



Università degli Studi di Cagliari

DOTTORATO DI RICERCA

Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente

Ciclo XXVII

Un approccio multidisciplinare per l'identificazione  
dello stock del nasello (*Merluccius merluccius*, Linnaeus 1758)  
nei mari sardi.

BIO/07

Presentata da

Vittori Stefania

Coordinatore Dottorato

Prof. Emanuele Sanna

Tutor

Prof. Angelo Cau

Esame finale anno accademico 2013 – 2014

La presente tesi è stata prodotta durante la frequenza del corso di dottorato in Biologia e Biochimica dell'Uomo e dell'Ambiente dell'Università degli Studi di Cagliari, a.a. 2013/2014 – XXVII ciclo, con il supporto di una borsa di studio finanziata con le risorse del P.O.R. SARDEGNA F.S.E. 2007-2013 - Obiettivo competitività regionale e occupazione, Asse IV Capitale umano, Linea di Attività 1.3.1 “Finanziamento di corsi di dottorato finalizzati alla formazione di capitale umano altamente specializzato, in particolare per i settori dell’ICT, delle nanotecnologie e delle biotecnologie, dell’energia e dello sviluppo sostenibile, dell’agroalimentare e dei materiali tradizionali”.

# SOMMARIO

<b>1. ABSTRACT .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUZIONE GENERALE.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Gli stock ittici .....</b>	<b>6</b>
2.1.1 Concetto di stock e identificazione dello stock.....	6
2.1.2 L'approccio multidisciplinare.....	7
<b>2.2 Il nasello .....</b>	<b>10</b>
2.2.1 Inquadramento sistematico e distribuzione geografica .....	10
2.2.2 Riproduzione.....	13
2.2.3 Distribuzione batimetrica e habitat.....	14
2.2.4 Pesca del nasello e stato della risorsa .....	15
<b>2.3 Stato dell'arte .....</b>	<b>17</b>
<b>2.4 Area di studio .....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 Le campagne sperimentali di pesca a strascico.....</b>	<b>24</b>
2.5.1 La campagna MEDITS.....	24
2.5.2 La campagna GRUND .....	27
<b>3. ANALISI PRELIMINARI.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Introduzione .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Materiali e metodi .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3 Risultati .....</b>	<b>31</b>
<b>3.4 Discussione .....</b>	<b>33</b>
<b>4. L'ACCRESIMENTO .....</b>	<b>34</b>
<b>4.1 Introduzione .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 Materiali e metodi .....</b>	<b>41</b>
4.2.1 Campionamento ed estrazione degli otoliti .....	41
4.2.2 Preparazione degli otoliti.....	42
4.2.3 Determinazione dell'età .....	44

4.2.4	Stima dei parametri di crescita e confronto tra le aree .....	45
4.2.5	Stima dell'accrescimento attraverso il metodo indiretto .....	47
4.2.6	Confronto tra le metodiche.....	48
<b>4.3</b>	<b>Risultati .....</b>	<b>49</b>
4.3.1	Metodica diretta .....	49
4.3.2	Stima della precisione e dell'accuratezza delle letture.....	49
4.3.3	Stima dei parametri di crescita tramite metodica diretta .....	52
4.3.4	Confronto tra le coste .....	56
4.3.5	Metodica indiretta.....	58
4.3.6	Confronto tra le metodiche.....	64
<b>4.4</b>	<b>Discussione .....</b>	<b>66</b>
<b>5.</b>	<b>MORFOMETRIA GEOMETRICA.....</b>	<b>70</b>
<b>5.1</b>	<b>Introduzione .....</b>	<b>70</b>
5.1.1	La morfometria tradizionale.....	71
5.1.2	La morfometria geometrica.....	73
5.1.3	Le tecniche di <i>superimposition</i> .....	76
5.1.4	La discriminazione degli stock attraverso la morfometria .....	78
<b>5.2</b>	<b>Materiali e metodi .....</b>	<b>82</b>
<b>5.3</b>	<b>Risultati .....</b>	<b>87</b>
<b>5.4</b>	<b>Discussione .....</b>	<b>96</b>
<b>6.</b>	<b>PARASSITOLOGIA.....</b>	<b>99</b>
<b>6.1</b>	<b>Introduzione .....</b>	<b>99</b>
6.1.1	Classificazione tassonomica del genere <i>Anisakis</i> su base morfologica.....	103
6.1.2	Morfologia delle larve del genere <i>Hysterothylacium</i> .....	110
6.1.3	Ciclo Biologico.....	111
6.1.4	La funzione di marca biologica.....	114
<b>6.2</b>	<b>Materiali e metodi .....</b>	<b>116</b>
<b>6.3</b>	<b>Risultati .....</b>	<b>120</b>
<b>6.4</b>	<b>Discussione .....</b>	<b>131</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>133</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>137</b>

# 1. Abstract

---

The “stock” concept is fundamental to fisheries management. To manage a fishery responsibly it is important to understand its stock structure and how fishing effort and mortality are distributed (Begg e Waldman, 1999). The failure to comply the true stock structure and the ineffective fisheries management of an exploited species can lead to overfishing and depletion of the stock (Begg *et al.*, 1999a). In the last years, scientific community has pointed out that the most successful way to address stock identification studies is the application of a holistic approach, thus involving a broad selection of complementary techniques (Begg *et al.*, 1999a; Abaunza, 2008a; Cadrin *et al.*, 2013).

The European hake (*Merluccius merluccius*, Linnaeus 1758) represents a basic component of the demersal communities and one of the target species in the Mediterranean Sea (Lo Brutto *et al.*, 2004; Ligas *et al.*, 2011). For this reason it has been extensively studied. Furthermore, hake stocks are generally considered over-exploited both in the Atlantic Ocean (ICES, 2011; 2012) and in the Mediterranean Sea (STECF, 2013; GFCM, 2014). At present, European hake populations in the Mediterranean Sea are managed considering several relatively small geographical sub-areas (GSAs), which are identified mainly on the basis of political considerations (Ragonese *et al.*, 2012; Vittori *et al.*, 2013). In this partition, Sardinian seas are represented by GSAs 11.1 and 11.2 and are split between two FAO Statistical Divisions (Balearic Islands and Sardinia).

