24.88	25.50
	F	12.71	20.26	23.94	25.93	27.04	27.93	28.66	29.34
Bougis and Mužinić, 1958	M	10-11	14.0	15.6	16.6	17.7			
	F	12-14	18.0	18.9	20.4	21.8			
Haidar, 1970	M	10.1	12.9	14.2	15.1	15.7			
	F	12.2	15.2	16.5	17.5	18.3			
Jukić and Piccinetti, 1981	M	10.0	12.5	14.0	15.0	15.4			
	F	12.3	15.1	16.3	17.4	18.0			

Fig. 1.11 – Relazione tra le lunghezze totali (TL) di maschi e femmine di *M. barbatus* con le età (Vrgoc *et al.*, 2004)

Una fonte di variabilità tra questi dati potrebbe essere la diversità delle aree di studio esaminate dagli autori, essendosi concentrati chi più su campioni delle coste italiane e chi più su quelli delle coste croate. Si è visto infatti in diversi studi come le triglie di fango dell'Adriatico, a parità di età, crescano più velocemente lungo la costa italiana piuttosto che lungo la costa croata, per una maggiore disponibilità di cibo (Bombace & Lucchetti, 2011).

1.6 INTRODUZIONE AGLI STUDI SULLE FREQUENZE DI LUNGHEZZA –

L'analisi delle strutture di taglia è uno degli strumenti più utilizzati per la valutazione delle risorse alieutiche. La struttura di taglia di una popolazione di pesci non è altro che un'istantanea che riflette la dinamica dello stock e dei tassi di reclutamento, crescita e mortalità (Neumann & Allen, 2007). Lo studio delle frequenze di taglia è il metodo più utilizzato per dare un'interpretazione delle età senza aver fatto un'analisi sugli anelli di accrescimento. Questo metodo indiretto di stima delle età è stato usato originariamente nel XIX secolo e si poi sviluppato con lo sviluppo della tecnologia e di software veloci. L'analisi in questione prevede la misurazione e suddivisione in classi di taglia delle catture al fine di identificare i vari gruppi di età presenti, basandosi sull'assunzione che ogni gruppo di età ha una distribuzione normale delle taglie. Se poi sono disponibili le chiavi di età-lunghezza, derivanti dalla lettura degli otoliti, si possono fare dei confronti tra le distribuzioni taglia-età derivanti dalla lettura e quelle calcolate per osservare la corrispondenza tra i due metodi. Il metodo indiretto appena visto presenta dei problemi per specie che hanno un periodo di riproduzione relativamente lungo e che presentano una certa variabilità dei tassi di accrescimento, che generalmente aumentano con l'età, per questo può essere applicato a specie che presentano una durata della vita corta, come appunto *Mullus barbatus* e *Mullus surmuletus* (Ogle, 2015).

1.6.1 Chiavi età-lunghezza – Stimare l'età per un gran numero di pesci spesso è un lavoro lungo e intenso, però fortunatamente c'è una relazione tra età e taglia tale per cui sia possibile calcolarsi l'età del pesce sapendo solamente la sua lunghezza totale. In questo modo è possibile calcolarsi in maniera affidabile la struttura di età di un campione molto grande applicando i risultati di un piccolo subcampione al campione intero. I risultati della relazione taglia-età vanno sotto il nome di chiavi di età-lunghezza (ALK – Age Length Key) (Ogle, 2015).

1.6.2 Relazioni lunghezza-peso – Monitorare il peso individuale delle specie target della MEDITS può essere finalizzato a:

1. Stimare la relazione lunghezza-peso
2. Stimare le curve di accrescimento in peso
3. Stimare la condizione dei vari individui campionati come indicatore del benessere della popolazione (AA. VV., 2013).

Cercare di capire come il peso di un pesce varia con la taglia è un'informazione fondamentale per i biologi della pesca al fine di provare a dedurre le strutture di età e quantificare qualche altro aspetto delle dinamiche di popolazione. Le relazioni lunghezza-peso sono richieste infatti per:

1. Stimare il peso avendo solamente le taglie degli individui, cosa che può accadere per mancanza di tempo o mezzi tecnici sul campo
2. Uso nei modelli di valutazione dello stock quando si vuole convertire la crescita in lunghezza con la crescita in peso
3. Stimare la biomassa di una comunità ittica usando solo i dati sulla taglia e sulla specie
4. Fare confronti sulle caratteristiche della storia di vita dei pesci (Jellyman *et al.*, 2013).

Spesso tale relazione viene utilizzata per valutare il tasso e il tipo di accrescimento di una data specie (Panfili *et al.*, 2002). L'accrescimento può essere di due tipi: isometrico o allometrico. Teoricamente si considera un accrescimento isometrico quando i due parametri di taglia e peso crescono in egual misura, mentre si considera un accrescimento allometrico quando uno dei due parametri cresce più dell'altro per un buon tratto di vita del pesce.

Esiste una relazione tra lunghezza (L) e peso (P) che si può esprimere con la formula:

$$P = a L^b \text{ o in forma logaritmica } \log P = \log a + b \log L,$$

dove a e b sono due costanti (Bombace & Lucchetti, 2011). Generalmente b tende ad assumere un valore compreso tra 2 e 4, molto spesso intorno a 3 (Panfili *et al.*, 2002). Se $b = 3$ allora si parla di accrescimento isometrico, se $b < 3$ allora si parla di accrescimento allometrico negativo, proprio di tutti quei pesci che hanno un corpo allungato, fusiforme, e infine se $b > 3$ si parla di accrescimento allometrico positivo, proprio di tutti quei pesci con corpo tozzo. Viene preferito quindi utilizzare questa relazione tra lunghezza e peso piuttosto che la regressione lineare. Ci sono due ragioni del perché sia inappropriato l'uso della regressione lineare per rappresentare i dati di lunghezza-peso di molte specie. Per prima cosa, la relazione tra peso e taglia del pesce spesso non è lineare. Questa non-linearità si ha

perché la maggior parte dei pesci aumenta linearmente di taglia ma tridimensionalmente il volume corporeo. Seconda cosa, i pesi dei pesci più piccoli sono spesso meno variabili rispetto ai pesi dei pesci più grandi (Ogle, 2015).

Per quel che riguarda *Mullus barbatus*, dalla letteratura emerge che la crescita di questa specie, esaminata mediante la relazione lunghezza-peso, è isometrica. Ci sono inoltre due punti differenti di flesso nella relazione lunghezza-peso delle femmine: uno in corrispondenza dei 120-130 mm (che corrisponde alla prima maturità sessuale) e l'altro tra i 160 e i 170 mm. Per quanto riguarda, invece, la relazione lunghezza-peso dei maschi si ha un solo punto di flesso tra i 115 e i 120 mm, che corrisponde sempre alla taglia di prima maturità (Vrgoc *et al.*, 2004).

1.6.3 Equazione di Von Bertalanffy – L'accrescimento di una popolazione può essere espresso anche osservando l'incremento in taglia o in peso per unità di tempo, che può essere rappresentata dalle classi di età. La relazione che meglio si adatta a questo tipo di studio è l'equazione di Von Bertalanffy (VBGF – Von Bertalanffy Growth Function), la più utilizzata nei modelli di valutazione degli stock (Bombace & Lucchetti, 2011). La formula è la seguente:

$$L_t = L_\infty [1 - e^{-K(t-t_0)}]$$

con L_t = lunghezza totale del pesce all'età t , L_∞ = lunghezza teorica massima o asintotica che il pesce raggiungerebbe se potesse vivere indefinitamente (Green *et al.*, 2009), K = tasso di accrescimento necessario per arrivare alla taglia massima, detto anche parametro di curvatura e t_0 = età teorica alla lunghezza zero. Specie che presentano ciclo biologico breve e raggiungono la lunghezza massima in pochi anni, come le due specie del genere *Mullus*, presentano un K alto (Bombace & Lucchetti, 2011). La VBGF si può esprimere anche in termini ponderali per cui si ha:

$$W_t = W_\infty [1 - e^{-K(t-t_0)}]^3$$

Calcolare i parametri dell'equazione di Von Bertalanffy dalle frequenze di lunghezza e compararli con i parametri di crescita ottenuti dalle chiavi età-lunghezza può essere un altro approccio per ottenere in maniera indiretta la composizione in termini di classi di età (Panfili *et al.*, 2002).

1.7 CAMPIONAMENTO – Il monitoraggio dell'età, che comporta il campionamento degli otoliti, richiede un protocollo comune per standardizzare le tecniche di campionamento, la dimensione del campione e il tipo di informazioni da registrare. Il campionamento degli otoliti può essere finalizzato a:

1. Stimare gli indici di abbondanza delle età e monitorare la struttura dello stock nel tempo
2. Monitorare la distribuzione spaziale delle classi di età
3. Usare i dati di età e taglia per determinare le curve di accrescimento
4. Stimare gli indici strutturali che possono essere utilizzati negli studi di gestione dello stock.

Il protocollo MEDITS per l'estrazione degli otoliti prevede di adottare un campionamento random per classi di taglia nel quale viene campionato un numero fisso di individui scelti casualmente all'interno di ogni classe di età e distinti per sesso. Il numero ottimale di otoliti per classi di taglia non è stato stabilito in forma internazionale (AA. VV., 2013). Secondo Mandado e Vasquez (2011) un numero di 20 otoliti in un campionamento strutturato per classi di taglia viene considerato ottimo per specie con 30-40 classi di taglia.

Il numero di otoliti necessario dipende però dalle proporzioni delle classi di taglia all'interno della frequenza di taglia e dalla varianza massima delle proporzioni dei gruppi di età all'interno delle classi di taglia. Il protocollo MEDITS per le due specie in esame prevede classi di taglia di 0,5 cm e numero di otoliti estratti per classi di taglia per sesso uguale a 6 per individui giovanili e uguale a 14 per gli individui adulti. Il protocollo raccomanda inoltre di estrarre otoliti da individui provenienti da tutte le cale (ove catturati ovviamente) e di evitare di selezionare troppi campioni appartenenti allo stesso banco.

I campioni di otoliti qui di seguito analizzati provengono quindi dalla campagna MEDITS 2012 e sono così suddivisi: 600 di *Mullus barbatus* e 5 di *Mullus surmuletus*. I 600 campioni di otoliti, a sua volta, sono stati selezionati, come previsto dal protocollo, tra i 3309 individui totali catturati, da cui sono stati comunque presi i parametri meristici previsti per le specie del gruppo MEDITS G1. Per quanto riguarda *Mullus surmuletus*, invece, non essendo possibile svolgere uno studio di stima delle età sulla base di soli 5 campioni, sono stati aggiunti i campioni, con i relativi dati meristici, appartenenti alle campagne MEDITS 2014 (38 campioni) e GRUND 2002 (75 campioni), per un totale di 118 campioni. Essendoci

molte meno catture di *M. surmuletus*, rispetto a *M. barbatus*, sono stati estratti gli otoliti a tutti gli individui che sono stati pescati.

Molto importante inoltre è la qualità dei campioni, riguardo al fatto che rappresentino al meglio la popolazione originaria (CARE, 2006), per questo, nei grafici che seguono sono state analizzate le distribuzioni delle taglie nei campioni totali di *Mullus barbatus* (Figura 1.12) e nei campioni di otoliti (Figura 1.13) e come siano distribuite anche per ciascun sesso (Figure 1.14 e 1.15).

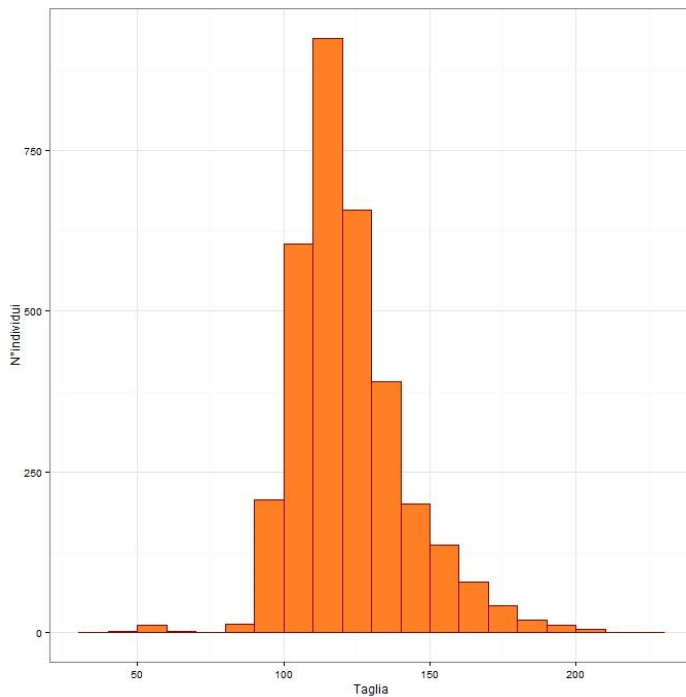


Figura 1.12 – Distribuzione delle taglie dei campioni totali di *Mullus barbatus*. Come si può osservare dagli istogrammi, la distribuzione dei campioni mostra un picco di frequenza intorno alle taglie 110-120 mm.

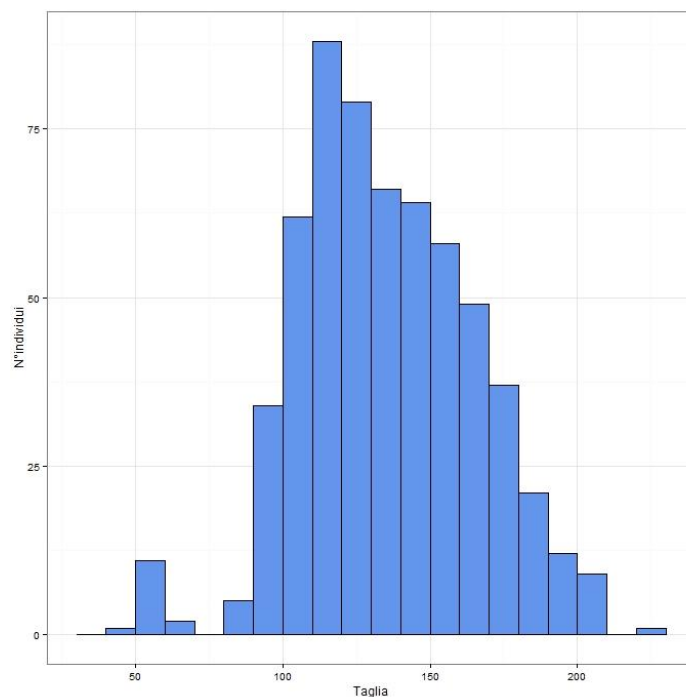


Figura 1.13 – Distribuzione delle taglie dei campioni di otoliti di *Mullus barbatus*. Anche in questo caso si può osservare un picco di frequenza intorno ai 120 mm, ma in questo caso meno accentuato rispetto soprattutto alle frequenze delle taglie successive

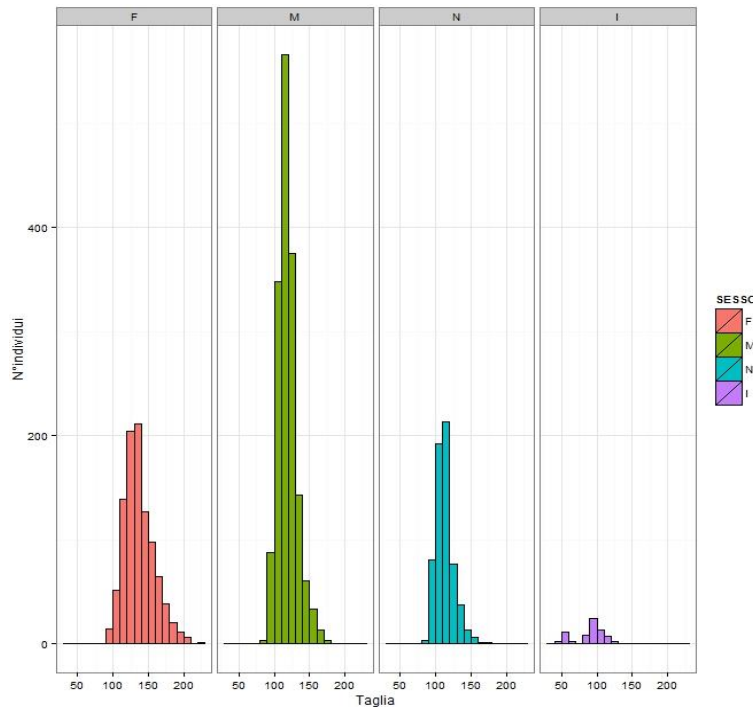


Figura 1.14 – Distribuzione delle taglie per sesso nei campioni totali di *Mullus barbatus*. Separando per sesso la distribuzione delle taglie è possibile osservare come il picco di 110-120 mm sia dovuto principalmente ai maschi M, con le femmine F che presentano invece una distribuzione delle taglie più ampia, riuscendo a raggiungere taglie maggiori

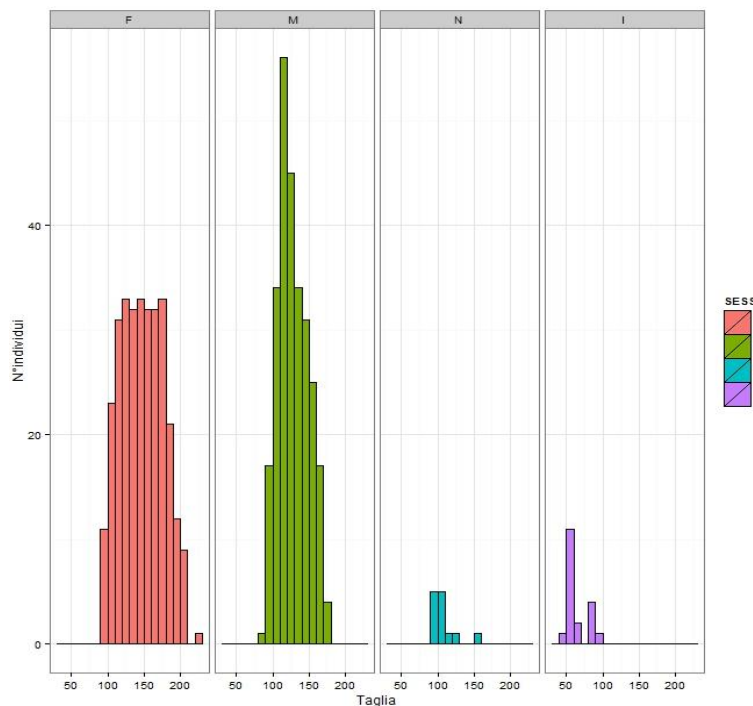


Figura 1.15 – Distribuzione delle taglie per sesso nei campioni di otoliti di *Mullus barbatus*. Anche qui si può notare il picco di maschi attorno alle taglie 120-130 mm, mentre le femmine mostrano una distribuzione appiattita, dovuta principalmente al raggiungimento del numero di otoliti campionabili per le analisi di stima dell'età.

Come si è potuto osservare dai grafici, le distribuzioni dei campioni per taglia risultano essere differenti. Infatti anche osservando la taglia media dei campioni è possibile notare la differenza tra i due dataset, essendo quella dei campioni totali uguale a 121.1 (con deviazione standard di 19.1 mm) e quella dei campioni di otoliti uguale a 134.1 mm (con deviazione standard di 27.6 mm). Le distribuzioni dei campioni risultano comunque essere

normali, con la normalità che è stata testata con il test di Shapiro-Francia e il test di Kolmogorov-Smirnov.

Sono state osservate poi anche le distribuzione dei campioni di *Mullus barbatus* per classi di profondità (Figure 1.16 e 1.17), con gli intervalli delle classi stabiliti secondo il protocollo MEDITS ad ogni 50 m.

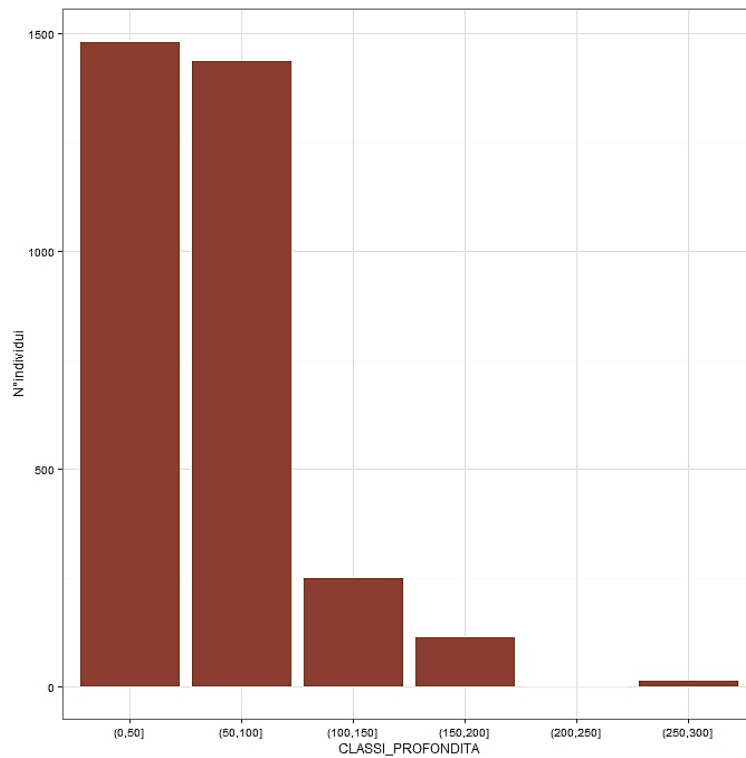


Figura 1.16 – Distribuzione dei campioni totali di *Mullus barbatus* per classi di profondità. Dal grafico si evince la predominanza delle catture nelle acque al di sotto dei 100 m di profondità.

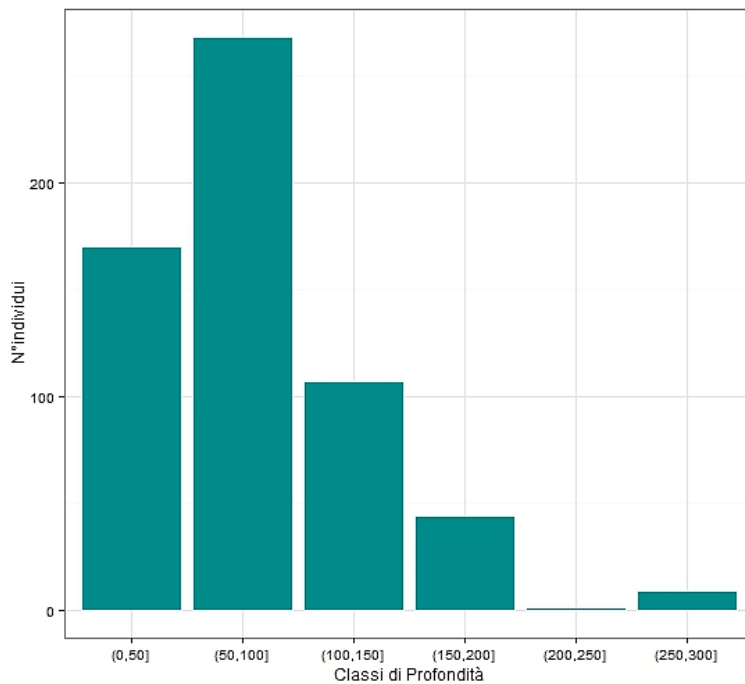


Figura 1.17 – Distribuzione dei campioni di otoliti di *Mullus barbatus* per classi di profondità. Rimane la predominanza dei campioni al di sotto dei 100 m di profondità.

Riguardo a *Mullus surmuletus*, sono state esaminate le distribuzioni di taglia per sesso dei campioni della MEDITS 2014 (Figura 1.18) e della GRUND 2002 (Figura 1.19), essendo troppo basso il numero dei campioni della MEDITS 2012.

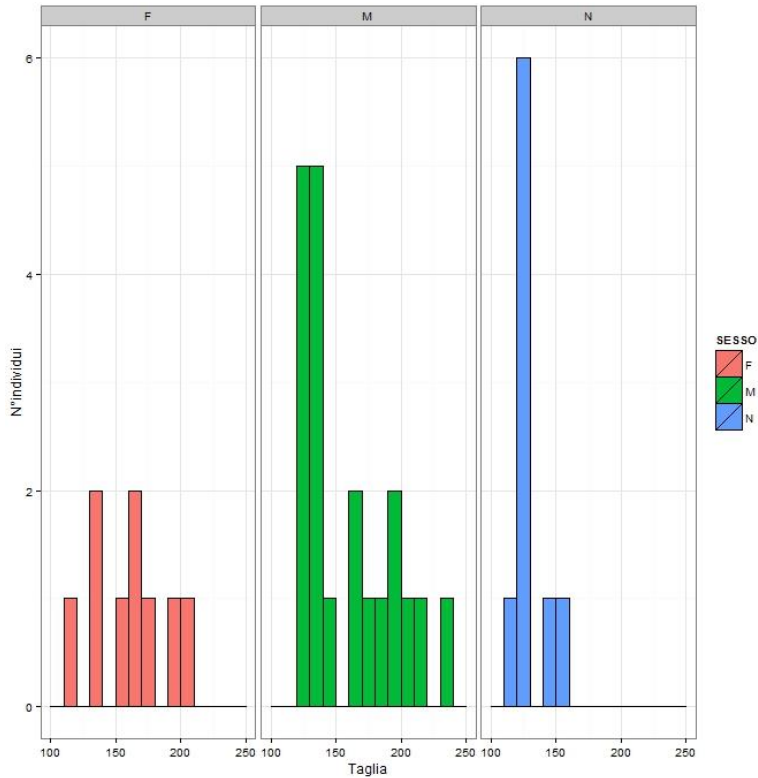


Figura 1.18 – Distribuzione delle taglie dei campioni di *Mullus surmuletus* relativi alla campagna MEDITS 2014. I campioni di maschi e femmine risultano ricoprire in maniera abbastanza uniforme gli intervalli di taglia tra i 120 e i 240 mm. I maschi tuttavia presentano un picco di individui tra i 120 e i 140 mm. In più c'è un picco di ben 6 campioni sui 38 totali tra i 120 e i 130 mm che non è stato possibile determinare (N) come maschi o femmine.