It is known that the complexity of many marine species stocks is often underestimated in modern stock management processes (Begg *et al.*, 1999a). As regards the Mediterranean sea, various studies suggested a geographical distribution of the stocks that appears considerably different from the current management units partition (Abaunza *et al.*, 2000; Abaunza *et al.*, 2008c; Murta *et al.*, 2008), and this fact have been observed also for the European hake (Castillo *et al.*, 2004; Mattiucci *et al.*, 2004; Tanner *et al.*, 2012; Fiorentino *et al.*, 2014).

The need of the achievement of a comprehensive knowledge about the stock structure of a commercially important species like *M. merluccius*, has led to the development of this study, which aims, through the employment of a multidisciplinary approach, at a better geographical definition of this species stock in the waters around Sardinia.

A first insight into the complexity of the European hake population in the area has been supplied by the analysis and comparison of its length structure in the western and eastern coasts of Sardinia, showing a degree of differentiation that has been subsequently deepened through the application of various techniques.

The analysis of the variability in the growth of the species hasn't indicated a meaningful differentiation of the populations in the two sides of the island, but has suggested that the presence of many spawning areas in the western coast could be the cause of the difference in the 0 age-class mean length obtained, as well as in the length structure above-mentioned.

On the contrary, the implementation of a geometric morphometric technique to study the shape of individuals has led to the discovery of a significant, even though of moderate extent, differentiation between the two coasts. However, as remarked by Tudela (1999) and Levi *et al.* (2004) in other case-studies, these differences were believed to be linked only to environmental influences, without a connection to those biological parameters that are fundamental in the definition of a stock. This hypothesis has been made also considering that the observed difference in shape didn't seem to affect individuals' growth.

Lastly, the parasitological exam of specimens collected in the whole area of Sardinian seas, has supported the hypothesis of homogeneity of the populations in the area. Indeed, no significant differences have been found in the relative abundance and prevalence of the various parasite *taxa* examined. Comparing these results with those obtained in a similar study carried out in the Mediterranean Sea (Mattiucci *et al.*, 2004) it has been possible to highlight a considerable similarity of our study area with the central area of Mediterranean sea, and, conversely, a clear differentiation between Sardinian seas and the eastern part of Mediterranean basin. Similar considerations has been made in the context of StockMed project (Fiorentino *et al.*, 2014).

This study has therefore provided a solid evidence of the homogeneity of the European hake stock in the waters around Sardinia, leading to the conclusion that this population should be managed jointly. Moreover, it has supported the recently expressed opinion that its stock (as well as those of other important species) could be wider than expected, underlining the need of improving current management units boundaries.

## 2. Introduzione generale

---

Il nasello, *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) (Osteichthyes; Merlucciidae), specie necto-bentonica caratterizzata da un'ampia distribuzione batimetrica, rappresenta un componente fondamentale delle comunità demersali. A causa del suo alto valore di mercato è considerato una delle specie commerciali più importanti nel Mar Mediterraneo (Ligas *et al.*, 2011) e gli elevati tassi di cattura hanno portato ad una generale condizione di sovrasfruttamento delle popolazioni di questa specie (De Pontual *et al.*, 2013; GFCM 2011, 2012, 2013, 2014; Korta *et al.*, 2010; Mendoza *et al.*, 2010).

Data la sua grande importanza ecologica e commerciale, *M. merluccius* è una delle specie più ampiamente studiate, tuttavia la valutazione e la gestione degli stock risultano tuttora di difficile comprensione ed attuazione (Ligas *et al.*, 2011).

L'analisi dello stato dello stock di una specie sfruttata commercialmente dovrebbe essere sempre basata su una solida conoscenza della struttura e dell'ampiezza geografica dello stock in questione, perché ciascuna popolazione ittica possiede proprietà uniche, le quali la portano a rispondere diversamente allo sfruttamento antropico (Radhakrishnan *et al.*, 2012). Queste conoscenze si ottengono tramite studi rivolti all'identificazione dello stock, un argomento da sempre trattato nel campo della gestione delle risorse alieutiche, ma la cui importanza è stata messa in evidenza sempre più negli ultimi anni dalla comunità scientifica (Correia *et al.*, 2012; Radhakrishnan *et al.*, 2012; Papetti *et al.*, 2013; Trella *et al.*, 2013; Zischke *et al.*, 2013; Cadrin *et al.*, 2013; Tanner *et al.*, 2014).

In letteratura è universalmente riconosciuto come il metodo migliore per ottenere delle conclusioni esaurienti sulla struttura di uno stock sia quello di utilizzare diverse tecniche complementari che coprano i molteplici aspetti della biologia di una specie, ossia il cosiddetto "approccio olistico" (Begg *et al.*, 1999a; Begg e Waldman, 1999; Fariña *et al.*, 2004; Cimmaruta *et al.*, 2007; Abaunza, 2008a; Correia *et al.*, 2012; Papetti *et al.*, 2013; Trella *et al.*, 2013; Zischke *et al.*, 2013; Cadrin *et al.*, 2013; Tanner *et al.*, 2014). La necessità dell'applicazione di tecniche differenti è dovuta in parte alla stessa definizione di "stock" dal punto di vista gestionale: questo concetto non è infatti esclusivamente genetico, ma indica un gruppo più o meno separato di individui con particolari caratteristiche importanti per la gestione (Begg e Waldman, 1999). Integrare quindi i risultati di ciascuna metodica

permette di definire la struttura di uno stock con un grado di precisione superiore, e di avere una maggiore probabilità di cogliere un'eventuale componente della variabilità tra due o più stock.

L'obiettivo di questo lavoro è quello di ottenere preziose informazioni sulla struttura delle popolazioni di nasello, utilizzando appunto un approccio multidisciplinare. L'area che si è scelto di investigare comprende i mari circostanti la Sardegna, nei quali la popolazione di nasello viene attualmente considerata omogenea e dunque gestita individualmente (GFCM, 2009). In Mediterraneo infatti l'attuale gestione delle popolazioni delle specie ittiche commerciali, è basata su delle unità gestionali corrispondenti ad aree (*Geographical Sub-Areas*, GSA) relativamente piccole, identificate dalla GFCM soprattutto secondo criteri politici e gestionali (Ragonese *et al.*, 2012; Vittori *et al.*, 2013). Con il presente lavoro ci si auspica quindi di fornire un contributo che possa portare ad una valutazione dell'adeguatezza dell'attuale suddivisione in unità gestionali.