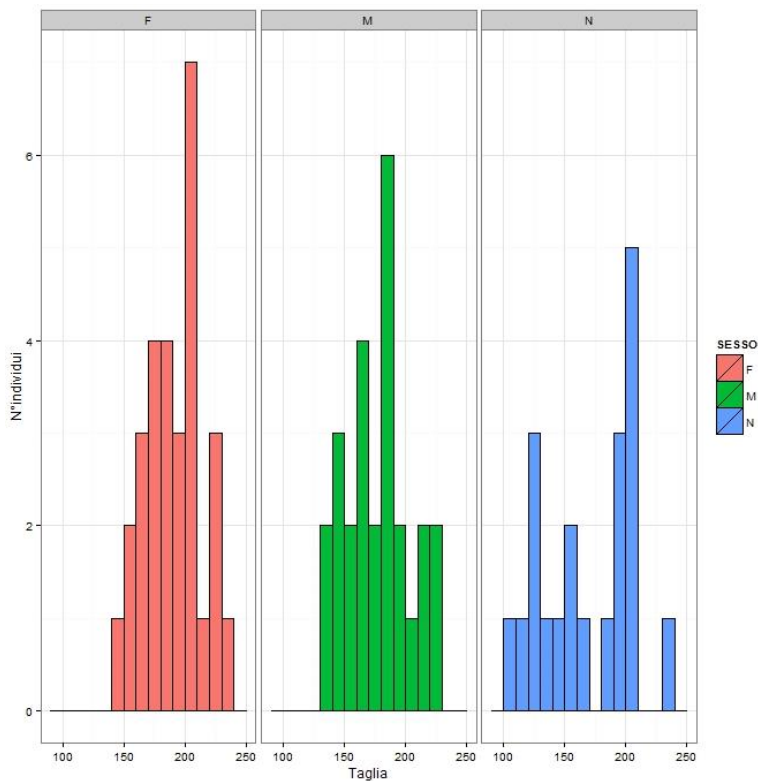


Figura 1.19 – Distribuzione delle taglie dei campioni di *Mullus surmuletus* relativi alla campagna GRUND 2002. Anche qui le taglie sono ben distribuite, con le femmine che presentano un picco nell'intervallo di taglia 200-210 mm e i maschi nell'intervallo 180-190 mm.

Dal grafico di Figura 1.18 risultano delle mancanze di campioni per alcuni intervalli di taglia, ad es. tra 140 e 150 mm, dovute principalmente alla scarsa distribuzione della specie nell'area di studio durante il periodo di campionamento.

Affinché la qualità di un campione sia buona sarebbe necessario che:

1. I campioni siano ben definiti e conservati e siano correlati di altre informazioni necessarie per le analisi, come i dati biologici previsti dalla MEDITS.
2. È raccomandata l'estrazione di entrambi gli otoliti.
3. La pulizia degli otoliti è di un'importanza fondamentale per il processo di determinazione delle età al fine di poter rimuovere tutte le membrane organiche rimaste sulla superficie.
4. Ogni paio di otoliti deve essere messo in contenitori differenti trasportabili riportanti i dati del campione (CARE, 2006).

Purtroppo però alcuni campioni risultano essere costituiti di un solo otolite o con un solo otolite sano e l'altro rotto. La rottura dell'otolite può essere dovuta sia alla delicatezza degli otoliti delle due specie in esame, e quindi alla difficoltà da parte dell'operatore di estrarli dalle cavità interne dell'orecchio, sia al processo di congelamento e scongelamento del pesce. Il pesce che arriva in laboratorio dalla motonave Andrea viene infatti riposto nelle celle frigorifere all'interno di cassette riportanti il numero della cala e analizzato successivamente dai ricercatori.

1.8 ESTRAZIONE E STOCCAGGIO DEGLI OTOLITI - Per estrarre gli otoliti è necessario aprire il cranio dei pesci, per accedere alle cavità dell'orecchio interno (Mahé *et al.*, 2009). Una conoscenza dell'anatomia dell'apparato vestibolare e della morfologia degli otoliti è importante per rimuovere gli otoliti in maniera più efficace (Stevenson e Campana, 1992). Il taglio del cranio può essere fatto in diversi modi:

1. Sezione frontale della testa – consiste in un taglio a 45° della fronte del pesce
2. Sezione frontale inversa
3. Sezione trasversale – consiste in un taglio che va dalla parte dorsale a quella ventrale della testa.

La sezione frontale è quella più comune e forse più usata per tutti i tipi di pesci, anche in realtà per gli individui del genere *Mullus* viene preferita la sezione frontale inversa (Mahé *et al.*, 2009). In questo lavoro si è deciso di utilizzare proprio la sezione frontale, ma in realtà

non è stata seguita la linea di taglio consigliata di 45° ma una linea a 90° rispetto all'asse principale del corpo dell'animale, prendendo come punto di riferimento il pre-opercolo, come si può vedere in Figura 1.20a. Una volta praticata la sezione del cranio tramite bisturi, si è proceduto all'estrazione degli otoliti con l'aiuto delle pinzette, come si può vedere dalla Figura 1.20b.



Figura 1.20 – a) Punto di incisione del cranio per la sezione frontale di un individuo di *Mullus surmuletus*.
b) Estrazione degli otoliti dalle cavità dell'orecchio interno, indicati con la pinzetta.

Il modo migliore di stoccaggio degli otoliti è conservarli in sacchetti di carta o in Eppendorf. In questo caso gli otoliti estratti di ciascun campione sono stati conservati all'interno di una Eppendorf, perché le Eppendorf hanno il vantaggio di essere sufficientemente rigide per proteggere gli otoliti dagli urti (Mahé *et al.*, 2009). Su ciascuna Eppendorf sono stati successivamente scritti il numero identificativo del campione di otoliti (ad es. OTO 100), le iniziali della specie (MB o MS), la sigla del sesso (M, F, I o N) e la taglia dell'individuo, da cui sono stati prelevati, in millimetri (ad es. F 205).

1.9 SCOPO DEL LAVORO - Data la grande importanza della pesca di queste due specie di triglia, vari aspetti della loro biologia sono stati ampiamente studiati come la riproduzione, l'alimentazione, il periodo del settlement e l'accrescimento (Lombarte & Aguirre, 1997). Lo scopo di questo studio, invece, è la determinazione della struttura di età delle due specie del genere *Mullus* in Alto-Medio Adriatico mediante la lettura degli otoliti e delle frequenze di taglia. Studi sulla determinazione delle età delle due specie in Adriatico, come visto in precedenza, hanno riguardato solamente studi di determinazione indiretta dell'età a partire dalla taglia. Data però la grande variabilità dei risultati ottenuti dai ricercatori si è pensato di

abbinare a questo tipo di analisi la lettura ed interpretazione degli anelli stagionali delle sagitte dei campioni provenienti dalle campagne MEDITS e GRUND. Studi sulla stima delle età tramite lettura degli otoliti portano alla determinazione della durata di vita dei singoli pesci all'interno di una popolazione o di una specie di una determinata area (Panfili *et al.*, 2002) per cui è possibile stabilire quanti individui riescano a superare l'inverno e giungere a maturità sessuale, e quindi al primo anno di vita, quanti riescano a raggiungere il secondo anno e così via. Queste sono informazioni fondamentali in studi di gestione della pesca e nella biologia delle risorse alieutiche.

Quello che si è cercato di fare inoltre è stato cercare di stabilire quale tecnica di laboratorio, tra la lettura degli anelli dalle immagini provenienti dall'acquisizione al computer degli otoliti, la bruciatura e la colorazione delle sezioni dell'otolite, sia la migliore per l'interpretazione delle età sia in termini qualitativi (cioè determinare quale tecnica sia realmente la migliore) che economici (cioè determinare quale tecnica sia la migliore sia come costi delle attrezzature che come tempo impiegato per ottenere i risultati).

Successivamente, con tutti i dati meristici a disposizione, si è cercato di trovare delle misure medie di taglia corrispondenti alle varie età da poter aggiungere ai dati già presenti in letteratura e risalenti agli anni '80. Questo sempre al fine di facilitare le operazioni di determinazione dell'età con la semplice misurazione della taglia, senza dover ricorrere alle interpretazioni, a volte difficili, delle immagini o alle altre tecniche di laboratorio. Il fatto inoltre di aver preso gli otoliti delle due specie del genere *Mullus* e averne fatto dei modelli di struttura di età e taglia permette di effettuare dei confronti tra le due specie ed osservarne le differenze.

Come ultima cosa, si è poi condotta un'analisi sulla lettura degli annuli giornalieri per capire se innanzitutto sia possibile osservarli e, se presenti, cercare di contare il numero di annuli tra il core dell'otolite e il settlement. Questo viene fatto soprattutto per capire la durata del periodo della fase pelagica del pesce e per cercare di risalire in maniera più precisa al periodo di schiusa delle uova.

PARTE 2 MATERIALI E METODI

2.1 LAVAGGIO DEGLI OTOLITI PER SONICAZIONE - Una volta estratti, è molto importante che gli otoliti vengano puliti al fine di rimuovere il mucus e altri depositi organici su di essi (Mahé *et al.*, 2009). La pulizia degli otoliti da questi tessuti permetterà una migliore osservazione della microstruttura dell'intero otolite (Stevenson e Campana, 1992). Per il lavaggio sono state eseguite le indicazioni del tutorial per il lavaggio tramite sonicazione, messo a punto dai ricercatori del Laboratorio di Biologia Marina e Pesca di Fano. La sonicazione prevede l'uso di onde ultrasoniche per rimuovere qualsiasi tipo di contaminante sulla superficie dell'otolite. Le procedure per la sonicazione possono essere complesse e richiedere molto tempo, specialmente quando vengono analizzati otoliti così piccoli, che possono essere facilmente rotti durante il trattamento di lavaggio (Gover *et al.*, 2014). Il protocollo prevede i seguenti passaggi:

1. Si parte mettendo circa 1 ml di acqua distillata filtrata a 0,45 µm all'interno di ogni Eppendorf per reidratare i tessuti molli delle membrane attaccate agli otoliti e si lasciano riposare per almeno 15 minuti.
2. Si inseriscono poi le Eppendorf, tramite opportuni supporti, all'interno del sonicatore Elma colmo di acqua distillata non filtrata e si programma il sonicatore per una durata di 10 minuti.
3. Una volta estratte e asciugate, le Eppendorf sono state svuotate e riempite con circa 1 ml di acqua ossigenata H₂O₂ al 3%. L'acqua ossigenata ha il compito di mineralizzare la sostanza organica sulla superficie dell'otolite e l'ossigeno gassoso svolto durante la reazione ne aiuta il distaccamento. Per evitare però che le tante bolle formate finiscano per isolare l'otolite dall'azione dell'acqua ossigenata ciascuna Eppendorf è stata agitata con un miscelatore vortex.
4. Passati 15 minuti si toglie l'acqua ossigenata e inizia un primo ciclo di lavaggio per sciacquare l'otolite dall'acqua ossigenata e dagli ultimi residui di membrana.
5. Questo ciclo di lavaggio consiste nel lasciare gli otoliti immersi in acqua distillata filtrata per 15 minuti e metterli successivamente nel sonicatore per altri 5 minuti. Questa procedura viene replicata una seconda volta con le stesse tempistiche e procedure.

6. Alla fine del secondo ciclo, tutti quei campioni che alla vista sono sembrati ancora opachi o sporchi sono stati osservati allo stereomicroscopio WILD Heerbrugg per vedere se erano ancora rimasti sull'otolite residui di membrana o i lapilli.
7. Qualora gli otoliti si siano rivelati ancora sporchi, si è proceduto alla rimozione della membrana e dei lapilli con l'aiuto di uno spillo e si è riposto il campione con gli altri ancora sporchi per un ulteriore ciclo di lavaggio.

2.2 ACQUISIZIONE DELLE IMMAGINI AL COMPUTER - Per studiare la forma e le dimensioni di ciascun otolite è stato necessario acquisire delle immagini al computer, al fine di poter utilizzare dei software particolari, come ImageJ (Rasband, 2008), per il calcolo delle varie misure quali radius dell'otolite, lunghezza del diametro massimo e minimo, area, perimetro, etc. Per poter fare questo si è posto il campione sotto stereomicroscopio a luce riflessa in immersione con acqua di mare filtrata a $0,45 \mu\text{m}$, come è possibile osservare da Figura 2.1.



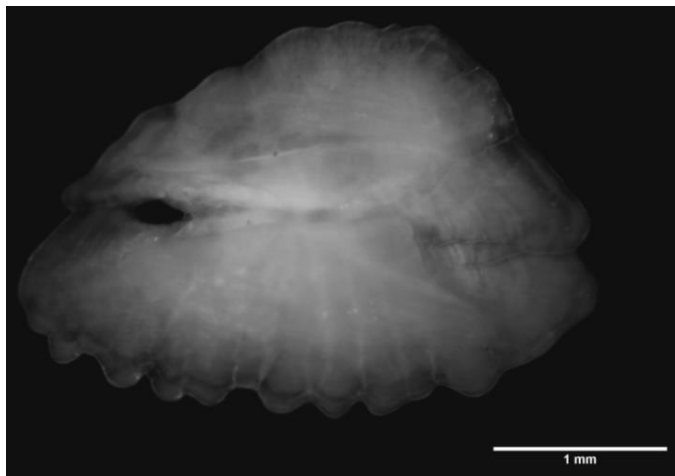
Figura 2.1 – Stereomicroscopio WILD Heerbrugg collegato alla fotocamera digitale per microscopi DCM500.

La luce può venire sia dai lati che dall'alto della superficie di osservazione e può essere orientata al fine di ottenere il miglior contrasto tra gli anelli di accrescimento. La qualità delle osservazioni viene inoltre implementata dall'uso di uno sfondo nero al di sotto della petri contenente l'otolite (Panfili *et al.*, 2002). Lo stereomicroscopio è collegato a sua volta alla telecamera per microscopi DCM500, agganciata ad un suo oculare e collegata al pc. L'acquisizione al computer viene eseguita attraverso il programma ScopePhoto 3.0 che fornisce la visione della telecamera e permette di regolare varie impostazioni di immagine come luminosità, contrasto, colori, ma soprattutto l'esposizione alla luce, importantissima al fine di ottenere un'immagine che metta in risalto le parti dell'otolite che interessano ai fini della propria ricerca. L'otolite, infatti, essendo concavo, non può essere messo a fuoco perfettamente per intero e quindi

bisogna decidere se focalizzare l'attenzione sui bordi, sul core o sul solco acustico. In questo studio si è cercato di mettere in evidenza i bordi dell'otolite, senza però perdere di vista il core, necessario per il calcolo del radius dell'otolite.

Al fine di ottenere una confrontabilità delle immagini, gli otoliti sono stati posizionati con l'asse principale rostro-postrosto in orizzontale e con l'antirostro posizionato verso l'alto, come si vede in Figura 2.2. Tutti gli otoliti sono stati acquisiti sia sul loro lato interno (che presenta il solco acustico) che sul loro lato esterno, riconoscendo inoltre per ognuno la posizione che avevano nel cranio dell'animale (destro o sinistro), per un totale di 4 fotografie per ciascun campione di *Mullus barbatus* e *Mullus surmuletus*.

Figura 2.2 – Otolite destro di *Mullus surmuletus*. Ben evidente il solco acustico, che attraversa l'otolite lungo l'asse rostro-postrosto, per cui si tratta del lato dell'otolite rivolto l'interno del cranio.



L'otolite destro, come quello in Figura 2.2, è quello che presenta il rostro verso la parte sinistra dell'immagine della faccia interna o verso la parte destra dell'immagine della faccia esterna dell'otolite. L'ingrandimento dello stereomicroscopio che è stato utilizzato per l'acquisizione è 25X. Le immagini sono poi state salvate nel database del computer con il codice dell'otolite, la sigla della posizione nel cranio del pesce (l per "left" e r per "right") e il lato (interno indicato col numero 1 ed esterno col numero 2).

Finita l'acquisizione, i campioni sono stati rimessi nelle loro Eppendorf con acqua distillata filtrata per alcune ore al fine di rimuovere l'acqua salata e, una volta rimossa l'acqua distillata, sono stati posti su una piastra elettrica ad asciugare.

2.3 MISURAZIONE DEI RADIUS – Il radius non è altro che la distanza dal core dell'otolite al postrosto, seguendo la congiungente solco-core (Mahé *et al.*, 2012), la cui misurazione è stata svolta tramite il software ImageJ (Rasband, 2008). Una volta acquisite, le

immagini degli otoliti sono state però precedentemente calibrate da pixel a millimetri per far sì che le misure potessero essere comparabili con quelle che erano state prese per la taglia del pesce. Le misure dei radius sono state effettuate per tutte e 4 le immagini di ciascun campione e sono state catalogate insieme agli altri parametri biologici nel dataset dei dati meristici degli otoliti. Successivamente sono state prese le misure dei radius dal core dell'otolite ai vari anelli di accrescimento, per 154 campioni, per poter mettere a confronto gli incrementi di materiale depositato da un anno all'altro. Sono state registrate anche le misure dei radius dal core ai falsi anelli, ove possibile.

2.4 LETTURA PRELIMINARE DEGLI ANELLI DI ACCRESCIMENTO – Una volta identificati gli incrementi, il lettore stabilisce l'età del pesce semplicemente contando il numero di anelli stagionali che incontra dal core al bordo dell'otolite (Panfili *et al.*, 2002). Generalmente un anno consiste in una zona di accrescimento opaca e una zona traslucida, con la zona opaca che risulta essere più ampia di quella traslucida, corrispondendo al periodo di accrescimento veloce (Matta & Kimura, 2012). Per poter fornire però una stima esatta dell'età sono necessarie altre informazioni quali:

1. La data di cattura
2. La data di nascita o il periodo di schiusa delle uova per una data specie
3. I principali periodi di deposizione degli anelli stagionali
4. La natura dei bordi dell'otolite (Panfili *et al.*, 2002).

La data di cattura viene registrata sui fogli di barca ed è stata riportata successivamente nella tabella dei dati meristici dei campioni di otoliti. La data di nascita, invece, spesso non è conosciuta. In alcuni casi, per convenzione, viene stabilita come data di nascita dell'intera popolazione il 1° Gennaio (Panfili *et al.*, 2002), mentre per specie che hanno la riproduzione nel periodo primaverile-estivo, viene scelto il 1° Giugno. Essendo il periodo riproduttivo di *M. barbatus* e *M. surmuletus* tra Aprile e Giugno, si assume come data di nascita comune per tutti gli individui delle due specie il 1° Giugno, come rappresentato in Figura 2.3.

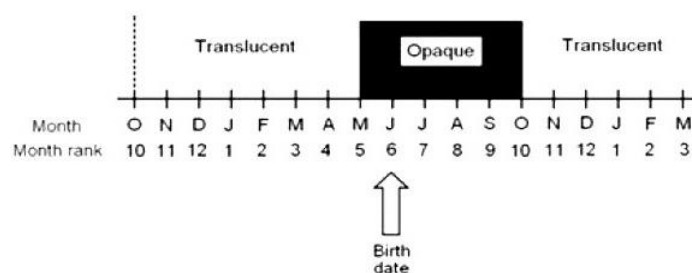


Figura 2.3 – Schema dei periodi di deposizione delle zone ialine e opache degli otoliti delle specie del genere *Mullus*

La prima zona di deposizione dell'otolite risulterà quindi opaca, mentre la zona di deposizione traslucida inizierà a formarsi intorno a Novembre-Dicembre con la venuta del periodo invernale. Molto importante poi nell'assegnazione dell'età è l'osservazione del bordo dell'otolite che può essere descritto sulla base di come appare (opaco o traslucido) e della quantità di materiale traslucido presente (O'Sullivan, 2007).

Essendo le date di campionamento della MEDITS 2012 corrispondenti al periodo Giugno-Luglio si è deciso di assegnare età uguale a 1 anno per tutti quegli individui che mostravano l'otolite terminante con la zona traslucida di spessore importante, 2 anni per tutti quelli che mostravano due zone di deposizione opaca e terminavano con il bordo traslucido e così via. È stato dato invece 0+ a tutti gli otoliti che mostravano un bordo traslucido appena accennato e che appartenevano ad individui giovanili non ancora giunti a maturità sessuale.

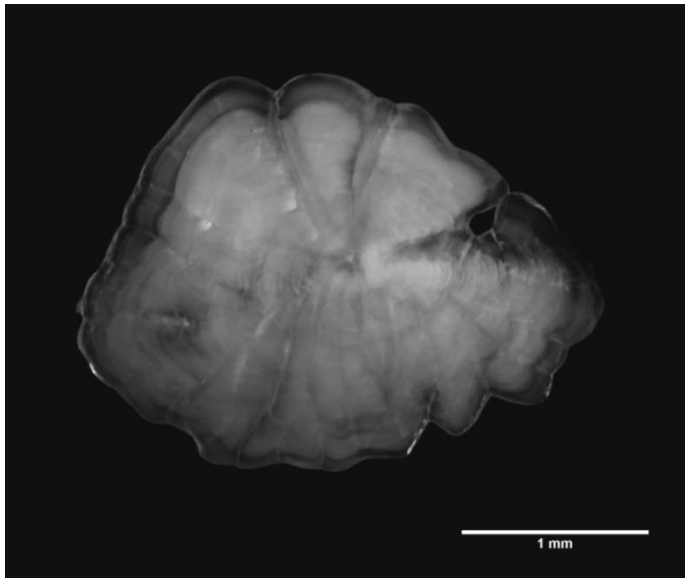


Figura 2.4 – Otolite destro di *Mullus barbatus*. La lettura di questo otolite ci dice che appartiene ad un individuo di 2 anni, essendo presenti due zone opache, separate da una netta zona ialina meno spessa, e bordo finale traslucido. Interne alla prima zona opaca sono parzialmente visibili degli anelli più traslucidi da interpretare come falsi anelli.

Uno dei problemi principali della determinazione dell'età è stato stabilire quale zona di deposizione traslucida considerare come primo anello stagionale. Infatti, come detto in precedenza, possono essere riscontrate delle zone di accrescimento irregolari nei primi mesi di vita dell'animale, che possono essere interpretabili come momenti di stress fisiologico o ambientale. Questi falsi anelli potrebbero corrispondere infatti a diversi eventi della storia di vita del pesce come il settlement, migrazioni, maturazione o deposizione delle uova (Matta & Kimura, 2012).

Discriminare gli anelli dai falsi anelli è difficile, specialmente per i lettori meno esperti, e questo può portare ad errori nella stima dell'età (Polat *et al.*, 2005). È necessario quindi stabilire un criterio di interpretazione a priori. Sieli *et al.* (2007) ha stabilito per questo

motivo di non contare le prime due bande traslucide, che appaiono come due anelli trasparenti separati da un'ampia zona opaca, perché rappresentano fasi di vita pelagica e demersale del pesce. Anche in questo studio le prime due bande traslucide sono state scartate dalla stima delle età perché sono state considerate: la prima appartenente al periodo del settlement e la seconda come falso anello. Dalle misure dei radius dal core ai vari anelli di accrescimento è emerso poi che la seconda banda traslucida è posizionata a circa 1-1.1 mm dal core dell'otolite. Questa zona è stata considerata falso anello e non anello di accrescimento stagionale per due motivi fondamentali:

1. Non è stata osservata nella maggior parte dei campioni. Dove è stato possibile, si è misurata la distanza dal core dell'otolite.
2. Si è visto che alcuni individui giovanili tra gli 80 e i 90 mm non ancora giunti a maturità sessuale raggiungono radius intorno a 1.1 mm, quindi è una distanza incompatibile per un anello di accrescimento stagionale.

Per poter essere sicuri sull'interpretazione delle età tutte gli otoliti sono stati letti due volte e successivamente sono state confrontate le misure.

2.5 SCELTA DEI CAMPIONI PER BRUCIATURA E COLORAZIONE - Tutti quei campioni che dopo la seconda lettura sono risultati ancora dubbi sono stati scelti per le analisi successive di bruciatura e colorazione. Per poter confrontare tra di loro i metodi di determinazione delle età al fine di determinare quale tra di essi sia quello più efficace sono stati presi dei campioni nei quali fossero presenti entrambi gli otoliti: un otolite è stato bruciato e l'altro è stato prima sezionato e poi colorato. In più si è cercato di selezionare campioni che prendessero tutte le classi di taglia disponibili per entrambi i sessi, al fine di poter osservare le differenze tra individui di un anno, due anni, tre anni e quattro anni. Alla fine i campioni esaminati sono stati 42, tra cui 28 di *Mullus barbatus* e 18 di *Mullus surmuletus*.