I mari sardi costituiscono inoltre un ottimo areale per testare uno studio di identificazione degli stock su piccola scala. I fondali di quest'area sono caratterizzati da una grande variabilità geomorfologica e di habitat naturali (Cau *et al.*, 1994), inoltre, la costituzione del programma delle campagne di pesca sperimentali MED.I.T.S. (Mediterranean International Trawl Survey, Bertrand *et al.*, 2002) ha reso possibile, sin dal 1994, la creazione di un'ampia serie storica di importanti informazioni su diverse specie demersali, tra cui appunto il nasello.

Considerati i risultati talvolta discordanti finora ottenuti dagli studi svolti nel Mediterraneo, si è deciso di indirizzare il lavoro verso l'analisi della variabilità fenotipica, più adatta per analisi su piccola scala, in modo da evidenziare eventuali differenze nella biologia e demografia della specie, che potrebbero essere difficilmente rilevabili tramite analisi genetiche.

Durante i tre anni di lavoro sono state dunque portate avanti in parallelo diverse analisi. In primo luogo, è stato svolto un approfondimento dell'analisi sulla struttura di taglia delle popolazioni che occupano le coste occidentale ed orientale della Sardegna, utilizzando la serie storica di dati raccolti nell'ambito del progetto MED.I.T.S. (Bertrand *et al.*, 2002); in seguito, si è analizzato l'accrescimento, un parametro fondamentale della *life history* delle specie ittiche, sia attraverso metodiche dirette che indirette. Come terzo approccio, è stata svolta un'analisi della variabilità morfometrica degli individui raccolti



attraverso tecniche di morfometria geometrica. Infine, l'ultimo tassello di questo studio è costituito da un'analisi parassitologica, durante la quale è stata analizzata la distribuzione dei parassiti della famiglia Anisakidae all'interno dei naselli delle varie aree.

Queste tematiche, e le analisi svolte per ciascuna di esse, sono illustrate separatamente in quattro diversi capitoli della presente tesi, seguiti da una sintesi ed integrazione di ciascun risultato ottenuto.

## 2.1 Gli stock ittici

### 2.1.1 Concetto di stock e identificazione dello stock

Esistono diverse interpretazioni del concetto di stock ittico in letteratura, ma quella più comunemente accettata è stata formulata da Ihssen *et al.* (1981) in cui uno stock corrisponde ad un gruppo di individui intraspecifico, i quali si riproducono in maniera casuale tra loro e si mantengono nel tempo, in una determinata area. Questo concetto è parallelo a quello di popolazione, ma è in particolare riferito a quella componente di una specie che viene commercialmente sfruttata attraverso le attività di pesca (Shaklee e Currens, 2003; Abaunza, 2008a).

Ciascuno stock potrebbe avere proprietà demografiche uniche e dunque una differente risposta allo sfruttamento antropico, perciò dovrebbe essere gestito separatamente in modo da assicurare una pesca sostenibile ed una conservazione efficiente dello stock stesso (Radhakrishnan *et al.*, 2012).

Il processo di identificazione di uno stock ittico è infatti una componente integrante delle moderne valutazioni degli stock sottoposti alla pesca. Tuttavia, considerando l'importanza di questo genere di informazioni, è sorprendente come vi sia una scarsità di assessments che si basano realmente su una identificazione dello stock (Begg *et al.*, 1999a).

La scarsa conoscenza della struttura di uno stock ed una gestione inefficiente della pesca può portare a cambiamenti drammatici nelle caratteristiche biologiche e nella produttività di una specie, così come nella sua diversità genetica (Altukhov, 1981; Ricker, 1981; Smith *et al.*, 1991).

In una review dedicata al ruolo dell'identificazione degli stock nei processi di *stock assessment*, Begg *et al.* (1999a) afferma che diverse specie ittiche marine hanno una struttura dello stock più complessa di ciò che è attualmente riconosciuto in ambito gestionale, e suggerisce che in molti casi si cerca di gestire complessi di stock o metapopolazioni piuttosto che singoli stock separati. Sottolinea inoltre come la gestione di stock complessi nella scala più appropriata rimanga una grande sfida, ma è essenziale per la gestione della pesca, soprattutto all'interno del contesto dell'approccio precauzionale.

L'identificazione di uno stock ha inoltre applicazioni secondarie nella scienza della pesca, che possono risultare meno ovvie ma non meno importanti. Ciascuna ricerca concernente i diversi aspetti di una risorsa vivente (parametri vitali generali, accrescimento,

fisiologia ecc.) svolta attraverso un campionamento di una popolazione non può prescindere dalla conoscenza della struttura di questa. L'identificazione degli stock può essere vista dunque come un prerequisito di base per ciascuna analisi legata alla pesca (Cadrin *et al.*, 2013).

### 2.1.2 L'approccio multidisciplinare

E' ormai riconosciuto in letteratura come l'approccio olistico (ossia l'applicazione di diverse tecniche di analisi) sia da preferirsi per l'identificazione di uno stock (Begg *et al.*, 1999a; Begg e Waldman, 1999; Fariña *et al.*, 2004; Cimmaruta *et al.*, 2007; Abaunza, 2008a; Correia *et al.*, 2012; Papetti *et al.*, 2013; Trella *et al.*, 2013; Zischke *et al.*, 2013; Cadrin *et al.*, 2013; Tanner *et al.*, 2014). Infatti, l'effetto integrativo di questo approccio massimizza la probabilità di definire correttamente gli stock ittici e la sovrapposizione di tutte le informazioni disponibili, provenienti da tecniche differenti, rende possibile lo sviluppo di un pattern di struttura dello stock coerente e completo (Begg *et al.*, 1999a).

Ogni tecnica è infatti in grado di evidenziare e rilevare un differente aspetto della struttura di una popolazione ittica. Ad esempio, la variabilità genetica tra stocks può rappresentare una base diretta per la definizione della struttura di questi ma può risultare inadeguata poiché livelli di differenziazione genetica bassi e inconsistenti possono comunque mascherare un alto livello di separazione demografica tra gli stock (Ward, 2000; Hatfield *et al.*, 2005; Mariani *et al.*, 2005; Cimmaruta *et al.*, 2007).

Al contrario, la variabilità fenotipica, sebbene non fornisca una prova diretta di isolamento genetico, può indicare una separazione prolungata di pesci in diversi regimi ambientali. Può dunque essere facilmente utilizzabile per studiare la variabilità indotta dall'ambiente nel breve termine e può essere per questo più adatta alla gestione della pesca (Cadrin, 2000; Hatfield *et al.*, 2005). Questa definizione di "stock fenotipico" risulta meno conservativa di quella basata sulla genetica, perché considera una maggiore mescolanza tra gli stock, ma l'isolamento parziale è sufficiente da rendere persistenti alcune differenze geografiche. Queste differenze, se connesse all'ontogenesi degli individui (come nel caso della morfometria) influenzano diversi attributi della popolazione (e.g., riproduzione, fecondità, longevità, struttura di taglia) che sono intimamente legati alla dinamica di popolazione (tasso intrinseco di crescita, capacità portante, produttività, resilienza, ecc.) e determinano la risposta di ciascuno stock allo sfruttamento (Cadrin, 2013).

Il crescente interesse verso l'approfondimento delle conoscenze sulla struttura degli stock ittici ha portato allo svolgimento di numerosi studi di questo tipo in Europa e nel mondo negli ultimi 20 anni.

L'attenzione della comunità scientifica per questa problematica è stata così evidente che l'International Council for the Exploration of the Sea (ICES) ha costituito un gruppo di lavoro con il compito specifico di analizzare e promuovere le metodiche di riconoscimento degli stocks (Stock Identification Methods Working Group, SIMWG) (ICES, 2013).

A causa della grande mole di lavoro richiesta da uno studio di tipo multidisciplinare, l'Unione Europea ha inoltre scelto di finanziare alcuni progetti internazionali rivolti a diverse specie di alto valore commerciale. In ciascuno di questi casi, sono stati selezionati diversi approcci, affidando ciascuna analisi ad un diverso gruppo di esperti e sintetizzando infine i risultati ottenuti. Le analisi scelte per l'identificazione degli stock in questi progetti sono diverse: ad esempio il progetto HOMSIR (Abaunza *et al.*, 2000) ha analizzato lo stock del sugarello, *Trachurus trachurus*, nelle acque dell'Atlantico e del Mediterraneo utilizzando marcatori genetici, analisi parassitologiche, morfometria degli individui e degli otoliti, marcatura e parametri della *life history*.

I risultati ottenuti, nell'ambito di questo progetto, attraverso le analisi genetiche sono risultati molto interessanti relativamente alla biologia della specie (migrazioni, livello di variabilità, ecc.) ma non sono stati sufficienti per la definizione dei limiti degli stocks. Al contrario, altri fattori (morfometria, parassiti, distribuzione e circuito migratorio) hanno ad esempio identificato uno stock in corrispondenza delle coste atlantiche della penisola iberica, area che viene invece considerata all'interno del più ampio "southern stock" dalla ICES (Abaunza *et al.*, 2008c). Un altro importante risultato ottenuto grazie al progetto è stato l'identificazione di almeno tre diversi stock all'interno del bacino del Mediterraneo.

Un lavoro simile è stato svolto nell'ambito del progetto REDFISH (Rätz, 2004; www.redfish.de) per il genere *Sebastes* che ha utilizzato invece analisi morfometriche, della chimica degli elementi negli otoliti e vari metodi genetici. In questo caso le analisi hanno fornito una base importante per gli esperti partecipanti al SGSIMUR (*Study Group on Stock Identity and Management Units of Redfishes*, ICES), per la definizione di tre differenti unità gestionali per questa specie nell'Irminger sea (ICES, 2004).

Infine, il progetto WESTHER (Hatfield *et al.*, 2005; [www.clupea.net/westher](http://www.clupea.net/westher)) ha investigato tramite morfometria, analisi meristiche, parassitologia, genetica e microstruttura e microchimica degli otoliti la popolazione di aringhe (*Clupea harengus*) nel nord Atlantico.

## 2.2 Il nasello

### 2.2.1 Inquadramento sistematico e distribuzione geografica

L'inquadramento sistematico di *Merluccius merluccius*, riferito allo schema classificativo di Whitehead *et al.*, (1986) è rappresentato in Tab 2.1.

Tab. 2.1 - Inquadramento sistematico di *Merluccius merluccius* (L., 1758)

<b>Phylum</b>	CHORDATA
<b>Subphylum</b>	VERTEBRATA
<b>Superclasse</b>	GNATHOSTOMATA
<b>Classe</b>	OSTEICHTHYES
<b>Sottoclasse</b>	ACTINOPTERYGII
<b>Ordine</b>	GADIFORMES
<b>Famiglia</b>	Merlucciidae
<b>Sottofamiglia</b>	Merluccinae
<b>Genere</b>	<i>Merluccius</i>
<b>Specie</b>	<i>Merluccius merluccius</i> (Linnaeus, 1758)

Il nasello appartiene alla famiglia Merlucciidae, che raggruppa pesci bento-pelagici caratteristici di acque fredde o temperate e che si nutrono di una grande varietà di prede (Lloris *et al.*, 2005).

Le specie appartenenti al genere *Merluccius* descritte finora nel mondo sono 13 (Lloris *et al.*, 2005) e questo genere presenta una distribuzione geografica piuttosto ampia (Fig. 2.1), sebbene si possa notare una certa discontinuità in corrispondenza delle latitudini equatoriali o nelle aree attigue.