2.6 BRUCIATURA – La bruciatura (o “burning”) è una delle prime tecniche che viene utilizzata quando ci sono dei dubbi sull'interpretazione degli anelli di accrescimento (Polat *et al.*, 2005). E' infatti una tecnica rapida ed efficace, necessita infatti solamente di un piastra elettrica a temperatura regolabile o di un Becco di Bunsen e pochi secondi di attesa. Gli otoliti vengono fatti riscaldare fino al punto in cui le proteine si denaturano e il colore vira

verso il marrone, rendendo più visibili le zone di crescita invernale traslucide. La bruciatura dura da pochi secondi a pochi minuti a seconda delle specie e della dimensione degli otoliti (Panfili *et al.*, 2002). Per poter bruciare gli otoliti di *M. barbatus* e *M. surmuletus* sono stati necessari dai 20 ai 40 secondi l'uno, a seconda della dimensione dell'otoliti, su di una piastra elettrica riscaldata a 250°C. Una volta bruciato l'otolite è stato messo in immersione in una soluzione con etanolo (EtOH) al 5% sotto stereomicroscopio per l'acquisizione delle immagini e la successiva lettura degli anelli di accrescimento, secondo il metodo precedentemente indicato.

2.7 TAGLIO DEGLI OTOLITI TRAMITE TRONCATRICE – Il taglio è necessario per poter osservare le strutture interne dell'otolite. Quando le sagitte sono estremamente opache o sono troppo spesse per poter permettere che tutti gli anelli stagionali possano essere osservati sulla superficie superiore, osservare le sezioni sottili passanti per il core dell'otolite può essere molto utile. Il problema maggiore quando si taglia l'otolite è cercare di trovare il miglior piano possibile da includere con la sezione (Panfili *et al.*, 2002). In questo studio si è scelto il piano trasversale, passante lungo l'asse dorso-ventrale dell'otolite.

La tecnica scelta per il taglio degli otoliti dipende dalla strumentazione di laboratorio e dalle dimensioni degli otoliti (VanderKooy & Guindon-Tisdell, 2003). In genere lo strumento più utilizzato è la macchina troncatrice, dotata di una lama diamantata. Il taglio può essere fatto a bassa o alta velocità della lama, a seconda della delicatezza dell'oggetto da tagliare.

Gli otoliti possono essere montati direttamente sul vetrino, possono essere tagliati a mano libera oppure possono essere inclusi all'interno di una resina epossidica (VanderKooy & Guindon-Tisdell, 2003). Quest'ultimo metodo è stato quello applicato per questo studio ed è generalmente quello maggiormente utilizzato per otoliti piccoli e fragili come quelli del genere *Mullus*.

2.7.1 Caratteristiche della troncatrice - Per poter effettuare il taglio dell'otolite è stata necessaria la macchina troncatrice MICROMET, in Figura 2.5, dotata di:

1. Lama diamantata la cui velocità di rotazione è regolabile manualmente attraverso una manopola sul lato anteriore della macchina. Per il taglio degli otoliti del genere *Mullus* viene fatta girare generalmente intorno ai 3000 giri al minuto. Attivabile attraverso un pulsante di accensione.

2. Pompa con un getto di acqua (necessario per dissipare il calore di attrito della lama sul campione). Attivabile attraverso un pulsante di accensione.
3. Braccio metallico sul quale posizionare il vetrino con il campione, che scende sulla lama ad una velocità e ad una distanza regolabili.
4. Manopola di regolazione della distanza del braccio metallico dalla lama, necessaria per poter impostare lo spessore della sezione che si vuole ottenere.
5. Coperchio in plexiglass di protezione della macchina.
6. Pompa a vuoto per bloccare il vetrino al braccio mobile della macchina per tutta la durata del taglio.
7. Leva di regolazione del punto di fine corsa del braccio metallico.
8. Cestino a maglia fine per raccogliere sul fondo i prodotti del taglio.
9. Pulsante di emergenza per l'arresto della macchina



Figura 2.5 – Macchina troncitrice MICROMET con le relative parti numerate, secondo quanto elencato in precedenza.

2.7.2 Preparazione del blocchetto di resina – Il procedimento di inclusione degli otoliti nella resina viene indicato col termine “embedding”. Per la preparazione delle capsule è stata utilizzata la resina DECOR GLASS. È una resina epossidica limpida e non ingiallente. Ha una bassissima viscosità per facilitare il riempimento degli stampi, come quelli utilizzati per gli otoliti. Dopo l’indurimento presenta diverse caratteristiche quali: resistenza meccanica e chimica, facilità di pulizia, resistenza all’usura, agli agenti atmosferici e ai raggi UV ed è atossica. Viene preparata facendo una miscela tra due componenti A e B, dove A è il componente di base e B è il catalizzatore, o indurente, in proporzione tra di loro di 100:64. Il

tempo di indurimento della resina varia tra le 48 e le 60 ore. Per includere gli otoliti sono stati utilizzati dei supporti adatti a contenere un singolo otolite ed è stata effettuata una prima colata di resina fino a metà dello stampo. Passate 48 ore, l'otolite è stato posto al centro dello stampo con la concavità rivolta verso l'alto ed è stato ricoperto con altra resina, cercando di evitare la formazione di bollicine d'aria attorno all'otolite, che successivamente sarebbe stato impossibile eliminare. A questo punto tutti gli stampi sono stati lasciati riposare per 3-4 giorni per essere sicuri che la resina solidificasse e fosse così pronta per il taglio.

2.7.3 Preparazione dei vetrini per il taglio dell'otolite – I passi da seguire per poter preparare il vetrino da inserire all'interno della troncatrice per il taglio sono:

1. Sformare la resina solidificata con l'otolite all'interno
2. Segnare sulla superficie inferiore dell'incluso con un pennarello nero indelebile la linea lungo la quale si vuole fare il taglio dell'otolite. Marcare con una linea la sezione trasversale dell'otolite passante per il core dell'otolite è essenziale per allineare la lama della troncatrice (VanderKooy & Guindon-Tisdell, 2003).
3. Limare uno dei due lati del preparato creando una superficie di 90°, che poi aderirà sul vetrino
4. Mettere a scaldare sulla piastra a 120° il vetrino e, una volta caldo, posizionare in basso al centro un pezzetto di crystal bond, un cemento termoplastico adesivo allo stato solido con una grande forza legante a metalli, vetro e ceramiche.
5. Una volta sciolto il crystal bond, posizionare sopra di esso il preparato con l'otolite sul lato limato, assicurandosi che la parte concava dell'otolite risulti rivolta verso il basso.
6. Togliere il vetrino dalla piastra e lanciarlo raffreddare, di modo che la resina cristallizzi di nuovo intorno al preparato.

2.7.4 Procedura da eseguire per il taglio – Una volta preparati tutti i vetrini si procede al taglio degli otoliti secondo i seguenti passaggi:

1. Accendere il motorino e posizionare il vetrino con il campione nell'apposito alloggiamento del braccio metallico della troncatrice.
2. Chiudere la copertura di plexiglass e avvicinare il braccio con il campione verso la lama attraverso il tasto SKIP.

3. Assicurandosi che la velocità di discesa del braccio sia ancora a 0, regolare la distanza del braccio dalla lama in modo che la lama capiti esattamente in corrispondenza del tratto segnato col pennarello all'inizio.
4. Una volta regolato il tutto, azionare il getto dell'acqua e la rotazione della lama con i relativi tasti di accensione (ON) e azionare la velocità di discesa automatica del braccio alla velocità desiderata (4).
5. Non appena si stacca la metà tagliata da quella ancora aderente al vetrino premere il pulsante di emergenza per stoppare la rotazione della lama oppure attendere che il braccio arrivi a fine corsa.
6. A questo punto bisogna regolare lo spessore della fettina che si vuole ottenere dell'otolite regolando la manopola della distanza del braccio dalla lama. Lo spessore ideale per fare una fettina sufficientemente sottile ma allo stesso tempo manovrabile è di 200 μm .
7. Una volta regolato lo spessore, disinserire l'interruttore di sicurezza e azionare nuovamente la macchina.
8. Finito il taglio della sezione, premere nuovamente il pulsante di emergenza, prelevare dal fondo della macchina i prodotti del taglio (metà e fettina) e staccare il vetrino dal braccio della macchina, spegnendo il motorino per il vuoto.

2.8 COLORAZIONE – La colorazione è un altro metodo di preparazione degli otoliti per poter rilevare gli anelli stagionali che ad occhio nudo non è possibile osservare. Diversi tipi di coloranti biologici sono stati usati nel tempo. Per l'analisi degli otoliti delle due specie del genere *Mullus* sono stati scelti due tipi diversi di colorante: il blu di toluidina e il rosso neutro (Panfili *et al.*, 2002).

2.8.1 Acquisizione immagini delle sezioni pre-trattamento – Prima di poter procedere con la colorazione delle sezioni di otoliti occorre fare un'acquisizione delle immagini dei campioni pre-trattamento di modo da poter osservare le differenze riscontrate nella lettura degli anelli senza e con i coloranti. L'acquisizione è stata svolta in immersione con acqua salata di mare filtrata a 0.45 μm con lo stesso procedimento utilizzato in precedenza per l'acquisizione delle facce di tutti gli otoliti ed è stata fatta solamente per le due facce della

sezione, come l'esempio in Figura 2.6a e in Figura 2.7a, non per le due metà di otolite rimanenti.

2.8.2 Tecniche di colorazione – Per colorare gli otoliti si possono utilizzare due tipi diversi di colorante: il blu di toluidina e il rosso neutro. Tutte le sezioni di otoliti sono state trattate con entrambi i coloranti, uno per ogni lato, al fine di poter stabilire quale dei due fosse quello che aderisse meglio all'otolite e ne esaltasse al meglio gli anelli di accrescimento. L'efficacia del colorante non dipende dal colorante in sé ma dal tipo di proteine presenti all'interno dell'otolite. Queste proteine, anche se vanno sotto il nome di otolitina, in realtà differiscono da specie a specie per la grande varietà di gruppi funzionali che possono avere gli aminoacidi (Panfili *et al.*, 2002). Non c'è quindi un colorante che vada bene a priori, ma vanno testati entrambi al fine di stabilire quale sia il migliore. Prima di poter applicare il colorante è necessario però fare l'etching, cioè l'eccitazione degli anelli tramite un acido, l'EDTA (acido EtilenDiamminoTetraAcetico). Questo acido carbossilico va applicato prima del trattamento col blu di toluidina e lasciato agire solo per pochi secondi, circa 30. Il rosso neutro, invece, viene preparato mettendo ogni 100 ml di agente colorante 0,5 ml di acido acetico glaciale (Mahé *et al.*, 2009), che è quindi il responsabile dell'etching. Il procedimento che va applicato per la colorazione dei prodotti del taglio dell'otolite è il seguente:

1. Disporre sul vetrino la fettina e le due metà del preparato dell'otolite e metterlo sotto allo stereomicroscopio ad ingrandimento 25X. Le due metà verranno colorate con coloranti diversi mentre la fettina verrà colorata inizialmente su un lato e, successivamente sull'altro lato con il colore speculare.
2. Applicare il rosso neutro su una metà e sulla fettina attraverso l'utilizzo di una pipetta Pasteur e lasciar riposare per 15-20 minuti.
3. Applicare l'EDTA sull'altra metà della pasticca e lasciar riposare per circa 30 secondi.
4. Rimuovere l'EDTA con l'aiuto di un pezzo di carta assorbente e applicare il blu di toluidina sulla metà di pasticca e lasciar riposare per 5 minuti.
5. Una volta passato il tempo necessario per far assorbire il colore all'otolite, il colore viene rimosso con della carta assorbente e viene passata dell'acqua distillata per rimuovere il colore in eccesso.

6. Una volta acquisita, la sezione viene ribaltata, trattata con EDTA e colorata col blu di toluidina, come visto sopra, per il confronto.

2.8.3 Acquisizione delle immagini post-trattamento e lettura delle età – Una volta colorate, le sezioni sono pronte per poter essere osservate sotto stereomicroscopio WILD, stavolta non in immersione con acqua di mare e senza dischetto nero sul fondo. Per l'acquisizione delle immagini viene sempre utilizzato il programma Scopephoto 3.0 ma stavolta, vista la colorazione delle sezioni, le foto vengono effettuate sia in bianco e nero che a colori. L'ingrandimento del microscopio utilizzato per le fotografie è stato il 25X. Non è stato possibile effettuarle con l'ingrandimento 50X per motivi dimensionali di inquadratura delle sezioni e soprattutto per scarsa esposizione alla luce. Le foto sono state poi salvate nel database del computer con la seguente denominazione: campione_ingrandimento del microscopio_ tipo di immagine (bianco e nero "bw" o colori "color") tipo di colorante (blu "blue" o rosso "red").

Una volta ultimata l'acquisizione delle immagini i resti delle sezioni sono stati riposti all'interno di nuove Eppendorf denominate con il codice del campione relativo alle sezioni.

A questo punto, avendo le immagine pre- e post-trattamento si è passati al confronto tra di esse, come è ben visibile in Figura 2.6 e in Figura 2.7, e alla lettura degli anelli stagionali.

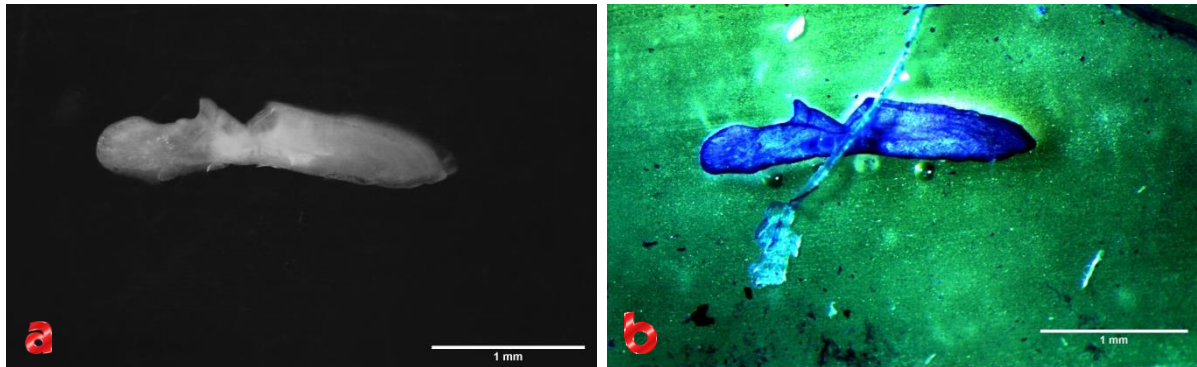


Figura 2.6 – a) Sezione pre-trattamento di un otolite di *Mullus surmuletus* risalente alla campagna GRUND 2002. b) Sezione dopo trattamento con blu di toluidina

Come si può osservare dalle Figure 2.6 e 2.7, le immagini delle sezioni prima del trattamento mostrano una colorazione opaca piuttosto omogenea, che non rende possibile la lettura degli anelli stagionali, mentre le immagini che seguono il trattamento con i coloranti risultano essere più facilmente leggibili. Il colorante infatti esalta le zone traslucide rispetto a quelle opache, rendendole così maggiormente individuabili.

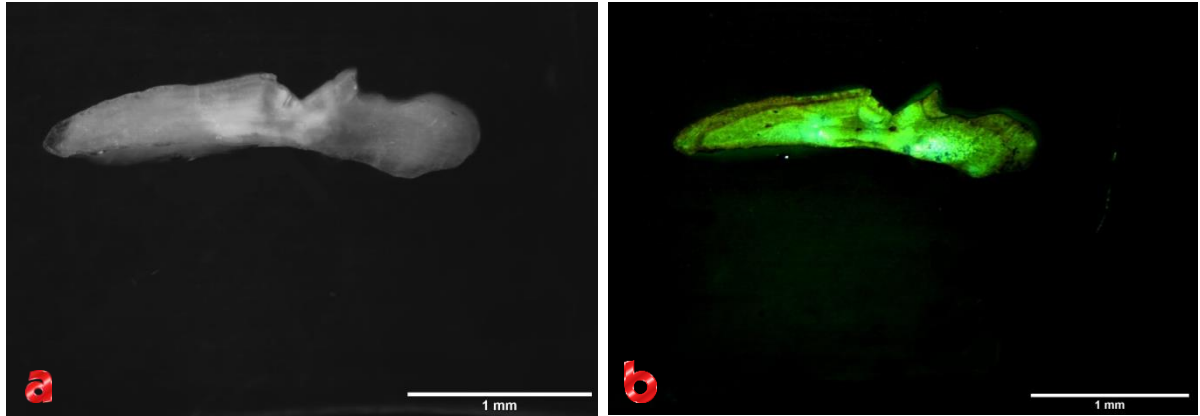


Figura 2.7 – a) Sezione opposta dell’otolite di Figura 2.6 prima del trattamento. b) Sezione dell’otolite trattata con rosso neutro

A conferma di questo, dalle Figure 2.6b e 2.7b è possibile vedere distintamente la presenza di un’altra zona traslucida, oltre quella del bordo dell’otolite, dunque si può dare all’individuo età pari a 2 anni.

2.9 LETTURA ANNULI GIORNALIERI – Per la lettura degli annuli giornalieri sono stati selezionati gli otoliti degli individui indeterminati (I) appartenenti alla specie *Mullus barbatus*, non essendo stati trovati individui immaturi di *Mullus surmuletus*. Sono stati scelti gli indeterminati per la minore quantità di materiale inorganico e organico depositato sull’otolite, che comporta un minor tempo nella lavorazione dell’otolite per l’asportazione del materiale stesso dalla superficie contenente il core dell’otolite e gli annuli di accrescimento giornaliero. Sono stati quindi presi in esame 19 campioni.

2.9.1 Scelta e preparazione del campione – Anche in questo caso gli otoliti debbono essere montati su un vetrino per poter essere osservati successivamente a microscopio ottico. Quindi per quanto riguarda la preparazione dei campioni i passi da seguire sono:

1. Mettere una goccia di resina epossidica DECOR GLASS al centro di un vetrino e incollare un pezzetto quadrato di vetro sottile sul quale andrà appoggiato l’otolite
2. Lasciare asciugare la resina anche per una giornata
3. Applicare un’altra goccia di resina al centro del vetrino e posizionare l’otolite con la concavità rivolta verso l’alto e l’asse rostro-postrostro parallelo al lato lungo del vetrino.
4. Lasciare asciugare il campione, questa volta, anche due-tre giorni.

2.9.2 Lettura degli annuli a microscopio ottico – Prima di poter svolgere la lettura degli annuli giornalieri a partire dal core dell'otolite è stato necessario levigare e lucidare il campione al fine di poter facilitare le operazioni di lettura al microscopio ottico Leitz Wetzlar. Per eliminare il surplus di resina che è andata a finire sulla superficie e sui bordi dell'otolite bisogna levigare il campione con la carta vetrata da 30 μm . La levigatura viene eseguita sfregando il vetrino contro la carta vetrata bagnata con dell'acqua distillata al fine di evitare che l'attrito tra vetrino e carta asporti via l'otolite o lo consumi eccessivamente. Una volta eliminato il grosso del materiale in esubero continuare a levigare la superficie con carte di spessore via via inferiore, iniziando con quello a 9 μm e continuando con quelli a 5 μm , 3 μm e infine 1 μm . Ogni tanto durante questa fase di levigatura bisogna controllare al microscopio ottico lo stato di levigatura, osservando, tramite la messa a fuoco del microscopio, lo spessore dell'otolite da levigare per poter arrivare al core. Avendo posizionato l'otolite col solco rivolto verso la superficie del vetrino e con la concavità rivolta verso l'alto, per poter arrivare ad osservare il core è necessario consumare i bordi dell'otolite. Svolgere le stesse operazioni con la concavità dell'otolite rivolta verso il basso avrebbe significato andare ad asportare subito il core con le prime operazioni di levigatura e quindi questo avrebbe reso inutilizzabile il campione per l'analisi.

Una volta arrivati al punto in cui il piano di levigatura coincide col piano del core si mette il campione all'interno del sonicatore per circa un minuto per pulirlo dall'eventuale polvere accumulatasi durante la levigatura e lo si acquisisce al microscopio ottico Leitz ad ingrandimento 40X, come l'esempio di Figura 2.8a. Infine per mettere in risalto gli annuli giornalieri viene eseguito l'etching mettendo una goccia di EDTA sull'otolite per circa 20-30 secondi e si riacquisisce l'immagine a microscopio, come l'esempio di Figura 2.8b.

A questo punto si procede con la lettura degli annuli dal core fino a dove è possibile osservarli. Quello che si è cercato di fare in questo lavoro è stato contare gli annuli fino al settlement, indicato anche con la sigla MC (Metamorphosis Check) e rappresentato da un annulus di spessore maggiore. Dopo l'MC cambia il tasso di deposizione degli annuli giornalieri e diventa molto più difficile osservarli. In alcuni campioni, come quello della Figura 2.8, è presente inoltre un piccolo annulus circolare appena attorno al core, visibile soprattutto dopo l'etching. Questo annulus segna il venuto assorbimento del sacco vitellino da parte della larva e viene indicato dalla sigla FFC (First Feeding Check).

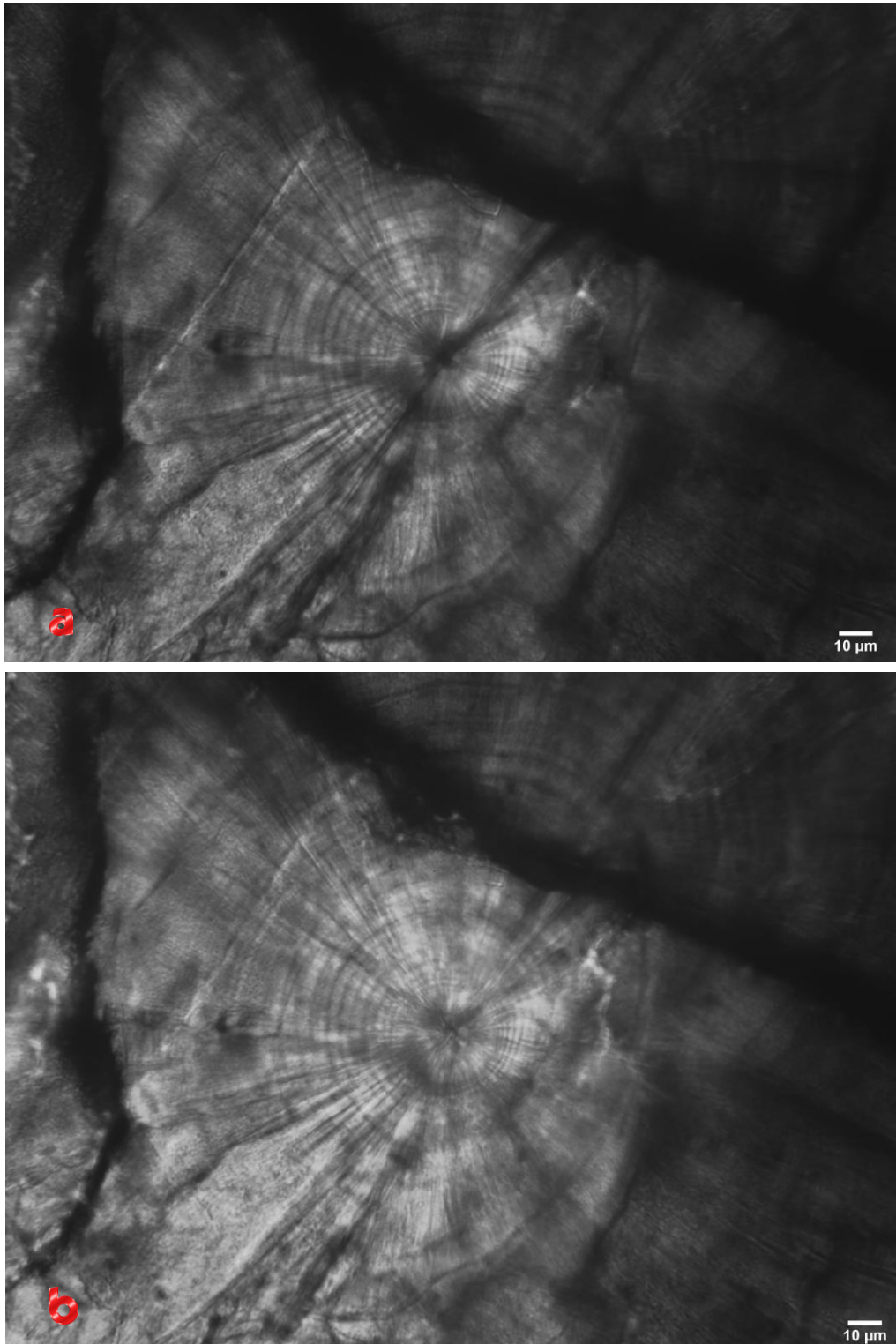


Figura 2.8 – a) Anni giornalieri di un giovanile di *Mullus barbatus*, dopo levigatura e lucidatura. b) Anni giornalieri dello stesso individuo, dopo l'etching con EDTA.