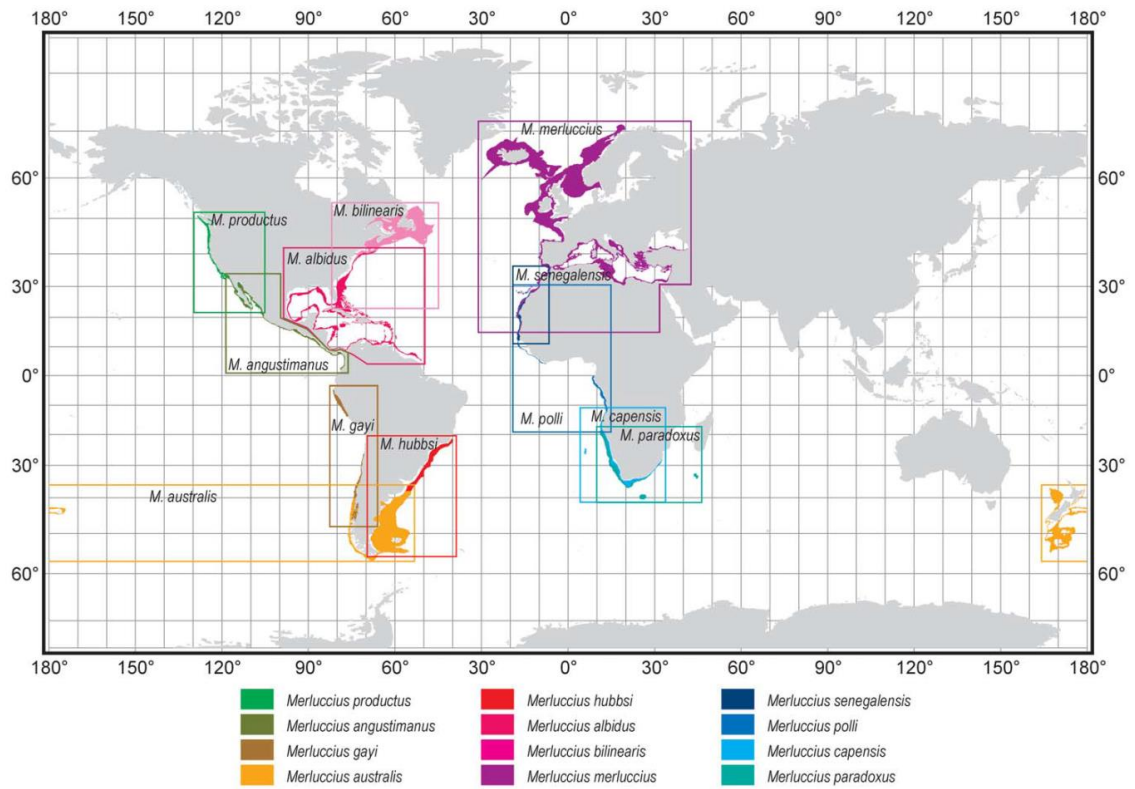


Fig. 2.1 - Distribuzione geografica delle specie del genere *Merluccius* (da Lloris *et al.*, 2005).

In particolare, il genere è più comune nell'Oceano Atlantico e lungo la costa orientale dell'Oceano Pacifico, ma la specie *Merluccius merluccius* è caratteristica delle coste nord-occidentali dell'Atlantico e del Mar Mediterraneo (Fig. 2.2).

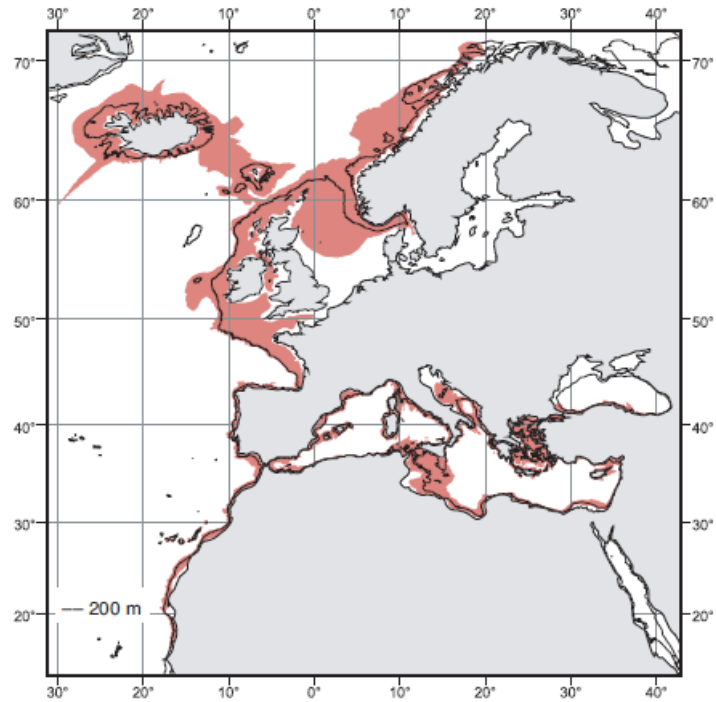


Fig. 2.2 - Distribuzione nota della specie *Merluccius merluccius* (da Lloris *et al.*, 2005).

Come tutte le altre specie del genere *Merluccius*, il nasello è caratterizzato da un corpo fusiforme e simmetrico ricoperto da piccole scaglie (Fig. 2.3). Presenta due pinne dorsali, la prima costituita generalmente da 7-10 raggi, mentre la seconda, più lunga, è formata da 36-40 raggi. Negli individui giovanili (fino a 20 cm di lunghezza standard), la proiezione all'indietro delle pinne pettorali raggiunge all'incirca la posizione dell'apertura anale, mentre negli adulti la pinna risulta spesso più corta. La colorazione è grigia sul dorso, più chiara lungo i fianchi e bianca sul ventre.



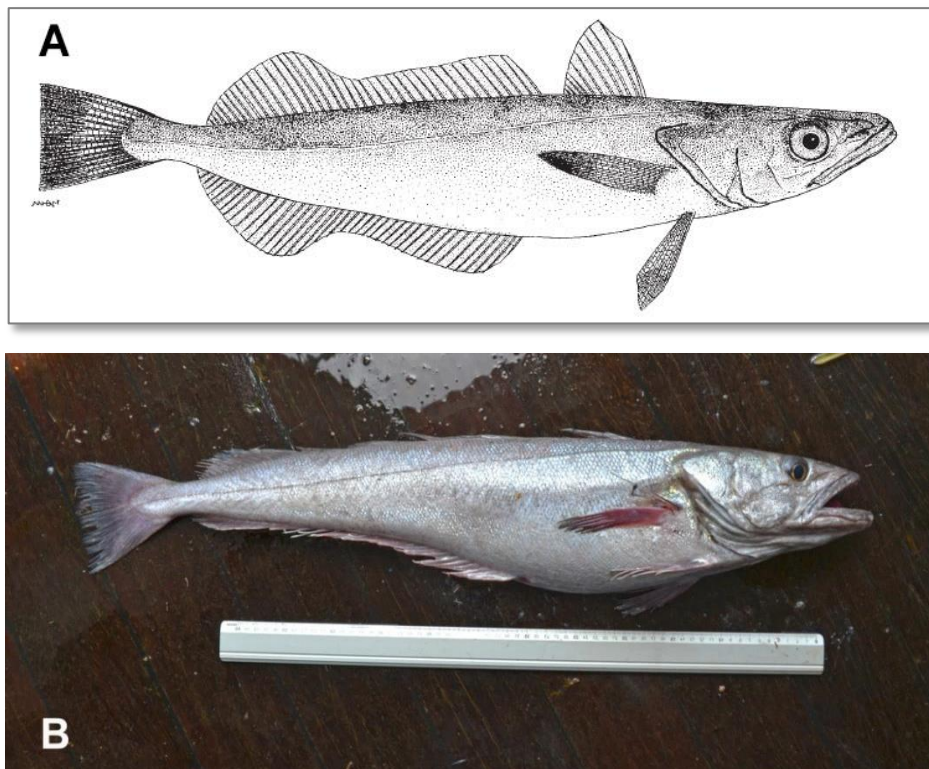


Fig. 2.3 – A) Il nasello (*Merluccius merluccius*, Linnaeus, 1758) (da Lloris *et al.*, 2005). B) Esemplare femmina di 83 cm (lunghezza totale) e 4,1 kg (peso totale) catturato nelle acque a sud della Sardegna nel Luglio del 2012.

## 2.2.2 Riproduzione

*M. merluccius* è caratterizzato da un tipo di deposizione delle uova definito “a lotti”, che consiste nel rilascio degli oociti idratati in diversi lotti durante la stagione riproduttiva (Korta *et al.*, 2010a). Inoltre, viene considerato una specie con fecondità indeterminata, poiché mostra un’ampia distribuzione taglia-frequenza degli oociti e la vitellogenesi può essere rilevata durante tutto l’anno, almeno a livello di popolazione (Korta *et al.*, 2010b; Murua and Motos, 2006).

La riproduzione di questa specie avviene in maniera quasi continua durante l’anno, ma presenta generalmente due picchi principali: in Mediterraneo è stato infatti osservato un primo picco in tarda estate (Agosto–Settembre) ed un secondo a fine inverno (Febbraio–Marzo) (Arneri *et al.*, 2000; Belcari *et al.*, 2006). Durante le fasi larvali e giovanili i naselli sono caratterizzati da uno stile di vita pelagico e prediligono acque vicine alla costa.

In Sardegna il reperimento di esemplari con gonade matura è risultato esiguo. I pochi dati a disposizione concordano tuttavia con ciò che è presente in letteratura poiché è emerso che la specie, pur esibendo un periodo riproduttivo esteso a tutto l'anno, presenta un picco di attività sessuale nel periodo Gennaio-Marzo (AA.VV., 2011).

### 2.2.3 Distribuzione batimetrica e habitat

Il nasello è una specie necto-bentonica che è molto comune in batimetrie comprese tra i 50 e 200 m di profondità (Oliver e Massuti, 1995), sebbene la sua distribuzione complessiva sia molto più ampia (20 – 1000 m) e possa variare in base all'età e alle esigenze trofiche e riproduttive (Flamigni, 1984).

Diversi autori hanno osservato come la distribuzione degli individui sia dipendente dalla taglia, in particolare le larve e gli individui giovanili (lunghezza totale < 20 cm) vivono a profondità comprese tra 100 e 200 m, mentre gli individui adulti sono più comuni a profondità maggiori (Maynou *et al.*, 2003; Ferraton *et al.*, 2007).

La distribuzione geografica delle aree di nursery del nasello è stata oggetto di studio in Sardegna, utilizzando i metodi della geostatistica (indicator kriging e bayesian kriging) sui dati raccolti durante le campagne di pesca sperimentali. Analisi recenti (progetto Nursery, SIBM, MiPAAF) hanno confermato la presenza di importanti zone di concentrazione delle reclute nella regione occidentale dell'isola. In particolare le reclute del nasello sono presenti in tutta l'area, principalmente tra 100 e 300 m, con maggiore persistenza al largo di Buggerru (Sardegna Sud-occidentale) (AA.VV., 2011).

### 2.2.4 Pesca del nasello e stato della risorsa

Il nasello ha sempre rappresentato una importante risorsa alimentare per le popolazioni dell'Europa occidentale e, per quanto riguarda il Mediterraneo, l'Italia è uno dei paesi in cui questa specie ha un ruolo fondamentale nell'industria della pesca.

Per questo motivo le popolazioni di nasello sono spesso sottoposte ad una notevole pressione di pesca, che ha causato una generale condizione di sovrasfruttamento degli stock della specie in tutta Europa (De Pontual *et al.*, 2013; 2014; Korta *et al.*, 2010; Mendoza *et al.*, 2010).

Come evidenziato dalle ultime stime della *General Fisheries Commission for the Mediterranean* (GFCM) infatti, i valori di  $F_{curr}$  (mortalità da pesca corrente) risultano, in ciascuna GSA analizzata, sempre superiori al valore di  $F_{0,1}$  ed  $F_{max}$  (rispettivamente, optimum della mortalità da pesca in termini di produzione e valore massimo della mortalità da pesca sostenibile), risultando in alcuni casi anche dieci volte maggiori (GFCM 2011, 2012, 2013, 2014).

La stessa situazione emerge dagli ultimi rapporti del *Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries* (STECF) che ha evidenziato uno stato di sfruttamento non sostenibile delle popolazioni di nasello in tutte le GSA mediterranee analizzate (tra cui anche la GSA 11, corrispondente ai mari di Sardegna). In particolare, viene affermato che gli individui su cui ricade maggiormente lo sfruttamento sono appartenenti alle classi di età 1 e 2 e viene messo in evidenza come una riduzione dello sforzo di pesca sia necessaria in tutte le aree (STECF, 2011a, 2011b, 2012a, 2012b, 2013).

Gli stock dell'Atlantico settentrionale hanno invece mostrato negli ultimi anni segnali di ripresa spiegabili in particolare con un incremento nei tassi di reclutamento, ma il livello di sfruttamento di questi stock viene tuttavia considerato ancora troppo alto (ICES, 2011; 2012).

Anche in Sardegna, come nel resto del Mediterraneo, *Merluccius merluccius* è la specie maggiormente rappresentata nelle catture, sia dal punto di vista ponderale che numerico (AA.VV., 2011).