Le tecniche di levigatura è una tecnica molto invasiva per otoliti molto piccoli, come quelli dei giovanili di *Mullus barbatus*, e spesso si rischia di rompere l'otolite in corrispondenza

del core, impedendo così la lettura degli annuli, o di consumare troppo l'otolite ed asportare via il core. Per questi motivi solo a 7 dei 19 campioni è stato possibile leggere gli annuli dal core, mentre tra i restanti 12 alcuni sono andati persi e ad altri è stato possibile osservare gli annuli solo parzialmente.

2.10 ANALISI STATISTICA – La parte iniziale, precedente l'analisi dati, di tabulazione dei dati meristici e delle stime di età tramite le differenti tipologie, viste in precedenza, è stata gestita tramite Excel, mentre la parte relativa all'analisi dati vera e propria e alla rappresentazione grafica è stata curata tramite il software Rstudio (Rstudio, 2015). I dataset che sono stati analizzati con R sono quindi: quello relativo a tutti i dati meristici dei 3309 campioni iniziali di *Mullus barbatus*, quelli relativi ai dati meristici, compresi i dati di età e radius, per quanto riguarda i campioni di otoliti delle due specie (separando per *Mullus surmuletus* i dati provenienti dalle tre diverse campagne) e quello relativo alle misure dei radius core-anelli.

Per poter essere importati in R, i dati delle tabelle excel sono stati convertiti in file testo “.txt”. Sono state poi caricate su Rstudio (Rstudio, 2015) tutte le librerie necessarie per condurre le varie analisi tra cui ggplot2, per la parte grafica, e FSA, per l'analisi sulle frequenze di taglia e sull'accrescimento. Sono stati scartati dall'analisi tutti gli otoliti di vaterite, che comunque risultavano essere solo uno per coppia di otoliti, e un campione che presentava delle sagitte malformate. Sono risultati quindi 599 campioni di *Mullus barbatus*, invece di 600, mentre per quanto riguarda i dati *Mullus surmuletus* non sono state apportate modifiche.

2.10.1 Analisi grafica - La parte grafica riguarda sia la struttura dei campioni di *Mullus barbatus* totali, cioè quei 3309 di cui sono stati presi i campioni di otoliti, che dei campioni di cui sono stati estratti gli otoliti di entrambe le specie. Sono state esaminati infatti:

1. Distribuzione degli individui campionati per gli otoliti per età al fine di poter osservare la struttura di età dei campioni.
2. Distribuzione delle taglie e delle età per classi di profondità sia per i campioni totali che per i campioni di otoliti e sia in generale che separata per sesso. È stato poi fatto un confronto per vedere se la distribuzione dei campioni rispecchiasse quella della popolazione e quindi se il campionamento fosse stato effettuato secondo i giusti criteri.

Le classi di profondità sono 6 e sono quelle previste dal protocollo MEDITS ogni 50 m, mentre le classi di taglia sono 4: 0-100 mm (comprende tutti i giovanili e gli individui ancora immaturi), 100-150 mm, 150-200 mm e 200-250 mm.

3. Distribuzione delle taglie e delle età per classi di latitudine sia per i campioni totali che per i campioni di otoliti, in generale e separata per sesso. Le classi di latitudine sono invece 3 e prevedono come punti di riferimento la latitudine massima raggiunta con le cale della MEDITS (45.63618), la latitudine minima (41.5) e la latitudine di due punti intermedi tra i due estremi. A tal fine sono state scelte la latitudine di Rimini (44.05917) e la latitudine di San Benedetto del Tronto (42.93336).
4. Distribuzione delle taglie per età per metodo di lettura degli anelli, per poter osservare le differenze nelle distribuzioni tra le varie tecniche.
5. Relazione taglia-età sia in generale che separata per sesso.
6. Confronto tra le strutture di taglia delle due specie di *Mullus*
7. Relazione taglia-peso, sia in forma standard che linearizzata mediante i logaritmi.
8. Relazione tra la lunghezza dei radius e la lunghezza totale per poter osservare come varia l'accrescimento dell'otolite con l'accrescimento somatico del pesce.
9. Relazione tra la lunghezza dei radius e l'età per poter stabilire una lunghezza di radius media per ogni età.

2.10.2 Analisi dati – Alla parte grafica delle relazioni precedentemente elencate segue poi l'analisi dei dati.

Per quanto riguarda la relazione tra lunghezza dei radius e la lunghezza totale per stabilire l'allometria delle due specie e la relazione tra radius ed età è stato applicato il modello lineare.

Riguardo, invece, alla relazione taglia-età sono state create delle chiavi età-taglia, indicate anche con la sigla ALK che sta per "Age-Length Key". Queste chiavi sono state ottenute suddividendo inizialmente le taglie in classi di taglia di 10 mm ed osservando il numero di pesci delle varie "x" età per una data "y" taglia e le proporzioni di queste età rispetto al totale di individui di una classe di taglia "y". Una volta calcolati anche il numero e le proporzioni di individui per ogni "x" età, sono stati calcolati la media, la deviazione standard, e l'errore standard delle taglie per ogni classe di età. Infine è stata effettuata l'Analisi della Varianza

per poter osservare se ci fossero delle differenze significative nella distribuzione delle taglie per ogni classe di età tra maschi e femmine.

In merito alle strutture di taglia, per prima cosa sono state ricavate le curve di distribuzione cumulativa delle frequenze riguardanti le taglie sia di *Mullus barbatus* che di *Mullus surmuletus* e successivamente sono stati eseguiti dei confronti multipli tra le taglie dei campioni di otoliti di *Mullus barbatus* e quelle di *Mullus surmuletus* del 2014 e 2002, testando le differenze tra le distribuzioni a confronto col test a due vie di Kolmogorov-Smirnov.

Riguardo alla relazione lunghezza-peso è stato utilizzato anche in questo caso il modello di regressione lineare da cui sono stati estratti i parametri a e b dell'equazione che lega peso (P) e lunghezza (L) $P = a L^b$ e i relativi intervalli di confidenza. È stata poi testata la differenza tra i due logaritmi di Peso e Lunghezza con l'Analisi della Varianza.

In merito all'accrescimento sono stati calcolati inizialmente i valori iniziali per l'equazione di Von Bertalanffy di L_{∞} , k e t_0 . È stata poi creata la funzione definita per la VBGF (Von Bertalanffy Growth Function) e sono state calcolate le taglie medie per ogni classe di età. Sono stati successivamente calcolati i parametri della VBGF ed estratti gli intervalli di confidenza. Infine sono stati realizzati due modelli separati per maschi e femmine, messi successivamente a confronto.

Riguardo invece al dataset sulle misure dei radius, sono stati calcolati gli incrementi nella misura dei radius tra un anno e l'altro e sono stati plottati su un boxplot. È stata testata la normalità delle distribuzioni degli incrementi col test di Shapiro ed è stata poi fatta l'ANOVA per verificare le differenze nelle distribuzioni degli incrementi con il sesso. È stato anche visto se ci fossero differenze significative tra gli incrementi dei vari anni, applicando il test di Kolmogorov-Smirnov a coppie.

Come ultimo punto riguardante l'analisi degli annuli giornalieri, sono stati letti gli annuli dal core al settlement per i 6 campioni visti in precedenza e le misure sono state inserite in un dataset. Successivamente si è calcolato il tempo medio di vita pelagica del pesce.

PARTE 3 RISULTATI

3.1 PARTE GRAFICA– Vengono riportati i risultati relativi all’analisi grafica

3.1.1 Struttura di età dei campioni delle due specie del genere Mullus – I grafici di Figura 3.1, Figura 3.2 e Figura 3.3 mostrano le distribuzioni dei campioni a cui sono stati estratti gli otoliti per età in entrambe le specie. Per *Mullus surmuletus* sono state analizzate le distribuzioni relative alle campagne MEDITS 2014 e GRUND 2002. Per quanto riguarda i 5 campioni della MEDITS 2012 sono risultati essere due di 2 anni e tre di 3 anni.

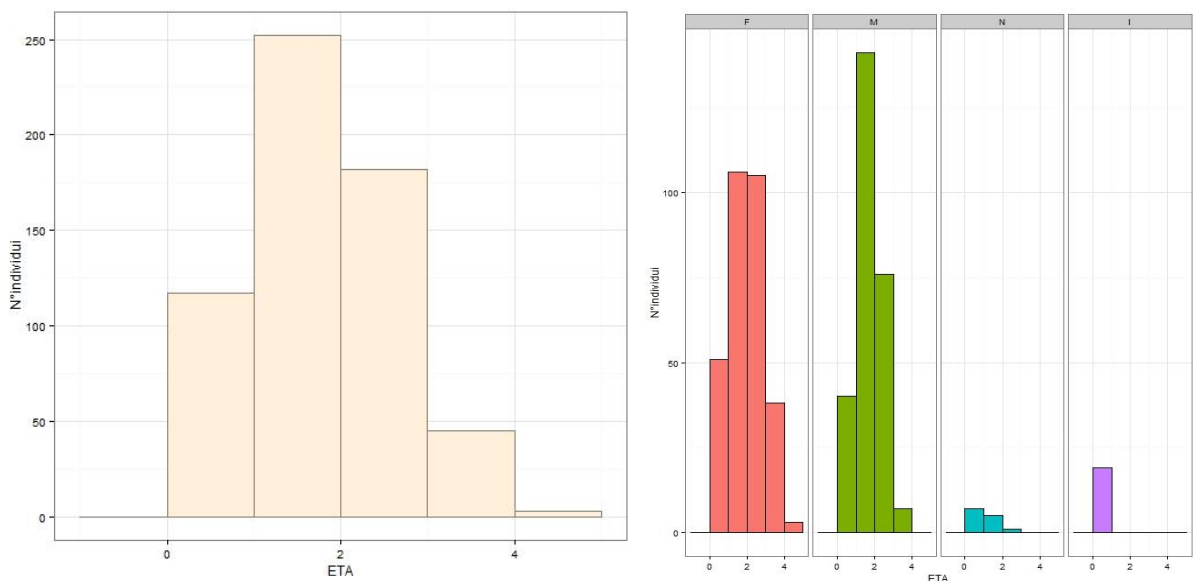


Figura 3.1 – Distribuzione dei campioni di *Mullus barbatus* per età (sinistra) e separato per sesso (destra)

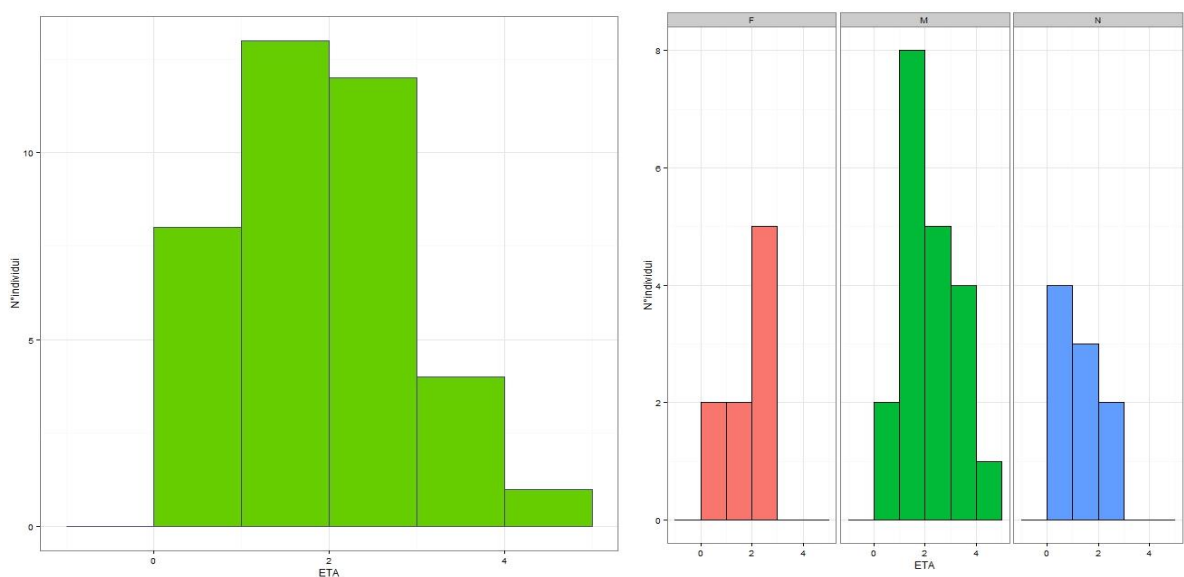


Figura 3.2 – Distribuzione dei campioni di *Mullus surmuletus* per età (sinistra) e separato per sesso (destra) relativi alla campagna MEDITS 2014

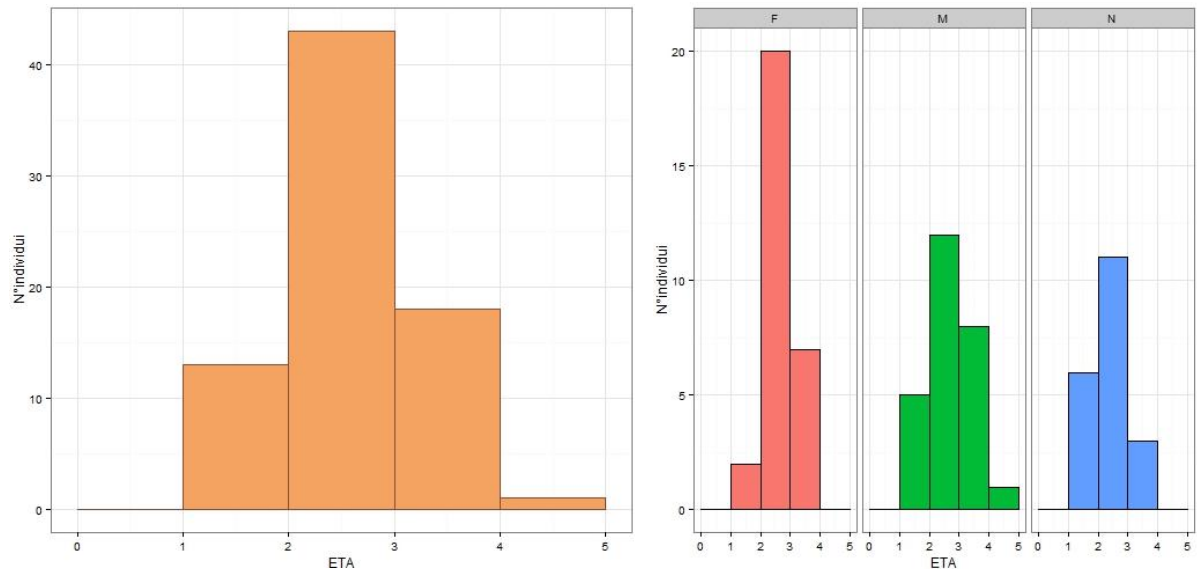


Figura 3.3 – Distribuzioni dei campioni di *Mullus surmuletus* per età (sinistra) e separato per sesso (destra) relativi alla campagna GRUND 2002

Successivamente sono stati calcolati il numero totale dei campioni analizzati di entrambe le specie per ogni età, la proporzione rispetto al totale (%) e l'errore standard (es). Riguardo alla specie *Mullus barbatus* abbiamo i seguenti dati di Tabella 3.1.

ETA'	N° individui	% frequenza	ds
0+	117	19,53	1,62
1	252	42,07	2,02
2	182	30,38	1,90
3	45	7,52	1,10
4	3	0,50	0,24

Tabella 3.1 – Dati di n° di individui e frequenza nelle varie classi di età di *Mullus barbatus*

E' possibile notare come gli individui di 1 anno di vita siano quelli più frequenti all'interno della distribuzione con il 42,1%, seguiti dagli individui di 2 anni, dagli 0+, da quelli di 3 anni e infine da quelli di 4. Osservando poi nel dettaglio le distribuzioni delle età per sesso si può vedere come nei maschi sia ben evidente il picco di individui di 1 anno rispetto alle altre età, mentre nelle femmine siano ben rappresentate tutte le età. Sono infatti assenti individui maschili di 4 anni di età e molto pochi sono risultati essere di 3 anni, rispetto alle femmine.

Riguardo alla specie *Mullus surmuletus* della campagna MEDITS 2014 è possibile notare, da Tabella 3.2, come gli individui di 1 e 2 anni di vita siano molto frequenti, con oltre il 30% di frequenza, seguiti dagli individui 0+, da quelli di 3 anni e infine da quelli di 4 anni. Dalla distribuzione differenziata per sesso si può osservare come siano i maschi a contribuire al picco degli individui di 1 anno di vita, mentre le femmine sono maggiormente di 2 anni.

ETA'	N° individui	% frequenza	ds
0+	8	21,05	6,76
1	13	34,21	7,94
2	12	31,58	7,85
3	4	10,53	3,99
4	1	2,63	0,41

Tabella 3.2 – Dati di n° di individui e frequenza nelle varie classi di età di *Mullus surmuletus* della campagna MEDITS 2014

Diversa invece è la distribuzione dei campioni di *M. surmuletus* della campagna GRUND 2002, come si vede in Tabella 3.3. Si può infatti già notare come manchino individui giovanili di età 0+ a causa del campionamento invernale e delle maglie delle reti a strascico maggiori rispetto a quelle utilizzate per la MEDITS.

ETA'	N° individui	% frequenza	ds
1	13	17,33	4,30
2	43	57,33	5,93
3	18	24,01	5,16
4	1	1,33	1,53

Tabella 3.3 – Dati di n° di individui e frequenza nelle varie classi di età di *Mullus surmuletus* della campagna GRUND 2002

Mostrano una maggiore frequenza di individui di 2 anni corrispondente ben al 57,3%, seguono poi gli individui di 3 anni, quelli di 1 anno e quelli di 4. Nei grafici separati per sesso di *M. surmuletus* di entrambe le campagne si nota poi come ci sia una proporzione di individui non determinati (N) maggiore rispetto a *M. barbatus*.

3.1.2 Distribuzione delle taglie e delle età per classi di profondità – Le distribuzioni delle taglie per classi di profondità sono state rappresentate per i campioni totali e di otoliti di *Mullus barbatus*, messe a confronto in Figura 3.4, e per i campioni di otoliti di *Mullus surmuletus* delle campagne MEDITS 2014 e GRUND 2002, in Figura 3.5. Per ogni specie sono stati effettuati un numero di grafici ad istogrammi pari al numero delle classi di profondità (6), con tali istogrammi suddivisi in base al sesso.

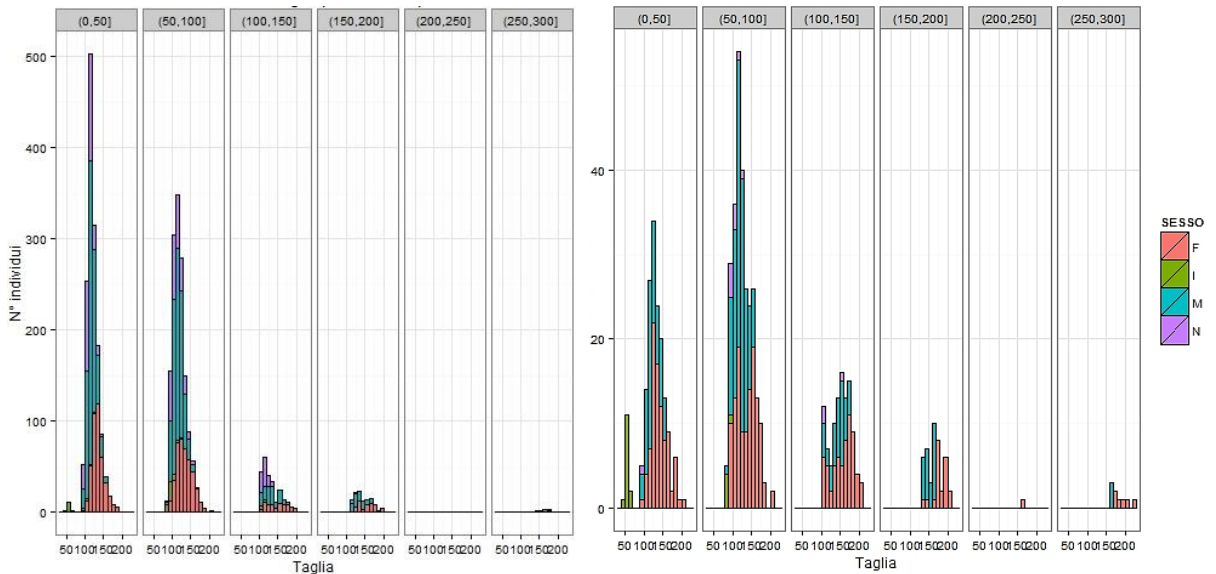


Figura 3.4 – Distribuzione delle frequenze di taglia di *Mullus barbatus* per classi di profondità. Il grafico a sinistra mostra le distribuzioni relative ai campioni totali, mentre quello a destra ai campioni a cui sono stati estratti gli otoliti

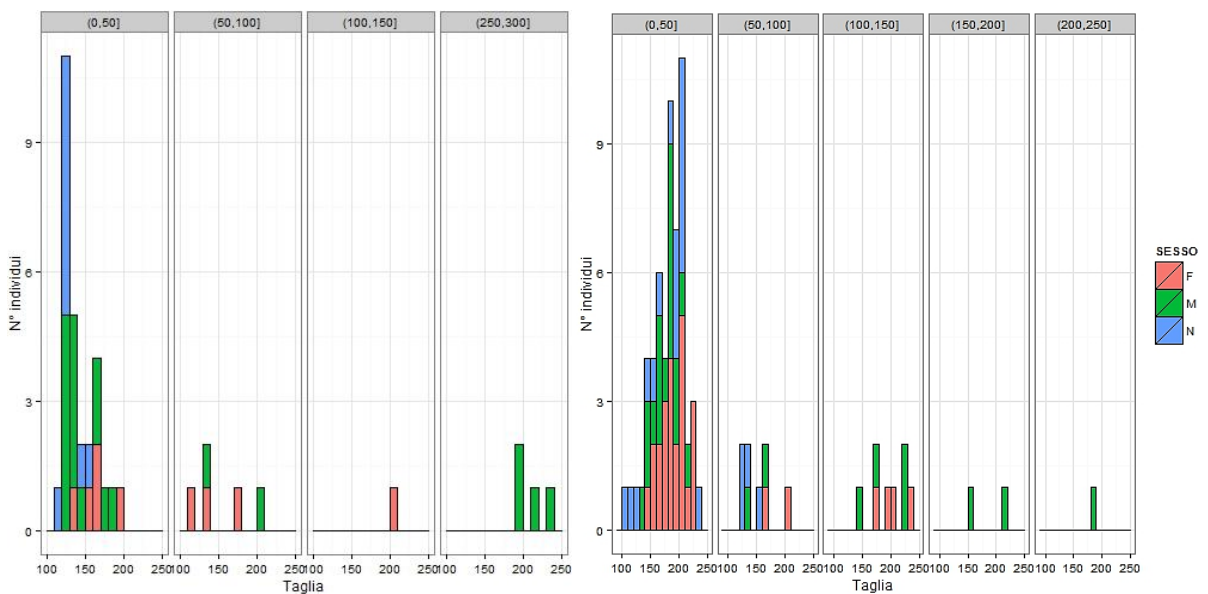


Figura 3.5 – Distribuzione delle frequenze di taglia di *Mullus surmuletus* per classi di profondità. Il grafico a sinistra è relativo ai campioni della MEDITS 2014, quello a destra ai campioni della GRUND 2002

Dai grafici precedenti risulta chiaramente come la fascia batimetrica preferita da entrambe le specie del genere *Mullus* sia quella tra 0 e 50 m. In realtà per *M. barbatus* tale preferenza può essere estesa anche per la fascia 50-100 m, mentre le fasce successive risultano poco frequentate. Sono stati pescati infatti 253 individui sui 3309 totali tra i 100 e i 150 m, 117 tra i 150 e i 200 m, 2 tra i 200 e i 250 m e 15 tra i 250 e i 300 m, per un totale corrispondente al 11,7% dei campioni analizzati, contro l'88,3% degli individui pescati entro i primi 100 m di profondità. Per *M. surmuletus*, come appena detto, le frequenze maggiori si riscontrano a profondità tra 0 e 50 m con il 73,3% dei campioni relativi alla campagna GRUND 2002 e il 73,6% dei campioni della campagna MEDITS 2014. All'interno di queste distribuzioni le taglie più frequenti entro i 100 m di *M. barbatus* risultano essere quelle tra i 100 e i 130 mm, mentre quelle entro i 50 m di *M. surmuletus* risultano essere tra i 120 e i 130 mm per i campioni MEDITS 2014 e tra i 180 e i 210 mm.

In Figura 3.6, 3.7 e 3.8 invece sono rappresentate le distribuzioni delle età delle due specie per classi di profondità.