Secondo i dati riportati nell'ultima relazione del programma di Campionamento Biologico delle Catture Commerciali (CAMP.BIOL.) gli sbarcati complessivi per questa specie nell'isola hanno ammontato a ben 255979 kg (Cau *et al.*, 2014b).

Gran parte dello sbarcato commerciale proviene dalla pesca a strascico, mentre una frazione minore viene prelevata tramite reti da posta. La pesca del nasello tramite palamiti di profondità, che è indirizzata soprattutto ad individui di taglia grande, non è invece praticata in maniera costante in Sardegna.

La pesca a strascico è caratterizzata da una bassa selettività di cattura. Gli attrezzi in uso, seppure rispettino la dimensione di maglia legale, catturano una porzione rilevante di esemplari di piccole dimensioni, appartenenti dunque alle prime fasi del ciclo vitale della specie. In Fig. 2.4 è riportata la distribuzione di taglia per il nasello ottenuta con i dati raccolti nell'ambito del progetto CAMP.BIOL. nell'anno 2013: la porzione di individui al di sotto della taglia di cattura (pari a 20 cm LT), e quindi scartati, è risultata pari al 40,4 %. Nello stesso anno infatti 2013 l'ammontare complessivo dello scarto (per la pesca a strascico) nella GSA 11 è stato pari a 2364,45 kg (Cau *et al.*, 2014b).

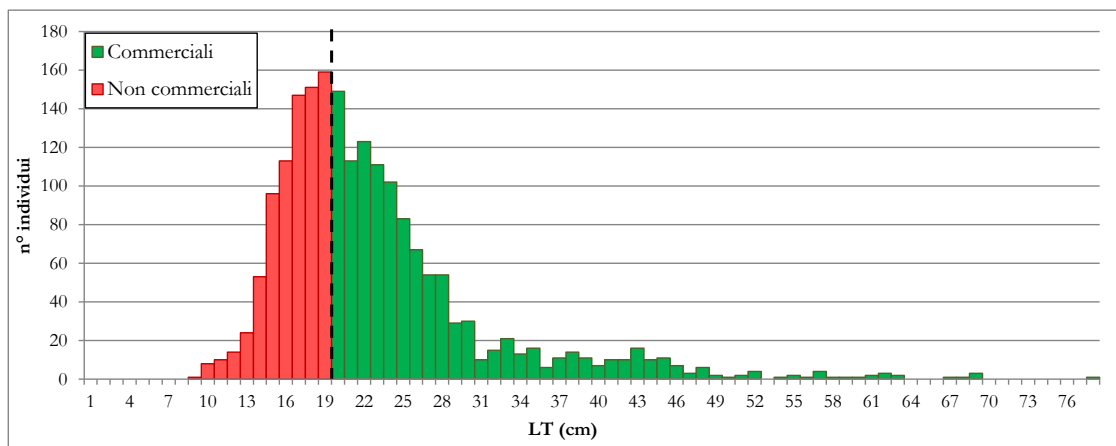


Fig. 2.4 – Esempio di distribuzione taglia-frequenza (LFD) della specie *M. merluccius* tratta dalla pesca commerciale.

In particolare, le recenti valutazioni dello stock in Sardegna (AA.VV., 2011) hanno sottolineato come la specie risulti essere in una situazione di overfishing che si mantiene tuttavia stabile negli anni. Questa situazione potrebbe essere imputabile alla predominanza delle catture tramite pesca a strascico, che insiste maggiormente sulla porzione “giovane” della popolazione, senza intaccare lo stock dei grossi riproduttori che garantiscono un costante reclutamento negli anni (AA.VV., 2011).

## 2.3 Stato dell'arte

Nonostante il progresso nelle diverse tecniche utilizzate nell'identificazione degli stocks, il problema della definizione delle unità gestionali di molte specie commerciali non è ancora risolto, e la specie *M. merluccius* rientra in questi casi (Tanner *et al.*, 2014).

La struttura degli stock di questa specie in Mediterraneo è stata infatti analizzata da diversi autori con varie metodiche, ma senza ottenere risultati affidabili (Morales-Nin *et al.*, 2014) oppure raggiungendo conclusioni contrastanti, come evidenziato in una review da Cimmaruta *et al.* (2014), nella quale cita i lavori di Mattiucci *et al.* (2004, 2007) e Cimmaruta *et al.* (2005). Questi autori hanno infatti ottenuto risultati parzialmente differenti per quanto riguarda il posizionamento del confine tra le popolazioni atlantiche e quelle mediterranee, attraverso l'utilizzo delle tecniche parassitologiche e genetiche.

Nel lavoro svolto da Cimmaruta *et al.* (2005) viene inoltre testata anche l'eventualità di una certa sub-strutturazione della popolazione di nasello all'interno del Mediterraneo oppure nell'Atlantico. Tuttavia, le analisi svolte non hanno in questo caso consentito l'individuazione di differenze significative all'interno di nessuna delle due aree.

Castillo *et al.* nel 2004, attraverso l'analisi dei loci microsatelliti, al contrario ha riscontrato una certa strutturazione genetica della popolazione anche all'interno del Mediterraneo (in particolare una differenziazione della popolazione del Mar Egeo rispetto alle popolazioni del Mediterraneo centrale ed occidentale), mentre questa non risulta evidente in Lo Brutto *et al.* (2004) ed in Tanner *et al.* (2014). Entrambi i disegni di campionamento di questi ultimi presentano tuttavia un numero limitato di stazioni all'interno di questo bacino, posizionate esclusivamente nella porzione centro-occidentale del Mediterraneo, mentre l'analisi è più dettagliata per l'Oceano Atlantico. Tanner *et al.* (2014) in particolare ha considerato nell'indagine soltanto due campioni mediterranei, provenienti dalle Isole Baleari e dalla Sardegna, e, attraverso le analisi genetiche, non ha riscontrato differenziazione tra i campioni. Lo stesso autore tuttavia, applicando sugli stessi campioni l'analisi dei microelementi degli otoliti (Tanner *et al.*, 2012) aveva precedentemente evidenziato un certo grado di separazione tra gli individui delle Baleari e quelli provenienti dalla Sardegna. Quest'unico risultato tuttavia non è stato considerato sufficiente per effettuare una discriminazione tra eventuali stocks.