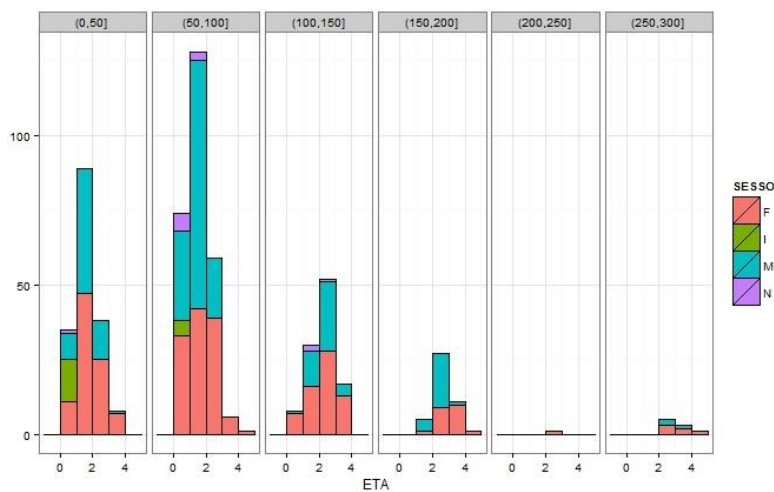


Figura 3.6 – Distribuzione delle età per classi di profondità dei campioni di *Mullus barbatus*

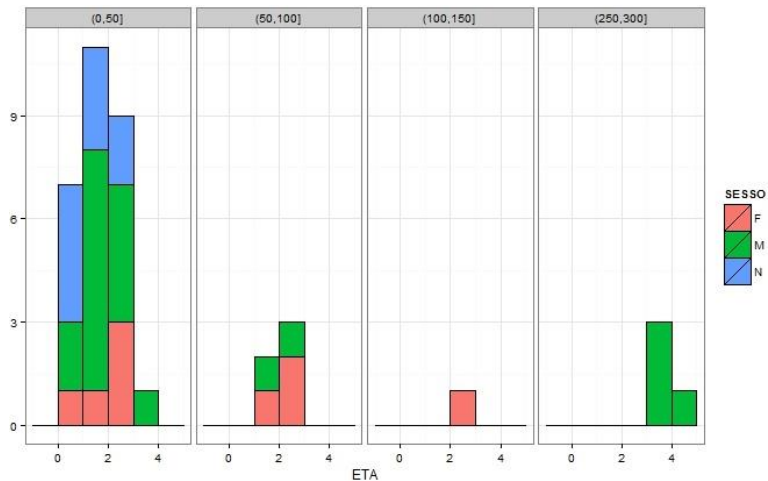


Figura 3.7 – Distribuzione delle età per classi di profondità dei campioni di *Mullus surmuletus* relativi alla campagna MEDITS 2014

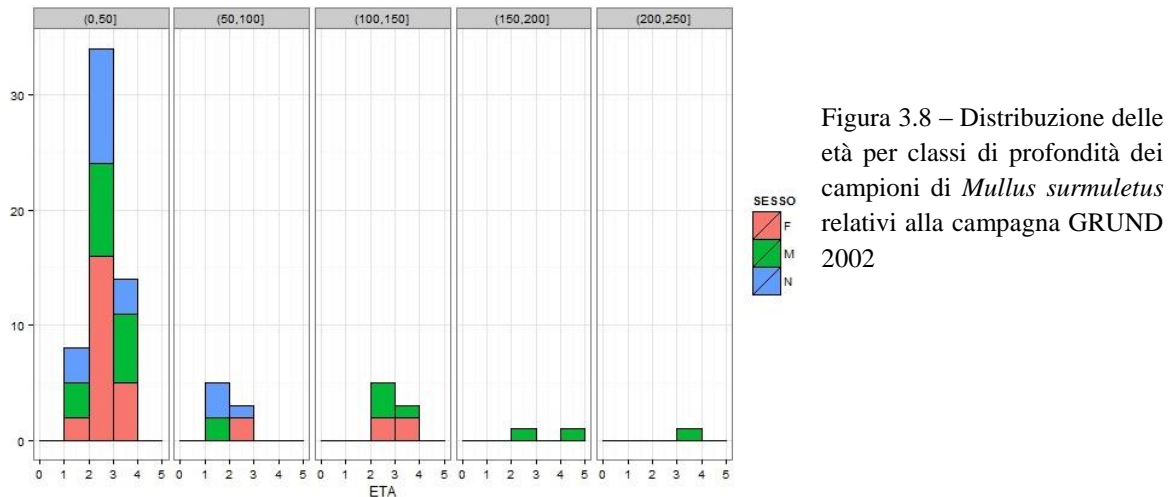


Figura 3.8 – Distribuzione delle età per classi di profondità dei campioni di *Mullus surmuletus* relativi alla campagna GRUND 2002

Per quanto riguarda *Mullus barbatus* abbiamo dei picchi di frequenza degli individui di 1 anno di età nelle classi 0-50 m e 50-100 m, seguiti dalle classi 0+ e 2, mentre nelle classi 100-150 m e 150-200 m predominano gli individui di 2 anni di vita seguiti da quelli di 3 e 1 anno. In entrambe le specie sono assenti i giovanili non ancora giunti a maturità sessuale oltre i 100 m di profondità. Sono assenti inoltre campioni di *Mullus surmuletus* della campagna MEDITS 2014 nelle classi di profondità 150-200 m e 200-250 m e campioni di *M. surmuletus* della campagna GRUND 2002 nella classe di profondità 250-300 m. Per i campioni della MEDITS 2014 la distribuzione delle età nella prima classe di profondità prevede un picco di individui di 1 anno di vita, ma seguono altrettanto frequenti individui di 2 anni e 0+, mentre sono poco frequenti quelli di 3 anni e assenti quelli di 4. Nella classe 50-100 m sono presenti invece solo pochi individui di 1 e 2 anni, mentre nell'ultima classe risultano presenti 4 individui di cui 3 di 3 anni e uno di 4. Per i campioni della GRUND 2002, invece, il picco delle frequenze nella prima classe di profondità riguarda gli individui di 2 anni di vita, seguiti da quelli di 3 anni e 1 anno. Sono totalmente assenti gli 0+ in tutte le classi.

3.1.3 Distribuzione delle taglie e delle età per classi di latitudine – Per testare la distribuzione spaziale delle specie sono state valutate le distribuzioni delle taglie e delle età per classi di latitudine, indicate dai paralleli segnati in Figura 3.9 stabiliti secondo i criteri visti in precedenza. Essendo solo 5 i campioni di *Mullus surmuletus* della campagna MEDITS 2012, le distribuzioni sono state valutate solamente per i campioni di *M. barbatus*. Come si può vedere dai grafici, il numero di individui complessivi pescati nelle tre zone

dell'area di studio è maggiore nelle fascia centro-settentrionale del bacino, mentre va diminuendo molto nella fascia centro-meridionale.

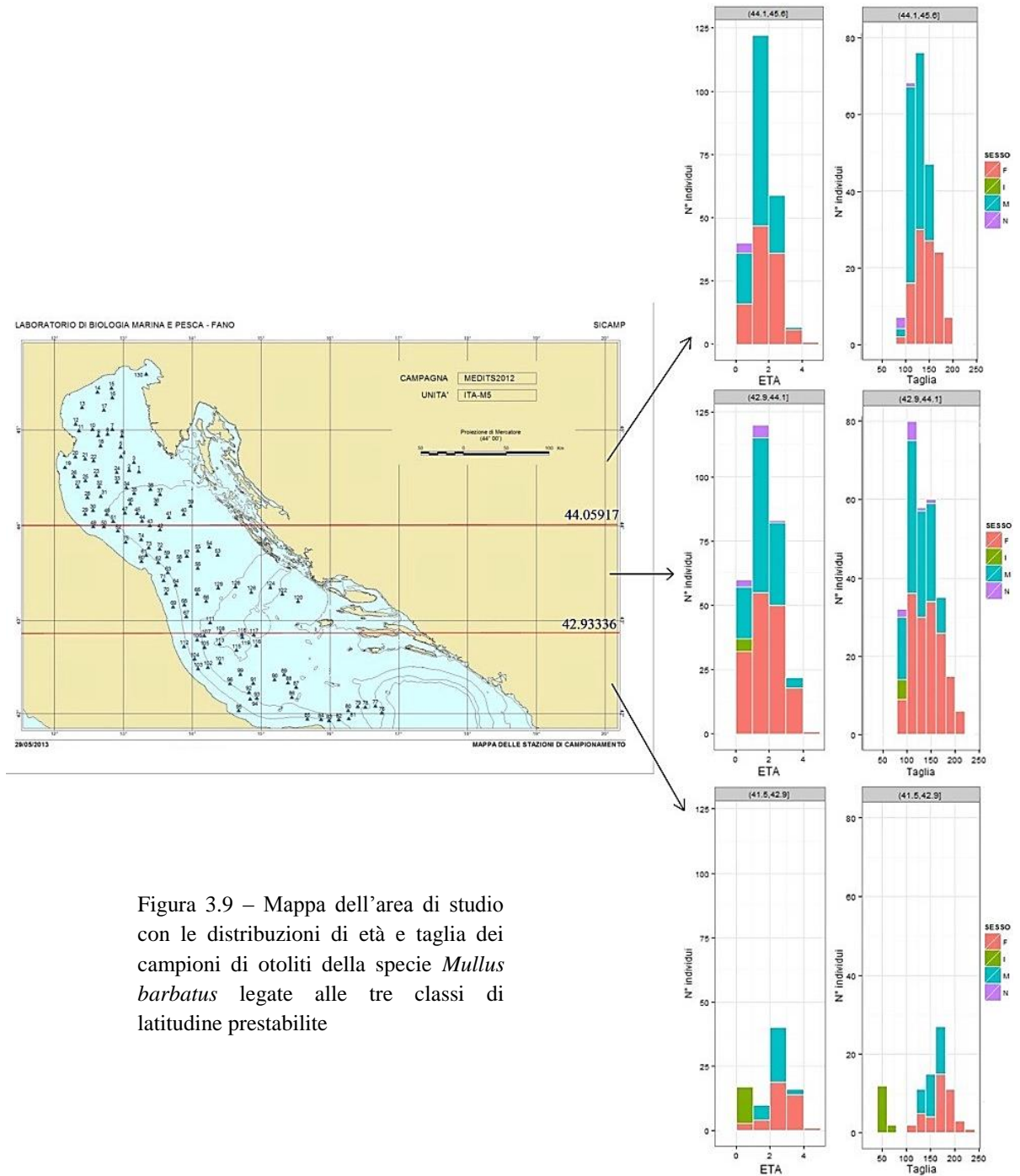


Figura 3.9 – Mappa dell'area di studio con le distribuzioni di età e taglia dei campioni di otoliti della specie *Mullus barbatus* legate alle tre classi di latitudine prestabilite

Sia per gli individui delle latitudini più alte che per quelli della fascia centrale è possibile notare un picco di individui di 1 anno di vita, corrispondenti alle taglie 100-120 mm, seguono poi gli individui di 2 anni di vita e gli 0+. Meno frequenti invece sono gli individui di 3 anni e 4. Nella fascia meridionale, al contrario, gli individui di 1 anno sono poco frequenti e dominano quelli di 2 anni, con taglie comprese tra i 160 e i 170 mm. Sono inoltre

presenti indeterminati di taglia intorno ai 50 mm, rispetto a quelli della fascia centrale che si aggirano intorno agli 80-100 mm. Sono invece assenti giovanili nella fascia settentrionale del bacino.

3.2 STRUTTURE DI TAGLIA – Attraverso l’analisi delle strutture di taglia si è voluto osservare le differenze tra le due specie del genere *Mullus* e tra i campioni di *Mullus surmuletus* delle varie campagne di ricerca. A tale scopo sono stati realizzati dei plot con delle curve di distribuzione cumulativa di frequenze, come quelle di Figura 3.10 e 3.11.

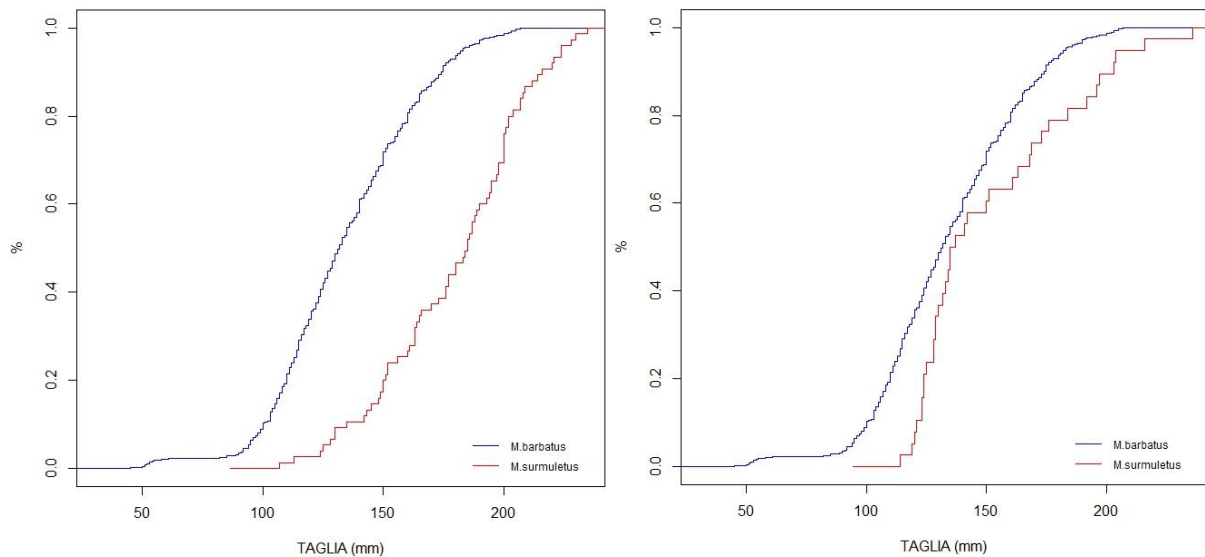
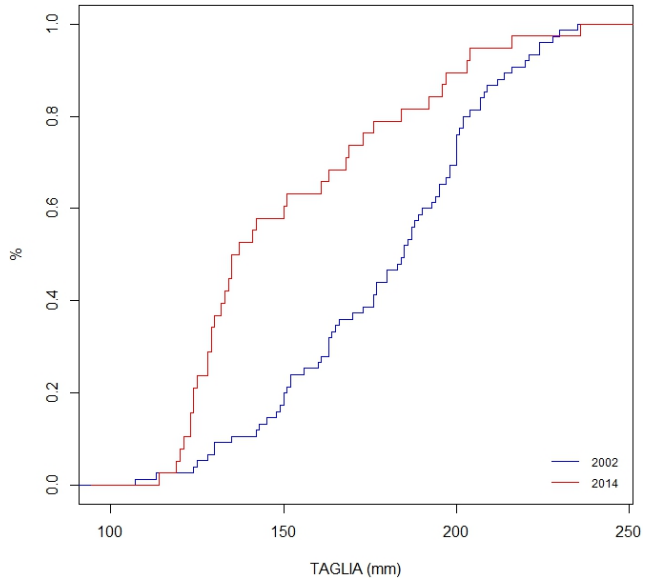


Figura 3.10 – Curve cumulative di frequenze relative alle due specie del genere *Mullus*. Le curve blu rappresentano le curve di distribuzione della specie *M. barbatus* mentre le curve rosse rappresentano le curve di distribuzione di *M. surmuletus*, nel grafico a sinistra riguardanti i campioni della campagna GRUND 2002 e nel grafico a destra i campioni riguardanti la campagna MEDITS 2014.

Le curve sono state costruite utilizzando un sistema di assi cartesiani in cui sull’asse delle ascisse sono state riportate le taglie e sull’asse delle ordinate le frequenze cumulative. Tramite questi grafici è possibile calcolare i percentili, ossia i livelli di misura al di sotto dei quali cade una determinata percentuale nella distribuzione. Si può ad esempio dire che fino alla taglia 150 mm, del grafico a sinistra di Figura 3.10, corrisponde poco meno del 20% degli individui di *M. surmuletus* e più del 60% degli individui di *M. barbatus*. Data l’ipotesi nulla seguente: “le distribuzioni delle frequenze di taglia non differiscono tra le due specie del genere *Mullus*” è stato svolto il test a due vie di Kolmogorov-Smirnov, che restituisce un valore di p-value, per testarla. Se il p-value risultava essere maggiore di 0,05 veniva accettata l’ipotesi nulla, mentre se risultava essere inferiore a 0,05 veniva rigettata. E’ stata

testata anche un'altra ipotesi nulla ossia: "Non ci sono differenze significative tra le distribuzioni delle taglie all'interno della specie *M. surmuletus* tra i campioni della campagna GRUND 2002 e MEDITS 2014", rappresentata in Figura 3.11.

Figura 3.11 – Curve cumulative di frequenza relative ai campioni di *Mullus surmuletus* delle campagne GRUND 2002 (curva blu) e MEDITS 2014 (curva rossa)



I test di Kolmogorov-Smirnov per ogni confronto hanno dato i seguenti risultati:

data: TAGLIA *M. barbatus* e TAGLIA *M. surmuletus* GRUND 2002

D = 0.54471, p-value < 2.2e-16

dati: TAGLIA *M. barbatus* e TAGLIA *M. surmuletus* MEDITS 2014

D = 0.29756, p-value = 0.003572

dati: TAGLIA *M. surmuletus* GRUND 2002 e TAGLIA *M. surmuletus* MEDITS 2014

D = 0.45895, p-value = 4.861e-05

Dato che in tutti e tre i confronti il p-value risulta essere minore di 0,05 si rigettano entrambe le ipotesi nulle.

3.3 RELAZIONE TAGLIA-PESO – Le relazioni taglia-peso sono state analizzate per i campioni totali di *Mullus barbatus* e i campioni di *Mullus surmuletus* delle campagne GRUND 2002 e MEDITS 2014 e sono state rappresentate nelle Figure 3.12, 3.13 e 3.14. I grafici di sinistra delle figure mostrano dei plot con i campioni analizzati, la curva centrale che fitta meglio l'andamento stesso dei campioni plottati e due curve tratteggiate che mostrano gli intervalli di confidenza, che a loro volta racchiudono il 95% dei campioni. I grafici di destra mostrano, invece, le relazioni lunghezza-peso linearizzate con i logaritmi.

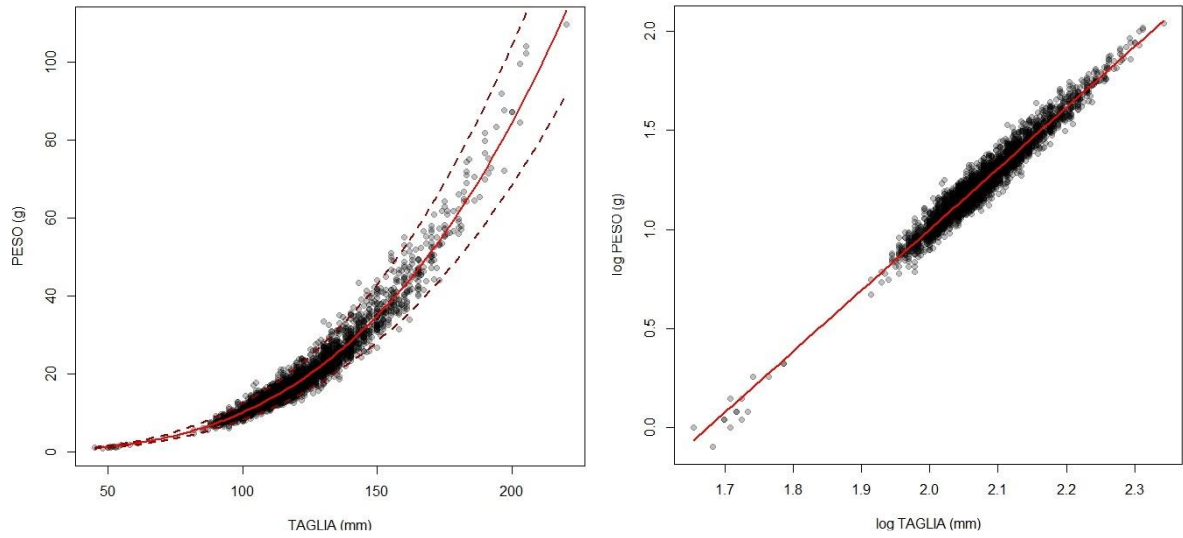


Figura 3.12 – Relazione taglia-peso relativa ai campioni totali di *Mullus barbatus*

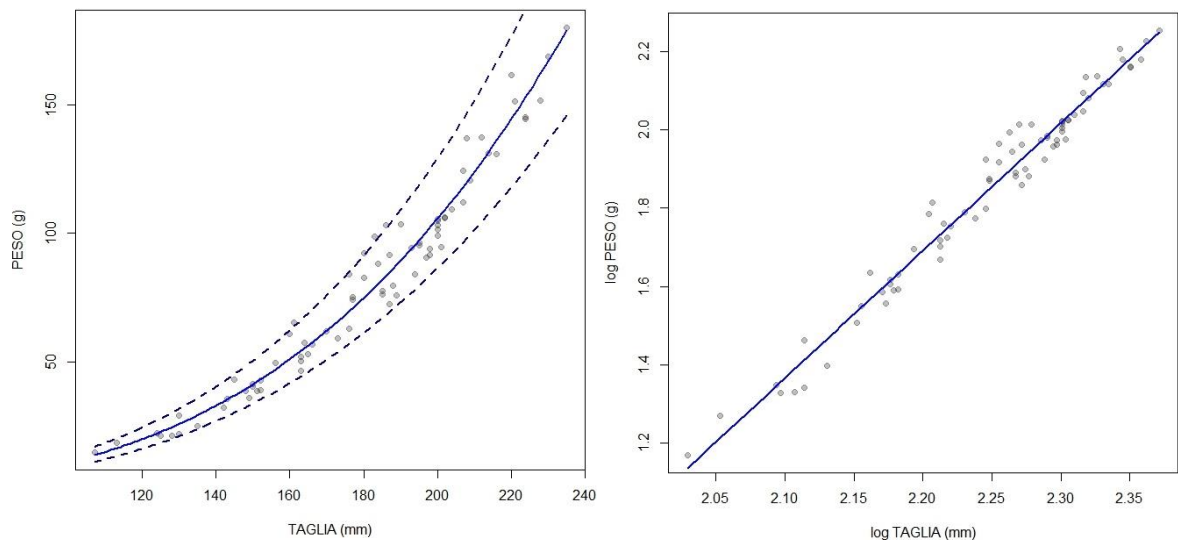


Figura 3.13 – Relazione taglia-peso relativa ai campioni di *Mullus surmuletus* della campagna GRUND 2002

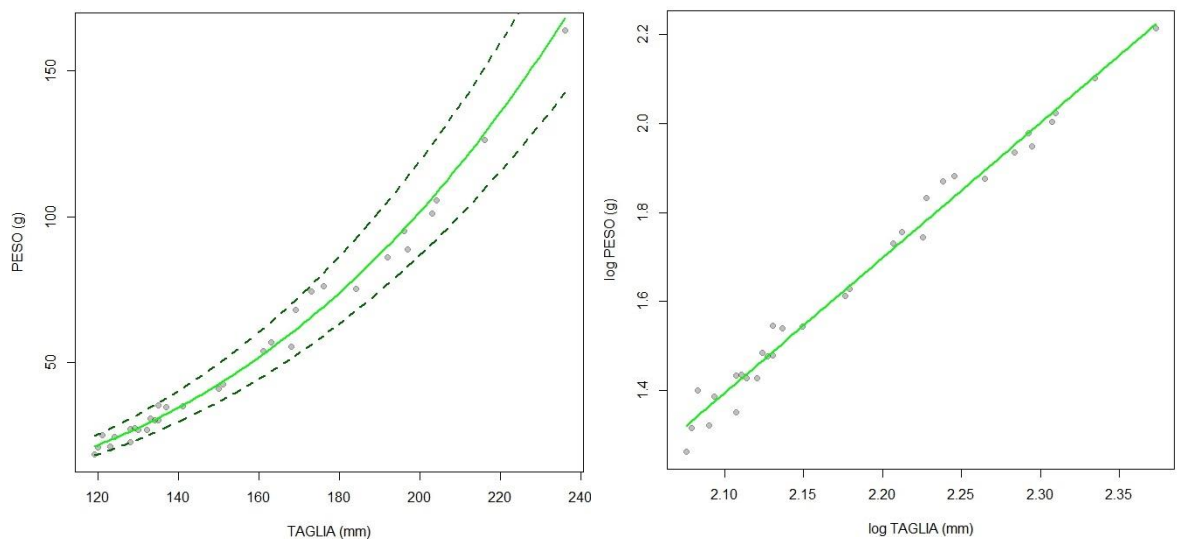


Figura 3.14 – Relazione taglia-peso relativa ai campioni di *Mullus surmuletus* della campagna MEDITS 2014

Per poter poi confrontare al meglio le relazioni lunghezza-peso delle due specie è stato realizzato il grafico di Figura 3.15, che rappresenta le tre curve ottenute dalle distribuzioni dei punti plottati nei grafici delle figure precedenti.

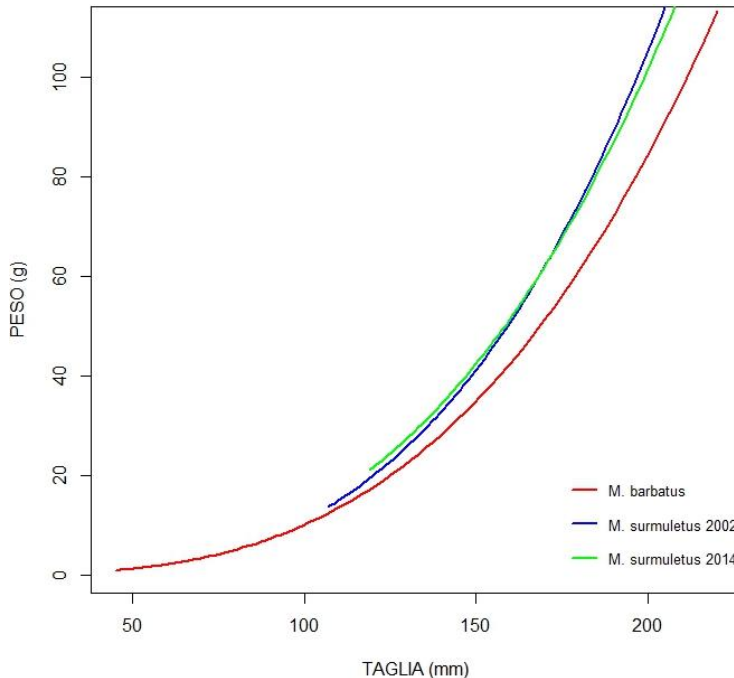


Figura 3.15 – Relazioni lunghezza-peso a confronto

All'analisi grafica si è passato poi al calcolo dei parametri a e b di ciascuna relazione taglia-peso, con a che rappresenta l'intercetta della regressione e b il coefficiente di regressione. Questi due parametri sono stati stimati mediante l'analisi della regressione lineare basata sul logaritmo (Vallisneri *et al.*, 2009), con i relativi intervalli di confidenza, e hanno dato i risultati di Tabella 3.4.

	a	b	2,5% a	97,5% a	2,5% b	97,5% b
<i>M. barb</i>	-5.139370	3.069939	-5.188123	-5.090617	3.046491	3.093388
<i>M. surmul</i> 2002	-5.491757	3.265247	-5.783665	-5.199849	3.135407	3.395086
<i>M. surmul</i> 2014	-4.977397	3.034488	-5.275865	-4.678928	2.898048	3.170928

Tabella 3.4 – Risultati dei parametri a e b delle relazioni lunghezza-peso analizzate

Infine è stata effettuata l'Analisi della Varianza del modello lineare della relazione tra $\log(\text{Peso})$ e $\log(\text{Taglia})$ per vedere se la retta della regressione lineare si scostasse significativamente da zero. Partendo dall'ipotesi nulla "La retta di regressione lineare non si discosta in maniera significativa da zero", l'ANOVA ha fornito dei valori di p-value per tutte e tre le relazioni estremamente inferiori a 0,05 ($< 2.2e-16$) per cui sono state rigettate le

ipotesi nulle ed è stata confermata la significatività della relazione tra i due logaritmi di peso e taglia.

3.4 RELAZIONE TAGLIA-ETA' - Per quanto riguarda la relazione taglia-età sono stati inclusi in Tabella 3.5 il numero di individui di entrambe le specie di una data età "x" all'interno di una data classe di taglia "y".

CLASSI di TAGLIA	ETA'													
	<i>M. barbatus</i>					<i>M. surmuletus</i> 2014					<i>M. surmuletus</i> 2002			
	0+	1	2	3	4	0+	1	2	3	4	1	2	3	4
40	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
60	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90	33	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100	33	29	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
110	25	60	3	0	0	2	0	0	0	0	1	0	0	0
120	6	69	4	0	0	5	4	2	0	0	2	1	0	0
130	1	46	19	0	0	1	6	0	0	0	3	0	0	0
140	0	31	31	2	0	0	2	0	0	0	3	2	0	0
150	0	14	41	3	0	0	1	1	0	0	1	5	0	0
160	0	2	39	8	0	0	0	4	0	0	1	6	1	0
170	0	0	31	5	1	0	0	2	0	0	0	5	1	0
180	0	0	11	10	0	0	0	0	1	0	0	8	3	0
190	0	0	3	9	0	0	0	1	2	0	1	6	1	0
200	0	0	0	8	1	0	0	2	0	0	0	6	7	0
210	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	1
220	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	4	1	0
230	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0

Tabella 3.5 – Distribuzioni dei vari individui di *Mullus barbatus* e *Mullus surmuletus* all'interno delle classi di età e taglia

Sono stati creati in seguito degli ALK plot per visualizzare le distribuzioni dei campioni all'

interno delle varie classi di taglia ed età. Gli ALK plot generati sono di due tipi differenti: uno con ricoprimento ad area e uno a bolle, come quelli di Figura 3.16.

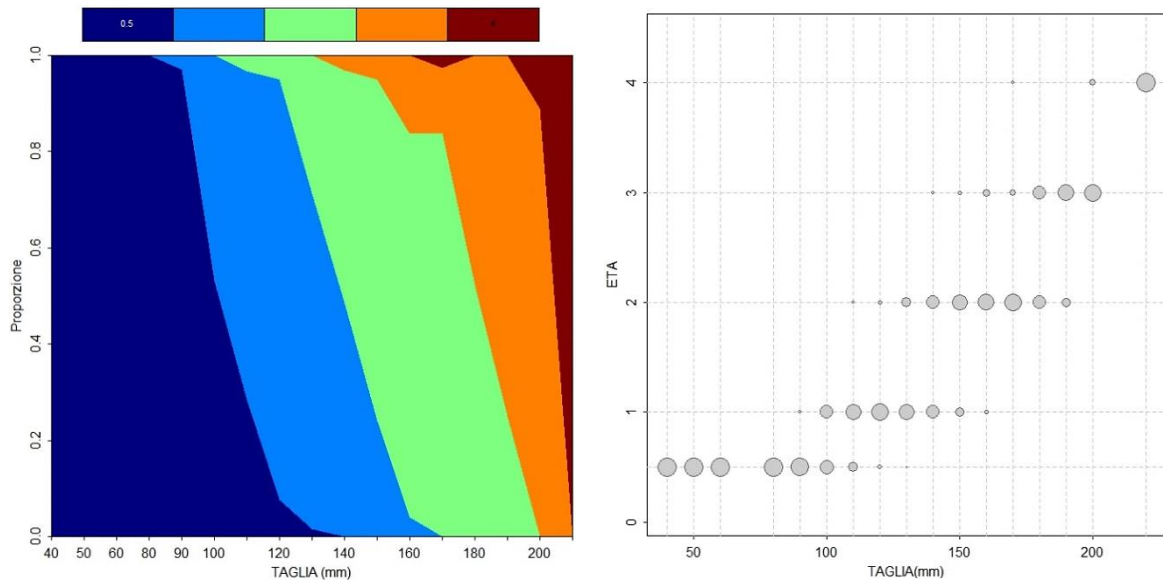


Figura 3.16 – ALK plot relativi alla relazione taglia-età dei campioni di otoliti della specie *Mullus barbatus*. A sinistra l’ALK plot ad area, mentre a destra l’ALK plot a bolle

Nell’ALK plot ad area ci sono le taglie sull’asse delle ascisse e le proporzioni delle varie età per una data taglia “x” sull’asse delle ordinate. Le età sono state rappresentate con dei colori dal blu al rosso in ordine progressivo. Il grafico risultante viene riempito dai colori ad area in base alla proporzione delle varie età a una data taglia “x”, per cui ad esempio alla taglia 180 mm, essendoci 11 individui di età 2 e 10 di età 3, risulterà un ricoprimento del 52,4% di verde (2) e un ricoprimento del 47,6% di arancione (3). Nell’ALK plot a bolle, invece, sull’asse delle ordinate ci sono le età e la proporzione in base al numero di individui per età per classe di taglia viene stabilita dalla grandezza della bolla.

A questo punto si è passati ad un calcolo delle medie e deviazioni standard (ds) delle taglie per ogni età.

<i>Mullus barbatus</i>			<i>Mullus surmuletus</i> 2002			<i>Mullus surmuletus</i> 2014		
Età	Media	ds	Età	Media	ds	Età	Media	ds
0+	97.838	18.840	1	139.000	21.608	0+	123.500	5.425
1	125.607	13.549	2	181.047	23.561	1	134.154	7.701
2	156.544	15.551	3	202.000	18.226	2	167.000	26.488
3	180.578	16.531	4	214.000		3	198.250	13.226
4	201.333	22.053				4	236.000	

Infine si è voluto osservare se ci fossero delle differenze significative nelle distribuzioni delle taglie all'interno di ogni classe di età in base al sesso. Per questo è stata svolta l'Analisi della Varianza in tutti e tre i casi. Per quello che riguarda i campioni di *Mullus barbatus* l'ANOVA ha mostrato un valore di p-value uguale a 0.00335 per cui si può dire che ci siano delle differenze significative nelle distribuzioni delle taglie in base al sesso, mentre riguardo ai campioni di *Mullus surmuletus* della campagna GRUND 2002 e MEDITS 2014 ha prodotto dei valori di p-value rispettivamente uguali a 0.44193 e 0.65678 per cui si può dire che non vi sono delle differenze significative riguardo al sesso.

3.5 ACCRESCIMENTO – Per poter testare le differenze nell'accrescimento somatico delle due specie del genere *Mullus* sono stati estratti i dati relativi alle funzioni di crescita di Von Bertalanffy (VBGF) di L_{∞} , K e t_0 , riportati in Tabella 3.6. Sono stati scartati dall'analisi i campioni di *Mullus surmuletus* della campagna MEDITS 2014 per numero ridotto di campioni su cui applicare l'analisi per il calcolo dei parametri. Per poter ottenere poi una migliore confrontabilità dei dati sono stati eliminati gli individui di età 0+ dal dataset dei *Mullus barbatus*, vista la loro assenza nel dataset dei *M. surmuletus* della campagna GRUND 2002. Successivamente sono stati trovati i valori di tali parametri anche separatamente per sesso per poter fare un confronto tra maschi e femmine. L'analisi in base al sesso è stata condotta però solamente sui campioni di *M. barbatus*, data l'insufficienza di campioni in ognuno dei due livelli del fattore "Sesso" dei *M. surmuletus* del 2002.

	L_{∞}	K	t_0
<i>Mullus barbatus</i>	270.975	0.239	-1.608
<i>M. barbatus</i> femmine	241.851	0.325	-1.440
<i>M. barbatus</i> maschi	165.635	0.922	-0.423
<i>Mullus surmuletus</i> 2002	223.535	0.687	-0.416

Tabella 3.6 – Dati relativi ai parametri della funzione di crescita di Von Bertalanffy (VBGF) nelle due specie del genere *Mullus*

Ai dati si è aggiunta poi la rappresentazione grafica della funzione di crescita di Von Bertalanffy sia per i campioni di otoliti totali che separata per sesso, di Figure 3.17 e 3.18. In Figura 3.17 sono rappresentati i campioni totali delle due specie plottati in grafici con l'età sull'asse delle ascisse e la taglia sull'asse delle ordinate, da cui sono state poi ricavate le

curve di crescita. Dai grafici emergono le differenze nei parametri precedentemente calcolati, infatti ben evidente è la diversa curvatura delle due funzioni di crescita, dovuta essenzialmente ai differenti tassi di crescita K . I maggiori tassi di crescita di *Mullus surmuletus* si riflettono infatti in una maggiore curvatura della funzione, con la curva che quindi raggiunge taglie maggiori a parità di età.

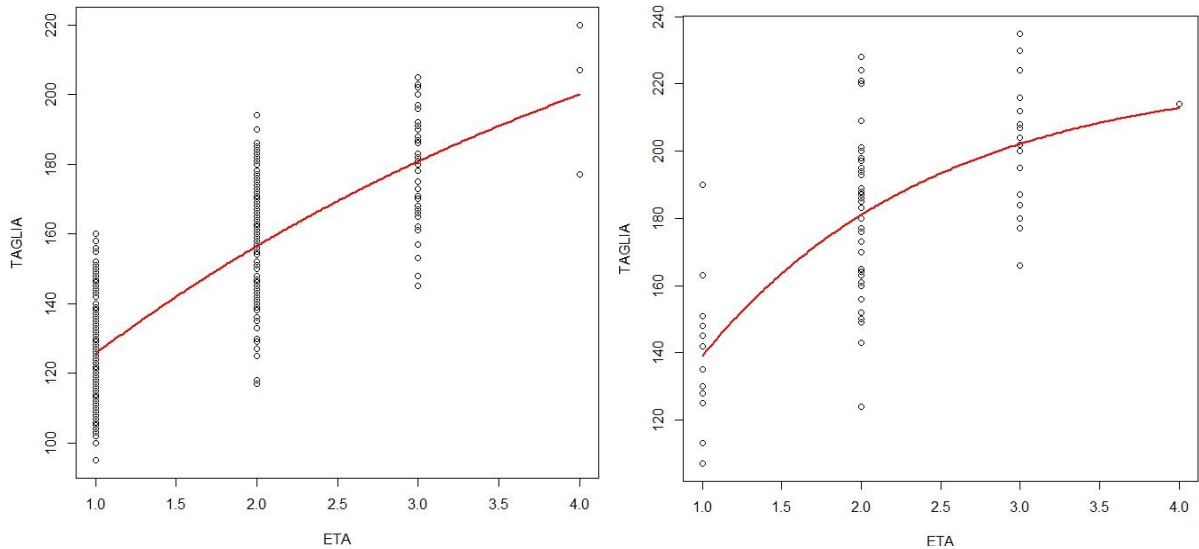


Figura 3.17 – Curve di crescita di Von Bertalanffy dei campioni totali della specie *Mullus barbatus* (a sinistra) e *Mullus surmuletus* (a destra)

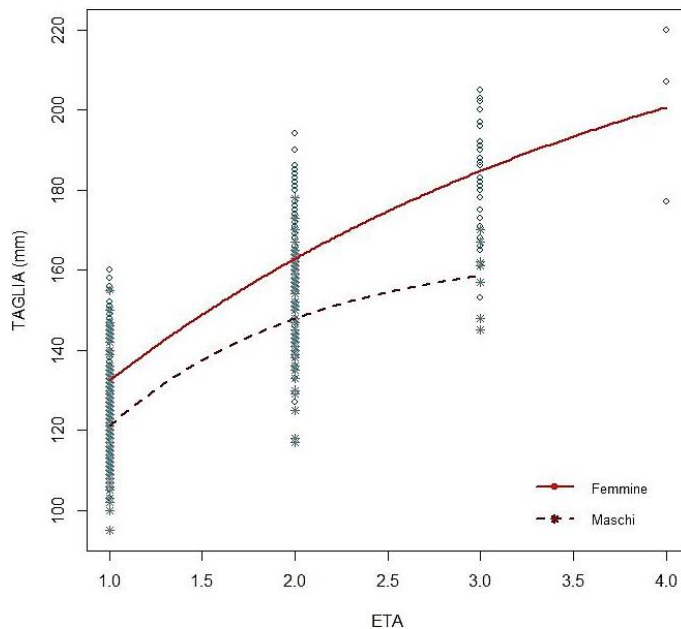


Figura 3.18 – Curve di crescita di Von Bertalanffy dei campioni di *Mullus barbatus* separate per sesso. I maschi sono stati rappresentati da asterischi grigi e dalla curva tratteggiata, mentre le femmine sono state rappresentate con i cerchi verdi e la curva continua rossa.

In Figura 3.18, invece, viene messa ben in evidenza la differenza tra i due sessi sia in termini di taglie che di curvatura delle funzioni. Si può notare inoltre come le due funzioni divergano soprattutto verso età e taglie maggiori, segno dell'aumentare della diversificazione tra sessi con il tempo.

3.6 ALLOMETRIA – L'allometria è stata testata sia in termini del rapporto tra il radius dell'otolite e la taglia dell'individuo che in termini di radius ed età.

3.6.1 Rapporto radius-taglia – Viene definito al fine di determinare l'accrescimento dell'otolite, in questo caso definito dal radius, in base alla taglia dell'individuo. I dati sono stati plottati su dei grafici con l'asse delle ascisse costituito dalle taglie e l'asse delle ordinate costituito dai radius ed è stato applicato il modello lineare. Sono stati analizzati i rapporti taglia-radius sia degli otoliti destri che dei sinistri al fine di poter osservare dai parametri del modello lineare delle differenze tra i due in termini di simmetria. Inoltre, essendo alcuni campioni costituiti da un solo otolite, in questo modo è stato possibile comprendere tutti i campioni. Per ogni relazione inoltre sono stati realizzati due grafici per due diverse classi di radius. Siccome i giovanili di *Mullus barbatus*, con radius inferiore a 1 mm, risultavano essere separati dal resto dei campioni e non venivano compresi, per questo, nella retta di regressione lineare si è voluto separare il modello per due classi di radius: 0-1 mm e 1-2.5 mm, ed osservare in questo modo le differenze nell'accrescimento dell'otolite nel passaggio dalla forma giovanile alla fase adulta. I grafici che sono stati ottenuti per *Mullus barbatus* sono rappresentati in Figura 3.19.

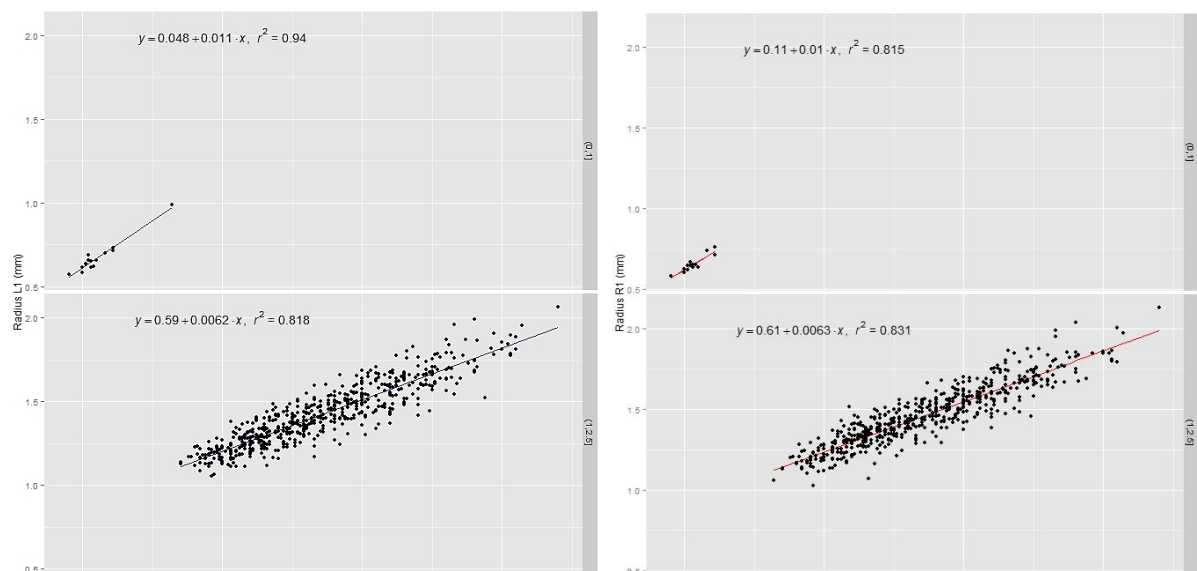


Figura 3.19 – Modelli lineari relativi al rapporto taglia-radius degli otoliti di *M. barbatus*. A sinistra abbiamo il modello per l'otolite sinistro e a destra quello per l'otolite destro. Sono state ricavate anche le equazioni del modello e il coefficiente di determinazione r^2

Come è possibile osservare dalla Figura 3.19, oltre alle rette di regressione lineare, sono state ottenute le equazioni del modello lineare, del tipo $y = a + bx$, con i relativi valori delle

intercette (a) e dei coefficienti di regressione (b) e del coefficiente di determinazione r^2 . Le equazioni mostrano valori di r^2 molto vicini ad 1 per questo si può dire che c'è una correlazione positiva tra la taglia e la lunghezza dei radius e che più dell'80% delle variazioni nelle lunghezze dei radius sono spiegabili con variazioni della taglia dell'individuo. Confrontando poi i coefficienti di regressione dei giovanili e degli adulti si possono notare differenze importanti, con valori di accrescimento dell'otolite nella fase giovanile maggiori rispetto a quelli della fase adulta. Non ci sono invece differenze rilevabili tra i grafici realizzati per l'otolite sinistro e quelli realizzati per l'otolite destro.

Riguardo ai *Mullus surmuletus* della campagna GRUND 2002, non essendoci giovanili, sono stati rappresentati in Figura 3.20 solamente i grafici con radius compreso tra 1 mm e 2.5 mm.

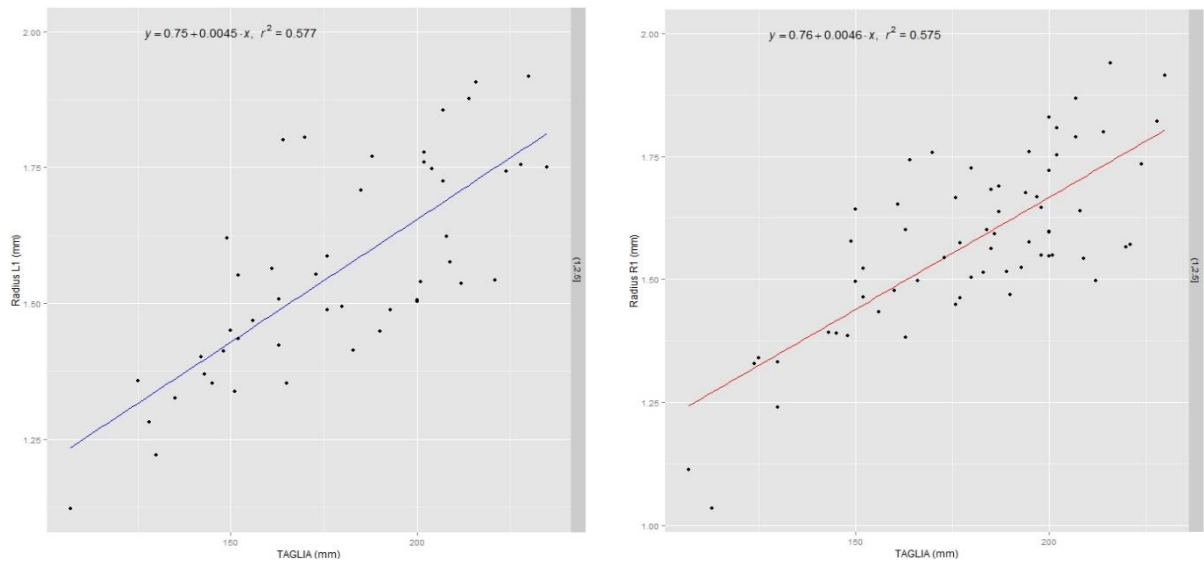


Figura 3.20 – Modelli lineari relativi al rapporto taglia-radius dei campioni di *M. surmuletus* del 2002.

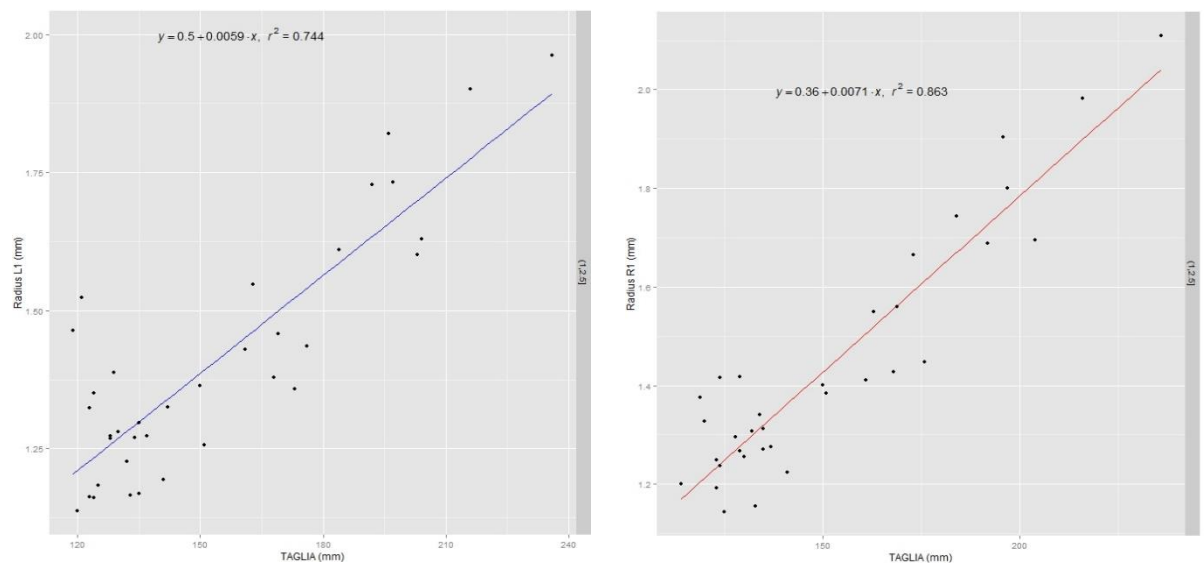


Figura 3.21 – Modelli lineari relativi al rapporto taglia-radius dei campioni di *M. surmuletus* del 2014.

Anche per i *M. surmuletus* della campagna MEDITS 2014, rappresentati in Figura 3.21, sono stati realizzati solamente i grafici relativi alla classe di radius 1-2.5 mm. I coefficienti di regressione delle due specie sembrano essere simili, quindi presentano un tasso di accrescimento dell'otolite in relazione alla taglia simile. Solo i coefficienti di determinazione r^2 risultano essere più bassi per *M. surmuletus*, soprattutto per i campioni della campagna GRUND 2002, ma questo potrebbe essere legato semplicemente ad un numero inferiore di campioni e quindi ad una minore accuratezza e precisione dell'analisi del modello lineare.

3.6.2 Rapporto radius-età – Tale rapporto è stato necessario al fine di stabilire quale fattore tra la taglia e l'età fosse maggiormente correlato con la lunghezza del radius, e quindi con l'accrescimento dell'otolite. Anche in questo caso è stato applicato il modello lineare secondo i criteri stabiliti nel paragrafo precedente e sono stati ottenuti i grafici di Figura 3.22 per la specie *Mullus barbatus* e i grafici di Figure 3.23 e 3.24 per *Mullus surmuletus*.

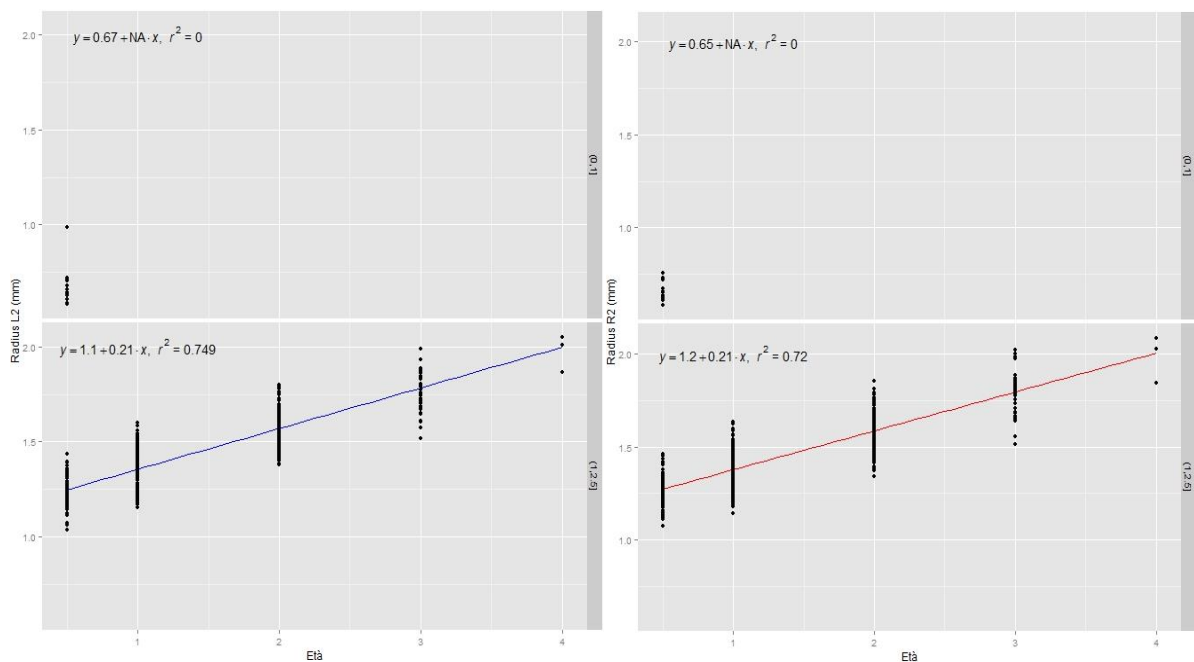


Figura 3.22 – Modelli lineari relativi al rapporto età-radius dei campioni di otoliti di *M. barbatus*. A sinistra sono rappresentati i campioni di otoliti sinistri, mentre a destra sono rappresentati gli otoliti destri.

Nel caso di *M. barbatus* è stato possibile dividere il rapporto radius-età nelle due classi di radius precedentemente indicate, ma non è stato possibile calcolare il coefficiente di regressione b e il coefficiente di determinazione r^2 , essendo tutti i giovanili, con radius minore di 1 mm, di età pari a 0+. Anche per il rapporto radius-età non è stato possibile

osservare differenze significative tra i parametri del modello lineare dei due otoliti in entrambe le specie, con i b dei modelli di *M. barbatus* addirittura coincidenti.

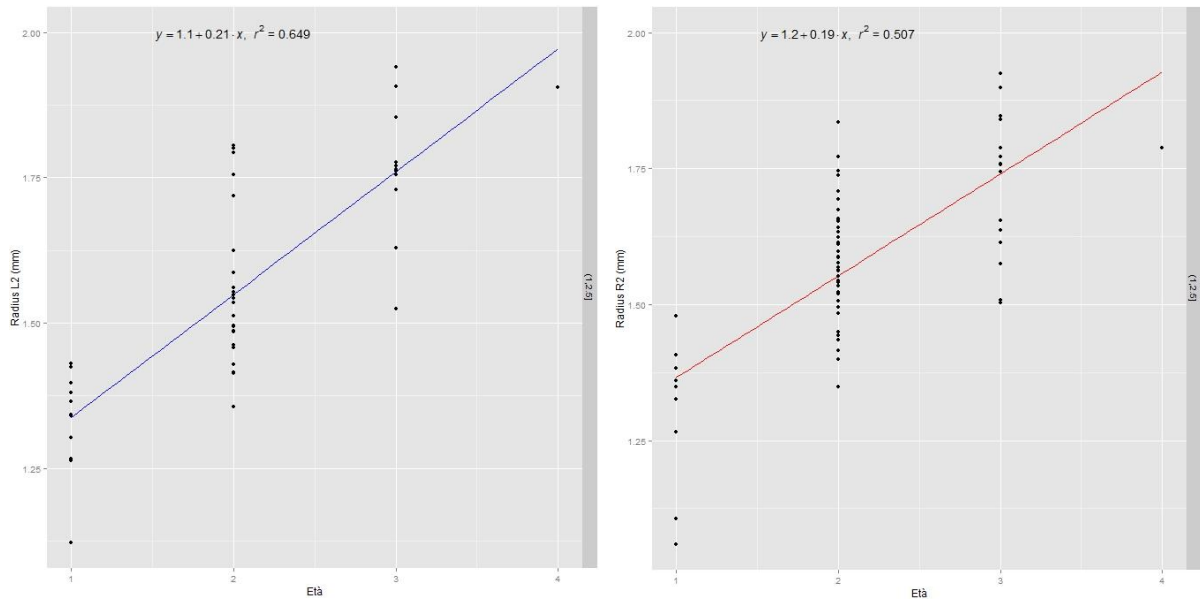


Figura 3.23 – Modelli lineari relativi al rapporto radius-età dei campioni della specie *M. surmuletus* della campagna GRUND 2002

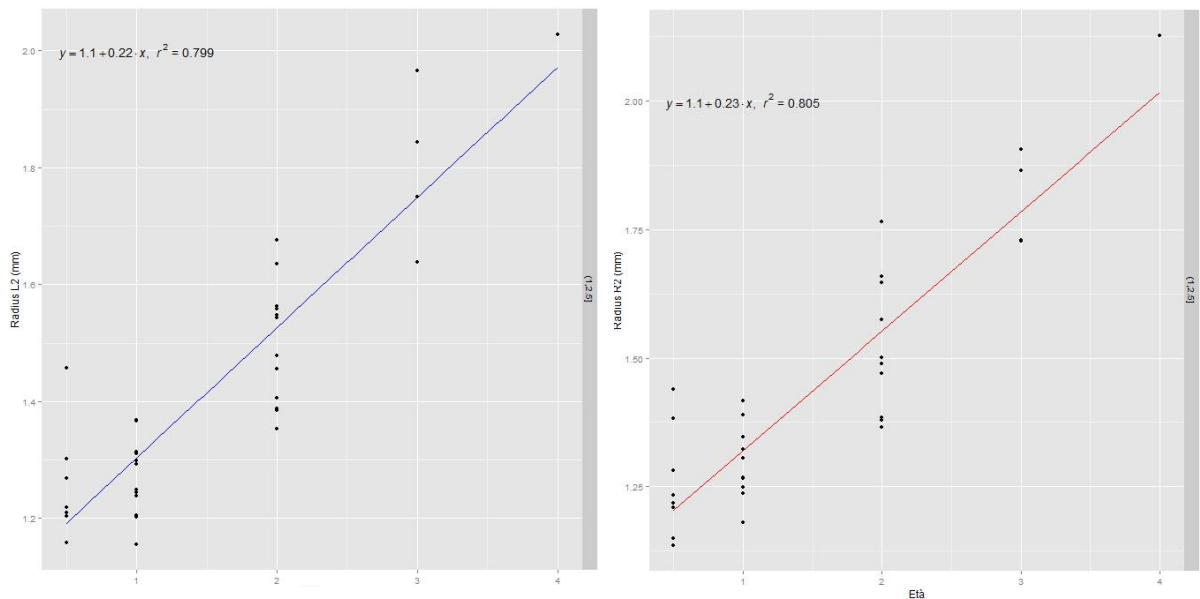


Figura 3.24 – Modelli lineari relativi al rapporto radius-età dei campioni di *Mullus surmuletus* della campagna MEDITS 2014

3.7 INCREMENTI DEI RADIUS - Un altro metodo per stimare le differenze nei tassi di accrescimento degli otoliti con l'avanzare dell'età è stato quello di misurare le lunghezze dei radius dal core ai vari anelli di accrescimento. Una volta ottenute le misure sono stati calcolati gli incrementi tra il primo e il secondo anno e tra il secondo e il terzo anno.

Siccome sono stati individuati soltanto pochissimi individui di 4 anni per entrambe le specie, si è preferito escludere dall'analisi gli incrementi dal terzo al quarto anno. Questi incrementi sono stati successivamente rappresentati in un grafico a boxplot (Figura 3.25).

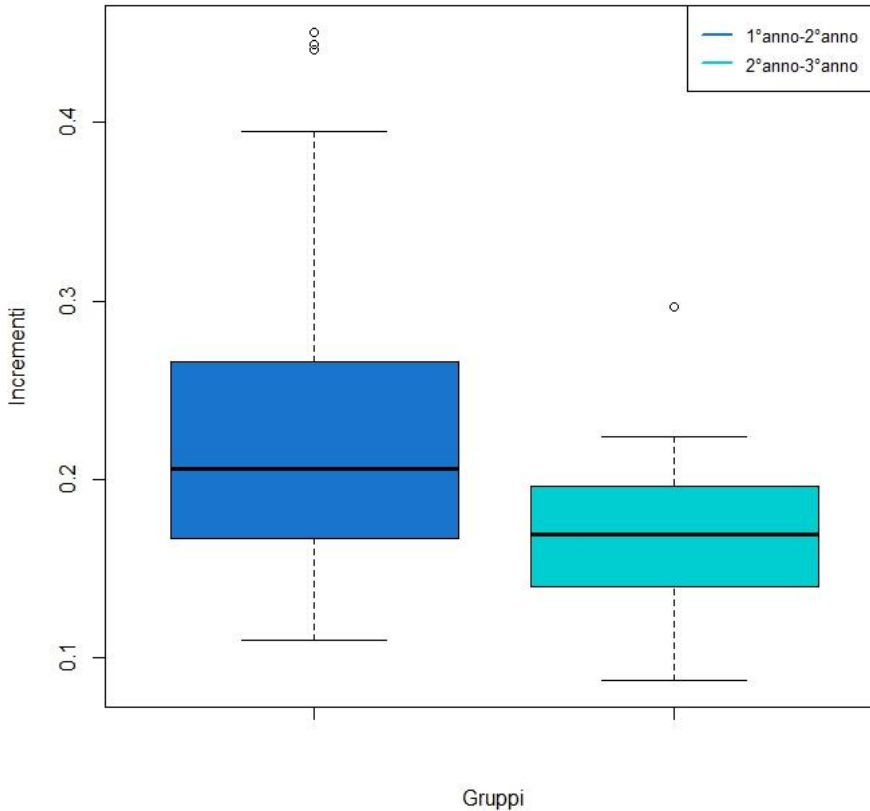


Figura 3.25 – Boxplot relativi agli incrementi dei radius degli otoliti di *Mullus barbatus*. A sinistra è raffigurato il primo gruppo, con gli incrementi tra il primo e il secondo anno di vita del pesce, a destra il 2° gruppo, con gli incrementi tra il secondo e il terzo anno di vita

Nel grafico a boxplot le linee nere centrali indicano la mediana, che in effetti per il primo gruppo è pari a 0.206 mm e per il secondo gruppo è pari a 0.169 mm, e i limiti dei rettangoli indicano il primo e terzo quantile, pari rispettivamente a 0.167 mm e 0.266 mm per il primo gruppo e a 0.144 mm e 0.195 mm per il secondo. Per il primo gruppo si ha inoltre un valore medio di $0.220 \text{ mm} \pm 0.074$, mentre per il secondo gruppo risulta pari a $0.170 \text{ mm} \pm 0.045$.

A questo punto si è cercato di vedere se vi fossero delle differenze nella distribuzione degli incrementi in base al sesso, per stabilire quindi quanto influisse il sesso sulla crescita dell'otolite. Per poter fare questo è stata condotta l'Analisi della Varianza, testando in precedenza le due assunzioni fondamentali di normalità dei dati e omogeneità della varianza. La normalità dei dati è stata verificata col test di Shapiro-Francia, mentre l'omogeneità della varianza è stata verificata con il test di Bartlett e il test di Fligner-Killeen. Le ipotesi nulle da testare con l'Analisi della Varianza sono state quindi:

1. Le distribuzioni degli incrementi dei radius del primo gruppo non differiscono in maniera significativa tra maschi e femmine.

2. Le distribuzioni degli incrementi dei radius del secondo gruppo non differiscono in maniera significativa tra maschi e femmine.

Dai risultati di p-value del test di Shapiro-Francia, le distribuzioni degli incrementi di entrambi i gruppi sono risultate essere normali (p-value = 0.680 per il primo gruppo e p-value = 0.728 per il secondo gruppo). In più anche dai test sull'omogeneità della varianza delle distribuzioni degli incrementi per sesso, i valori di p-value sono risultati essere 0.338 per il primo gruppo e 0.472 per il secondo gruppo, per cui c'è omogeneità della varianza. Essendo state rispettate le assunzioni è stata fatta l'ANOVA del modello lineare tra gli incrementi del primo e successivamente del secondo gruppo e il sesso. I risultati ottenuti dalle due analisi tramite il software Rstudio (Rstudio, 2015) sono i seguenti:

Analysis of Variance Table

```
Response: Radius21$R2_R1
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Radius21$SESSO  2  0.00400  0.0019978  0.3595  0.6988
Residuals     109  0.60573  0.0055572
```

Analysis of Variance Table

```
Response: Radius32$R3_R2
      Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
Radius32$SESSO  1  0.013839  0.0138388  8.8112  0.006074 **
Residuals     28  0.043977  0.0015706
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

La prima tavola di risultati mostra un valore di p-value pari a 0.6988 per cui, essendo > 0.05 , viene accettata l'ipotesi nulla numero 1. La seconda tavola invece mostra un valore di p-value pari a 0.006074, inferiore a 0.05, per cui viene rigettata l'ipotesi nulla numero 2. Gli asterischi al fianco del p-value mostrano inoltre il grado di significatività della relazione, per cui, essendocene due, si può dire che le differenze sono molto significative.

Infine, come ultimo punto, sono state testate le differenze tra le distribuzioni del primo gruppo e le distribuzioni del secondo gruppo tramite il test di Kolmogorov-Smirnov, con i seguenti risultati:

Two-sample Kolmogorov-Smirnov test

```
data: Radius32$R3_R2 and Radius21$R2_R1
D = 0.37738, p-value = 0.002366
alternative hypothesis: two-sided
```

Anche in questo caso, quindi, il valore di p-value risulta essere minore di 0.05, per cui si può affermare che ci sono delle differenze significative tra gli incrementi dal primo al secondo anno e gli incrementi dal secondo al terzo anno, come è anche ben visibile da Figura 3.25.

3.8 METODI DI LETTURA DEGLI OTOLITI – Per stabilire quale sia il metodo migliore di lettura degli anelli stagionali si è deciso di rappresentare su un grafico tante rette di regressione lineare quanti sono i metodi di lettura, cioè tre. Queste rette sono ben visibili nel grafico di Figura 3.26, che presenta le età sull'asse delle ascisse e le taglie sull'asse delle ordinate. Sono stati plottati anche i punti delle singole stime.

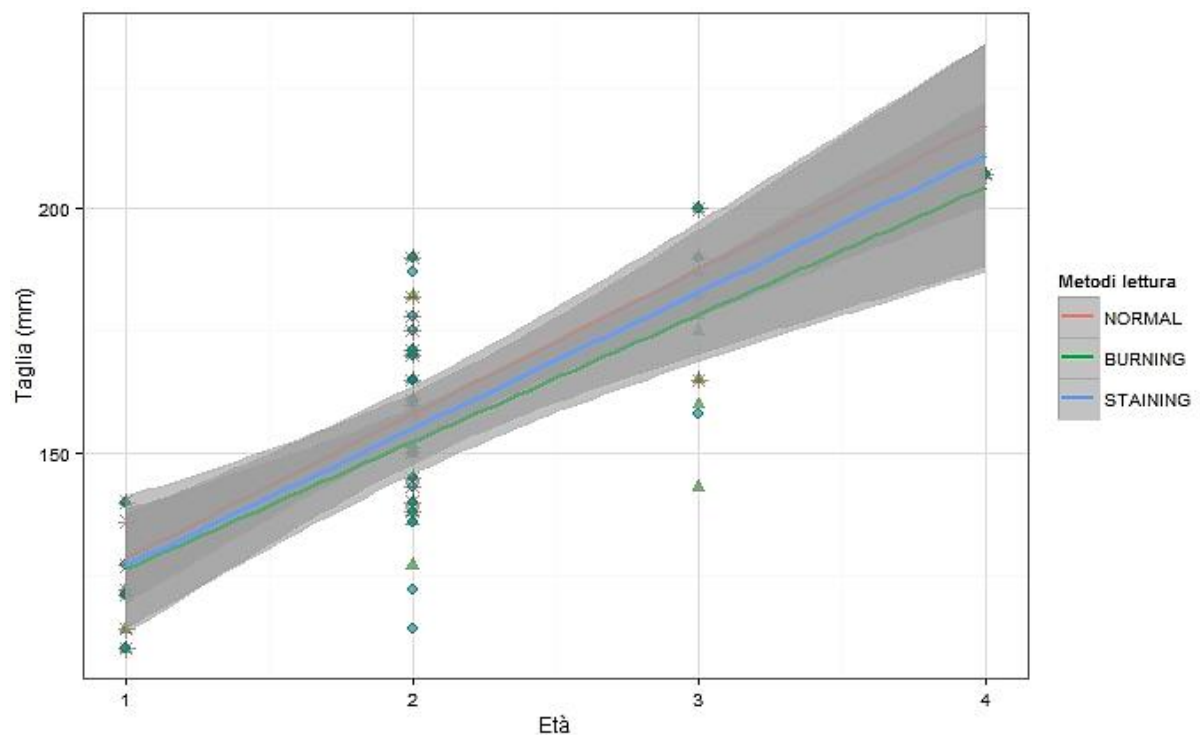


Figura 3.26 – Grafico rappresentante i punti e le rette di regressione lineare relative ai tre metodi di lettura degli otoliti di *Mullus barbatus*. Tali metodi sono: NORMAL = Lettura delle immagini acquisite, BURNING = bruciatura, STAINING = colorazione. Le singole stime sono state rappresentate invece con gli asterischi rossi se fatte col metodo normal, con pallini blu se fatte con lo staining e triangoli verdi se fatte col burning

Il grafico di Figura 3.26 mette ben in evidenza una differenziazione dei tre metodi di lettura, soprattutto verso le età e taglie maggiori, mentre questa non è osservabile nel grafico di Figura 3.27 relativo ai campioni *Mullus surmuletus*, dove i tre metodi di stima vanno addirittura congiungendosi verso le taglie maggiori. L'interpretazione della bontà dei dati relativa ai campioni di *M. surmuletus* però è sempre relativa, essendo stati valutati con le tre diverse tecniche solamente 18 campioni. Per stimare quale sia il metodo migliore può inoltre

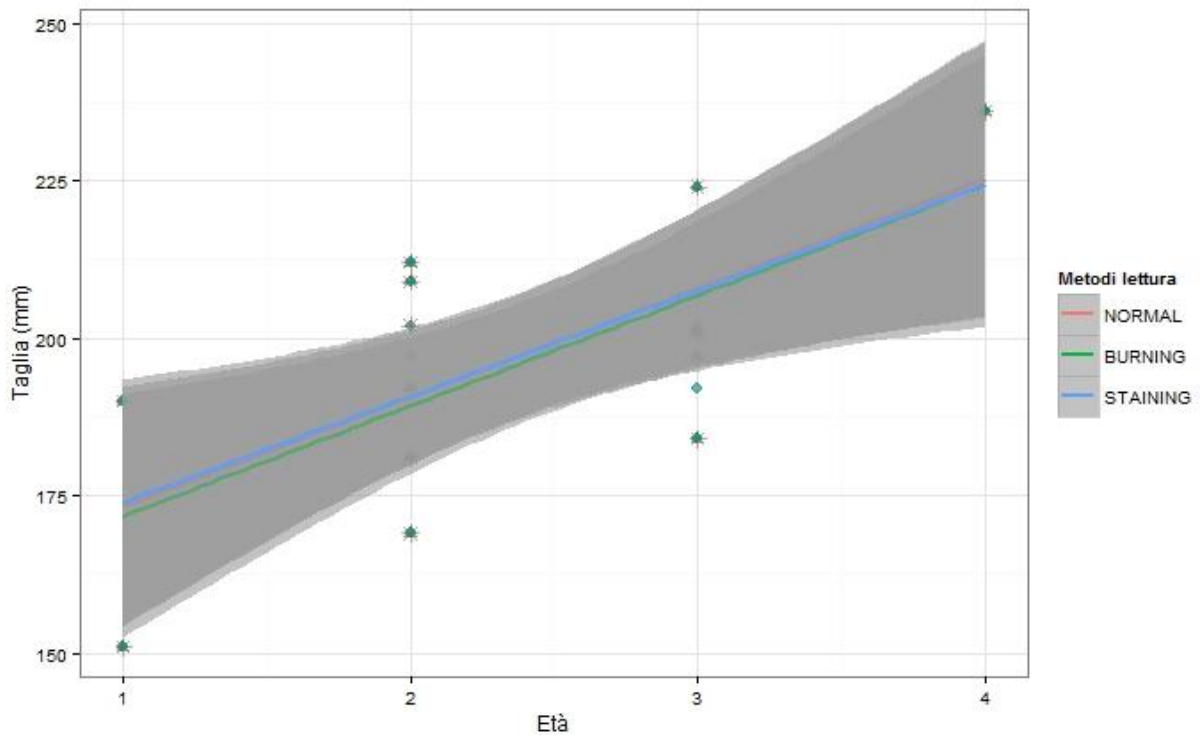


Figura 3.27 – Grafico rappresentante i punti e le rette di regressione lineare relative ai tre metodi di lettura degli otoliti di *Mullus surmuletus*, delle varie campagne di ricerca (compresi 4 campioni su 5 della MEDITS 2012)

essere utile il grafico di Figura 3.28, dove sono stati rappresentati i tre metodi con le relative rette di regressione e barre di errore. Il metodo migliore potrebbe infatti essere stabilito sulla base sia dell'ampiezza delle barre di errore che sulla loro omogeneità.

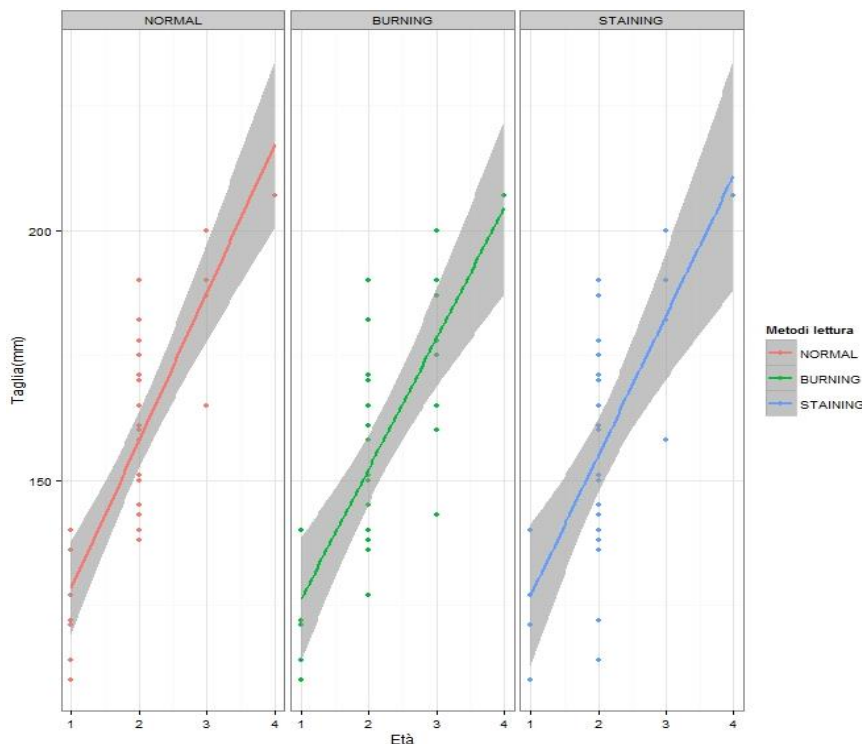


Figura 3.28 – Grafici separati dei tre metodi di lettura degli otoliti di *Mullus barbatus*

3.9 LETTURA ANNULI GIORNALIERI - Dei 7 campioni di otoliti dei giovanili che sono stati letti, è stato riportato il numero di annuli giornalieri dal core al settlement in Tabella 3.7. Il settlement è stato identificato come quell'annulus a spessore doppio, oltre il quale veniva registrato un cambio del tasso di deposizione dell'aragonite dovuto al cambio delle condizioni di vita dell'animale.

ID_OTO	249	402	453	458	462	570	574
N°giorni	22	29	23	25	27	21	28

Tabella 3.7 – Risultati relativi alla conte degli annuli giornalieri. Con ID_OTO si intende il numero identificativo del campione contenente gli otoliti, mentre con N°giorni si intende il numero di annuli contati

Da questi dati si ottiene quindi un numero di giorni medio dalla schiusa al settlement pari a 25 ± 3 .

PARTE 4 DISCUSSIONI

Molti temi legati alla determinazione dell'età tramite la lettura degli otoliti e delle frequenze di taglia sono stati affrontati in questo studio per poter cercare di stabilire un quadro d'insieme delle due specie del genere *Mullus*, sia in termini di stato delle risorse che di differenze specifiche. Passando all'interpretazione dei dati delle analisi effettuate in precedenza si possono dedurre diverse conclusioni, esaminando punto per punto quello che è stato fatto.

1. Strutture di età – Capire come uno stock sia strutturato in termini di età risulta essere molto importante per stabilire quanti individui tra quelli pescati siano giunti a maturità sessuale e si siano quindi riprodotti almeno una volta nella vita. I riproduttori sono infatti quelli che garantiscono la disponibilità della risorsa alieutica anche per le nostre generazioni future, come stabilisce la PCP in termini di pesca sostenibile. Per *Mullus barbatus* e *Mullus surmuletus* gli individui giungono a maturità sessuale dopo il primo anno di vita, per cui quello che si è visto è la proporzione di individui di età maggiore o uguale a 1 anno rispetto al totale di individui campionati. Dai risultati dei grafici ad istogrammi e dagli studi sulle chiavi di età-lunghezza (ALK) si è potuto vedere come più dell'80% dei campioni di *M. barbatus* sia di età ≥ 1 . Sembra infatti una buona proporzione considerando che le maglie delle reti della motonave Andrea utilizzata per le campagne di ricerca sono di 10 mm in confronto alle maglie di 40mm di diametro previste di norma dal Regolamento CE 1967/2006 e che quindi catturano più giovanili rispetto a quelli che normalmente potrebbero essere catturati. Dato sconcertante comunque è che gran parte di quegli individui riproduttori catturati siano di 1 e 2 anni. Solo l'8% sul totale superano infatti i 3 anni di vita, segno comunque che la pesca di queste due risorse non permette una crescita dello stock verso le taglie ed età maggiori. Per *M. surmuletus* invece non sono stati pescati individui giovanili nelle campagne MEDITS 2012 e GRUND 2002, mentre ne sono stati pescati un 20% circa nella campagna MEDITS 2014. L'assenza degli indeterminati nei *M. surmuletus* può essere spiegata innanzitutto per la scarsa distribuzione a patch della specie nell'area di studio e quindi nel basso valore di occorrenza, ma anche per problemi di discriminazione morfologica tra i giovanili delle due specie. Confrontando successivamente le strutture di età dei *M. surmuletus* della campagna GRUND 2002 e della campagna MEDITS

2014 è possibile osservare come si passi da un picco di individui di 2 anni nei GRUND 2002 ad un picco di individui di 1 anno nei MEDITS 2014. Anche se il periodo di campionamento della GRUND risulta spostato verso tardo autunno-inverno rispetto a quello MEDITS estivo, tale abbassamento d'età potrebbe essere dovuto ad un incremento della pesca negli ultimi 12 anni. Per poter trarre però un bilancio più preciso sullo stato di entrambe le risorse è necessaria un'analisi più approfondita che tenga in considerazione anche dati di distribuzione e abbondanza delle due specie negli anni precedenti e dati sul tipo di pesca.

2. Distribuzione delle taglie ed età con la profondità – Dalle distribuzioni delle taglie e delle età per classi di profondità è emersa la maggiore frequenza dei campioni prelevati al di sotto dei 100 m di profondità. Questo è facilmente intuibile data la scarsa profondità dell'Adriatico, soprattutto della fascia medio-alta dell'area di studio, in cui sono concentrate anche il maggior numero di cale della campagna MEDITS. Inoltre, come detto nella parte introduttiva, queste specie prediligono profondità intorno ai 30-80 m, per questo quasi il 90% dei campioni viene prelevato entro i 100 m di profondità. Dalle distribuzioni inoltre si è vista la tendenza allo spostamento verso taglie ed età maggiori all'aumentare della profondità. Questo conferma la presenza dei giovanili nelle acque poco profonde costiere e delle migrazioni degli adulti riproduttori dal mare aperto alla costa per la riproduzione.
3. Distribuzione delle taglie ed età per classi di latitudine – La distribuzione delle età e delle taglie di *Mullus barbatus* per classi di latitudini risente molto del fattore profondità detto in precedenza, essendo la fascia settentrionale a profondità medie intorno a 35 m e quella centrale a profondità medie intorno ai 140 m. Le acque settentrionali del bacino sono inoltre più ricche in nutrienti per gli sversamenti ingenti del fiume Po, quindi ci sono anche condizioni di vita migliori per le specie. Una combinazione quindi dei due fattori latitudine e profondità fa sì che vi siano più campioni nella fascia settentrionale e centrale piuttosto che in quella meridionale. Contrariamente a questa tendenza c'è però un aumento vero sud dei giovanili. Nella fascia latitudinale a nord di Rimini sono infatti assenti gli individui indeterminati, mentre sono presenti nella fascia centrale e soprattutto nella fascia meridionale (tra San Benedetto del Tronto e il Gargano). Questo potrebbe essere dovuto alla corrente principale della fascia costiera italiana del mar Adriatico che va da nord a sud. I giovanili, prediligendo quindi la zona costiera,

potrebbero risentire della corrente e spostarsi più verso sud.

4. Strutture di taglia – Le curve cumulative di frequenza e le analisi successive sulle strutture di taglia hanno messo in evidenza delle differenze significative sia tra le due specie, con le curve di *Mullus surmuletus* spostate verso taglie maggiori, che tra i campioni di *Mullus surmuletus* relativi alla varie campagne. E' vero che in parte i periodi di campionamento della MEDITS 2014 e della GRUND 2002 si sono sovrapposti, visto che i primi sono durati da agosto a novembre e i secondi da ottobre a gennaio, ma andando ad analizzare la distribuzione dei campioni per periodi di campionamento è stato ottenuto il grafico di Figura 4.1.

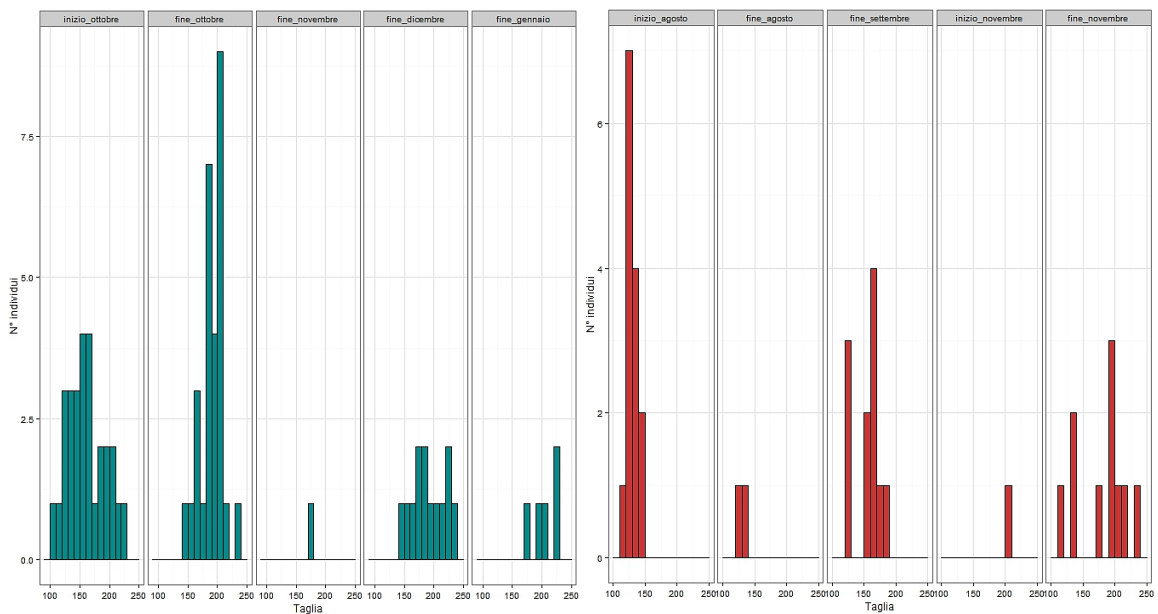


Figura 4.1 – Distribuzioni del numero di individui per taglia a seconda del periodo di campionamento

Come si è potuto osservare quindi la maggior parte dei campioni della campagna MEDITS 2014 sono stati prelevati nel periodo tra agosto e settembre, mentre per il GRUND 2002 sono stati prelevati ad ottobre, con diverse catture anche a dicembre e gennaio. Le differenze significative risultanti per le strutture di taglia possono quindi essere spiegate in questo modo, avendo passato gli individui del GRUND 2002 il periodo di massimo accrescimento sia corporeo che dell'otolite, ossia il periodo estivo.

5. Relazione taglia-peso – Grazie ai risultati ottenuti dai parametri delle relazioni lunghezza-peso è possibile determinare il tipo di accrescimento corporeo delle due specie. Infatti osservando il parametro b è stato possibile classificare le due specie ad accrescimento isometrico (se $b=3$) o allometrico (se $b \neq 3$). Per *Mullus barbatus* il parametro b è risultato molto prossimo a 3 (3.067) quindi si può parlare di

accrescimento isometrico, confermando quello che emerge anche dalla letteratura, mentre per *Mullus surmuletus* varia tra i campioni della GRUND e quelli della MEDITS 2014, essendo pari a 3.266 per i primi e 3.034 per i secondi. Si potrebbe quindi parlare di una leggera tendenza all'allometria positiva. Infine sovrapponendo le curve delle relazioni lunghezza-peso è stato possibile notare ancora una differenza tra le due specie con le curve dei *M. surmuletus* che risultavano al di sopra di quella di *M. barbatus*. Questo vuol dire che a parità di taglia i *M. surmuletus* pesano di più, quindi ulteriore prova a sostegno della leggerezza allometria positiva per i *M. surmuletus* ritrovata nei valori di b .

6. Rapporto taglia-età – Le analisi sulle chiavi di età-lunghezza hanno prodotto dei risultati molto importanti fornendo le misure di taglia media e deviazione standard per ciascuna età. Trovare una relazione tra taglia ed età è molto importante soprattutto per poterla applicare ai modelli di previsione su campioni dove non è stato possibile estrarre gli otoliti ma è stata misurata la sola taglia. Inoltre il rapporto taglia-età è stato utilizzato anche per osservare l'accrescimento delle due specie, attraverso le curve di Von Bertalanffy. Molto importante a questo scopo è stato osservare i parametri delle curve, soprattutto i valori del tasso di accrescimento K , che si sono rivelati molto differenti, con il K di *M. surmuletus* molto più grande di quello di *M. barbatus*, come ci si attendeva, dati anche i risultati precedenti sull'accrescimento corporeo.
7. Allometria – Per quanto riguarda il rapporto tra la taglia e il radius, separando i grafici per classi di radius, è stato possibile vedere la differenza di accrescimento dell'otolite nel passaggio della fase giovanile a quella adulta di *Mullus barbatus*, essendo i coefficienti di regressione b dei giovanili superiori rispetto a quelli degli adulti. Non sono state riscontrate invece grandi differenze tra le due specie sia nel rapporto taglia-radius che nel rapporto radius-età né sono state osservate differenze significative nell'accrescimento tra l'otolite destro e l'otolite sinistro, ma per questo si rimanda a studi di morfometria classica. Gli alti livelli di correlazione nelle relazioni taglia-radius e radius-età suggeriscono comunque la forte dipendenza del radius, e quindi dell'accrescimento dell'otolite, alle due variabili analizzate.
8. Incrementi dei radius – L'analisi sugli incrementi dei radius ha stabilito incrementi maggiori nel passaggio dal primo al secondo anno di vita piuttosto che nel passaggio tra il secondo e il terzo anno. Questo può essere spiegato con un cambiamento del tasso di

accrescimento dell'animale con l'aumentare della taglia e dell'età. Avendo infatti stabilito in precedenza la forte correlazione tra radius e taglia ed età e osservando l'andamento della curva di crescita di Von Bertalanffy, che presenta tassi di crescita inizialmente alti per poi stabilizzarsi verso valori minimi man mano che vengono raggiunte taglie ed età maggiori, è possibile affermare che le differenze degli incrementi derivino proprio da questo. Le differenze significative che sono state viste nel secondo gruppo di incrementi riguardo al sesso possono essere spiegate anche queste grazie al modello di Von Bertalanffy differenziato per sesso. Nel modello infatti si può vedere come le due curve siano ben diverse fra di loro con un aumento della differenziazione verso le taglie e le età maggiori, che può ripercuotersi così su una differenziazione sugli incrementi dei radius nel passaggio dal secondo al terzo anno di vita del pesce.

9. Metodi di lettura – Cercare di stabilire quale sia il metodo migliore di lettura degli otoliti è molto importante per poter indirizzare studi futuri sugli otoliti verso una metodologia unica. Se si dovesse stabilire il metodo migliore su basi tempistiche ed economiche il metodo della lettura delle immagini al computer risulterebbe senza dubbio il migliore, perché è un metodo trasversale. Sulla tempistica anche il burning risulta essere un buon metodo di stima delle età e risulta essere efficace e poco costoso. Come è stato possibile osservare dal grafico dei tre metodi a confronto per i campioni di *Mullus barbatus* la lettura normale risulta essere un metodo che sottostima le età. Gli individui che vivono ad alte profondità infatti risentono meno dei cicli stagionali, così come i loro conspecifici delle basse profondità, per cui quello che ne risulta è un'omogeneità del materiale di deposizione dell'otolite e quindi un'impossibilità di distinzione degli anelli stagionali. Il burning in questi casi risolve in parte il problema. Il metodo che però è risultato essere il migliore come facilità di lettura a stereomicroscopio degli anelli e conseguente maggiore accuratezza e precisione dei risultati è lo staining, che si colloca a metà tra la lettura normale e il burning. Lo staining però dal grafico di Figura 3.28 presenta una forte dispersione verso le taglie ed età maggiori, rispetto agli altri metodi. Risultando comunque i campioni di *Mullus barbatus* oltre i 2 anni solo l'8% del totale lo staining rimane il metodo migliore per la stima delle età di queste due specie, mentre andrebbe rivalutato per specie di taglie ed età maggiori. Come visto poi per la preparazione dei campioni, lo staining è senza dubbio il metodo più lungo e costoso, visto che richiede la presenza della troncatrice e diversi materiali di preparazione tra cui

resine e coloranti. Quello che si potrebbe suggerire con questo studio è quindi di usare lo staining per analisi di pochi campioni e un'analisi combinata lettura normale/burning per analisi con numero elevato di campioni.

RINGRAZIAMENTI

La prima persona da ringraziare per la realizzazione di questo studio è il dott. Marco Stagioni, per la sua preziosa collaborazione e disponibilità non solo all'insegnamento delle tecniche di laboratorio per l'analisi degli otoliti, ma anche dal punto di vista umano.

Ringrazio inoltre il prof. Corrado Piccinetti per la disponibilità offerta nell'ospitarmi nel Laboratorio di Biologia Marina di Fano per svolgere la tesi.

Un ringraziamento speciale va poi soprattutto ai miei genitori, che mi hanno sempre dimostrato il loro sostegno e hanno permesso che potessi fare quest'esperienza studentesca, lavorativa e soprattutto di vita molto importante per me.

Un pensiero particolare e una dedica va poi alla mia cara nonna, che ha potuto sostenermi col suo affetto in questo cammino di due anni soltanto per un breve periodo, ma che so continui a fare sempre dall'Alto.

Un grandissimo grazie va poi agli amici di una vita, Luca e Mattia, a Martina, Michela, Fabio, Marta e Giulia, Zio Sandro, Matteo, Alessandro detto Joao, Luca, Andrea, Serena e tutte quelle persone che ogni giorno della mia vita contribuiscono a farmi sorridere e a rendermi un uomo felice.

Infine come non ringraziare il mio collega/coinquilino Fabio d'Addelfio, per il suo appoggio durante tutto il corso dello svolgimento di questo lavoro di tesi, il piccolo Matteo, per i tanti momenti di gioia che mi ha regalato, e tutti i colleghi del Laboratorio di Biologia di Fano.

BIBLIOGRAFIA

AA. VV. 2013. MEDITS-Handbook. Version n. 7, MEDITS Working Group: 120 pp.

Begg, G.A., Campana, S.E., Fowler, A.J., Suthers, I.M. 2005. Otolith research and application: current directions in innovation and implementation. *Mar Freshw Res* 56: 477–483

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

Brothers, E. B., Mathews, C. P, Lasker, R. 1976. Daily growth increments in otoliths from larval and adult fishes. *Natl. Oceanic Atmos. Admin. (U.S.) Fish. Bull.* 74: 1-8.

Campana, S.E. 2004. *Photographic Atlas of Fish Otoliths of the Northwest Atlantic Ocean*. NRC Research Press, Ottawa, Ontario. 284 pp.

CARE (Committee of Age-Reading Experts). 2006. Manual on generalized age determination procedures for groundfish. <http://www.psmfc.org/care/>

Gover, T.R., Nims, M.K., Van Tassell, J. J., Collingsworth, P. D., Olesik, J. W., Ludsin, S.A., Marschall, E.A. 2014. How Much Cleaning is Needed When Processing Otoliths from Fish Larvae for Microchemical Analysis?. *Transactions of the American Fisheries Society*. 143(3): 779-783

Green, B.S., Mapstone, B., Carlos, G., Begg, G.A. 2009. *Tropical fish otoliths: information for assessment, management and ecology*. Springer, New York (NY)

Haidar, Z. 1970. L' ecologie du rouget (*M. barbatus* L.) en Adriatique orientale. *Acta adriat.* 14(1) : 1-94

Jardas, I. 1996. *The adriatic ichthyofauna*. Skolska knjiga d d, Zagreb. 556 pp

Jellyman, P.G., Booker, D.J., Crow, S.K., Jellyman, D.J. 2013. Does one size fit all? An evaluation of length-weight relationships for New Zealand's freshwater fish species. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*. 47: 450-468

Jukic, S., Piccinetti, C. 1981. Quantitative and qualitative characteristics of demersal resources in the Adriatic Sea with some population dynamics estimates. *FAO Fisheries Report n.253*

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. *Fish Res* 53: 95-104

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, C., Cruz, A. 2007. Otolith size trends in marine fish communities from different depth strata. *J Fish Biol*. 71: 53–76

Lombarte, A., Popper, A. N. 2004. Quantitative changes in the otolithic organs of the inner ear during the settlement period in European hake (*Merluccius merluccius*). *Marine Ecology Progress Series*. 267: 233–240

Lombarte, A., Recasens, L., Gonzalez, M., Gil de Sola, L. 2000. Spatial segregation of two species of Mullidae (*Mullus surmuletus* and *Mullus barbatus*) in relation to habitat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 206: 239–249

Mahé, K., Elleboode, R., Charilaou, C., Ligas, A., Carbonara, P., Intini, S. 2012. Red mullet (*Mullus surmuletus*) and striped red mullet (*M. barbatus*) otolith and scale exchange 2011. *IFREMER Document*. 30pp.

Mahé, K., Destombes, A., Coppin, F., Koubbi, P., Vaz, S., Le Roy, D., Carpentier, A. 2005. Le rouget barbet de roche *Mullus surmuletus* (L. 1758) en Manche orientale et mer du Nord. IFREMER Document. 187

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

Mann, S., Parker, S.B., Ross, M.D., Skarnulis, A.J., Williams, R.J.P. 1983. The ultrastructure of the calcium carbonate balance organs of the inner ear: an ultra-high resolution electron microscopy study. Proceedings of the Research Society of London. 218: 415-424

Matta, M.E., Kimura, D.K. 2012. Age Determination Manual of the Alaska Fisheries Science Center Age and Growth Program. NOAA Pro. Pap. NMFS 13. 97pp

Morales-Nin, B. 1990. A first attempt at determining growth patterns of some Mediterranean deep-sea fishes. *Scientia Marina*. 54: 241–248

Morales-Nin, B. 1992. Determination of growth in bony fishes from otolith microstructure. *FAO Fish. Tech. Paper*. 322: 51

Morales-Nin, B., Gutierrez, E., Massutì, S. 1995. Patterns of primary growth increments in otoliths of *Sparus aurata* larvae in relation to water temperature and food consumption. *Sci. Mar.* 59 (1): 57-64

Neumann, R. M., Allen, M. S. 2007. Analysis and Interpretation of Freshwater Fisheries Data. Guy, C. S., and Brown, M. L., editors. American Fisheries Society, Bethesda, MD. 9: 375–421

Neumann, R. M., Guy, C. S., Willis, D. W. 2012. Length, weight, and associated indices. In Zale, A. V., Parrish, D. L., and Sutton, T. M. *Fisheries Techniques*, Third Edition. American Fisheries Society, Bethesda, MD. 14: 637-676.

O'Sullivan, M. 2007. Fisheries long-term monitoring program: fish age estimation review. Dept. of Primary Industries and Fisheries, Queensland. 22 pp.

Ogle, D.H. 2015. Introduction Fisheries Analysis with R. Chapman and Hall/CRC. 317 pp.

Oxman, S.D., Barnett-Johnson, R., Smith, M.E., Coffin, A., Miller, D.L., Josephon, 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. 1992. Estimation de l'âge individuel des poissons: méthodologies et applications à des populations naturelles tropicales et tempérées. Thèse doctorat, Univ. Montpellier II Sci. Tech. Languedoc, France. 456 p

Panfili, J., De Pontual, H., Troadec, H., Wright, P.J. 2002. Manuel de sclerochronologie des poissons. Coéditions IFREMER-IRD, 464 pp

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

Pinardi, N., Arneri, E., Crise, A., Ravaioli, M., Zavatarelli, M. 2006. The physical, sedimentary and ecological structure and variability of shelf areas in the Mediterranean sea (27). Robinson, A.R., Brink, K.A., editors. The Sea Harvard University Press. 1245–1331

Polat, N., Bostanci, D., Yilmaz, S. 2005. Differences between Whole Otolith and Broken-Burnt Otolith Ages of Red Mullet (*Mullus barbatus ponticus* Essipov, 1927) Sampled from the Black Sea (Samsun, Turkey). Turk J Vet Anim Sci. 29: 429-433

Popper, A. N., Fay, R. R., Platt, C., Sand, O. 2003. Sound detection mechanisms and capabilities of teleost fishes. In Sensory Processing in Aquatic Environments. Eds. Collin, S. P., Marshall, N. J. Springer-Verlag, New York, NY . 3–38

Popper, A. N., Lu, Z. 2000. Structure-function relations in fish otolith organs. *Fisheries Research*. 46:15–25

Popper, A.N., Ramcharitar, R., Campana, S.E. 2005. Why otoliths? Insights from inner ear physiology and fisheries biology. *Mar. Freshwater Res.* 56: 497–504

R Core Team. 2015. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL. <https://www.R-project.org/>.

Rasband, W.S. 2008. IMAGEJ. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

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

Sieli, G., Badalucco, C., Di Stefano, G., Rizzo, P., D'Anna, G., Fiorentino, F. 2011. Biology of red mullet, *Mullus barbatus* (L. 1758), in the Gulf of Castellammare (NW Sicily, Mediterranean Sea) subject to a trawling ban. *J Appl Ichthyol.* 27:1218-1225

Simunovic, A., Piccinetti, C., Zore-Armanda, M. 1999. Kill of benthic organisms as a response to an anoxic state in the northern Adriatic (a critical review). *Acta Adriat.*, 40(1): 37-64

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, D.K., Campana, S.E. 1992. Otolith microstructure examination and analysis. *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 117: 126

Tuset, V.M., Lombarte, A., Assis, C.A. 2008. Otolith atlas for the western Mediterranean, north and central eastern Atlantic. *Sci Mar* 72S1: 7–198

Vallisneri, M., Montanini, S., Stagioni, M., Tommasini, S. 2009. Relazione lunghezza-peso di 7 specie della famiglia Triglidae dell'Alto-Medio Adriatico. *Biol. Mar. Mediterr.* 16 (1): 370-371

Vallisneri, M., Scapolatempo, M., Bertasi, F., Colangelo, M. 2006. Uso della microfotografia digitale nell'analisi dei contenuti stomacali: dati preliminari sulla triglia di fango, *Mullus barbatus* L. dell'Adriatico. *Biol. Mar. Medit.* 13 (2): 292-293

VanderKooy, S., Guindon-Tisdell, K. 2003. A practical handbook for determining the ages of Gulf of Mexico fishes. Gulf States Marine Fisheries Commission, Ocean Springs, Mississippi. <http://www.gsmfc.org/pubs/IJF/Otolith/otolith.htm>

Vrgoc, N., Arneri, E., Jukic-Peladic, S., Krstulovic Sifner, 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 Adriamed Tech.* 12: 105