Analizzando la struttura della popolazione di questa specie nei due versanti dello Stretto di Sicilia, Levi *et al.* (2004) ha riscontrato una omogeneità dal punto di vista genetico, pur sottolineando una certa differenziazione tra le aree con le analisi morfometriche. Una analisi più approfondita delle popolazioni mediterranee è stata effettuata invece da Mattiucci *et al.* nel 2004, il quale ha evidenziato la presenza di una certa sub-strutturazione in questo bacino attraverso l'analisi dei pattern di distribuzione dei parassiti del genere *Anisakis* sui campioni di nasello utilizzati.

Attualmente, le popolazioni atlantiche e mediterranee di questa specie vengono gestite come stocks separati nonostante vi siano pareri discordi riguardo la presenza di un piccolo flusso migratorio tra queste due aree nei pressi dello Stretto di Gibilterra (Roldán *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 2004; Mattiucci *et al.*, 2004; Tanner *et al.*, 2014). Questa scelta è tuttavia basata su differenze riscontrate nella biologia, nella morfologia ed anche genetica della specie (Abaunza *et al.*, 2001; Lo Brutto *et al.*, 2004; Mellon-Duval *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda l'Atlantico, l'International Council for the Exploration of the Sea (ICES) ha suddiviso le popolazioni di nasello in due stocks principali (settentrionale e meridionale) utilizzando il canyon di Capbreton (Bay of Biscay, Francia) come delimitazione tra questi (Tanner *et al.*, 2014). Tuttavia, la suddivisione di questi due stocks è stata basata soprattutto su considerazioni gestionali, più che su informazioni biologiche (ICES, 2011).

Nel Mar Mediterraneo invece, le popolazioni di nasello sono gestite e valutate considerando aree più piccole (GSA) definite dalla General Fisheries Commission for the Mediterranean (GFCM) (Cardinale *et al.*, 2011) (Fig. 2.4).

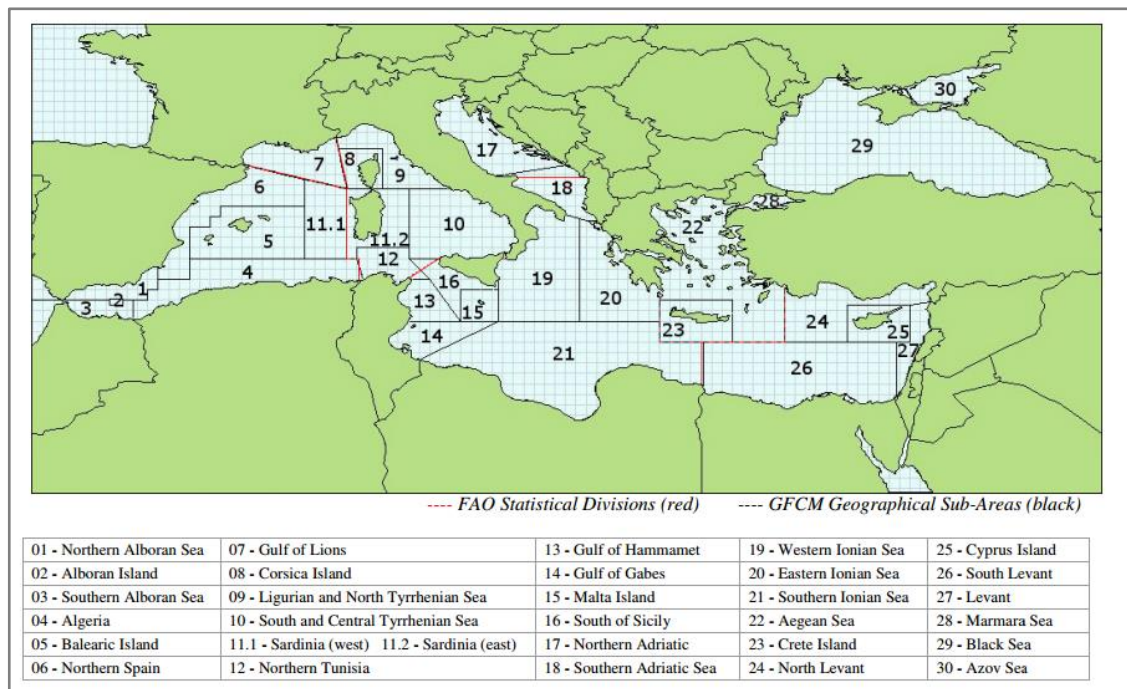


Fig. 2.5 – Geographical Sub Areas (GSAs) considerate dalla GFCM. In rosso sono evidenziati i confini delle “FAO Statistical Divisions”. Da GFCM, 2009.

Tuttavia, anche in questo caso le aree sono state selezionate più secondo criteri politici e gestionali che su considerazioni biologiche (Ragonese *et al.*, 2012; Vittori *et al.*, 2013).

La necessità di ottenere ulteriori informazioni sulla reale struttura degli stock delle principali specie ittiche commerciali in Mediterraneo ha portato all’attuazione di un altro progetto, recentemente portato a termine, denominato StockMed (*Stock units: Identification of distinct biological units (stock units) for different fish and shellfish species and among different GFCM-GSA*). L’obiettivo di questo progetto internazionale è stato quello di fornire appunto una visione scientifica aggiornata sulla connettività e sui confini degli stock mediterranei di diverse specie rilevanti, tra le quali anche il nasello (Fiorentino *et al.*, 2014), sulla quale riformulare eventualmente le unità gestionali. La valutazione è stata effettuata basandosi sui tratti della *life history* ma anche su informazioni derivanti dalla pesca e dagli ultimi studi effettuati, come studi biometrici, parassitologici, di marcatura e ricattura, diversi marcatori genetici, sulla mobilità delle specie, analisi sulle caratteristiche e la durata degli embrioni e delle fasi larvali, parametri di crescita, etc) includendo, quando possibile, considerazioni sui fattori idrologici e le caratteristiche del fondale (Fiorentino *et al.*, 2014).

La Sardegna, per la sua posizione centrale nel bacino occidentale del Mediterraneo, risulta essere un’area particolarmente interessante. Infatti, secondo l’ultima risoluzione

GFCM (2009), la GSA corrispondente all'isola (GSA 11) risulta suddivisa in due aree (GSA 11.1 e 11.2) le quali appartengono però a due Divisioni FAO differenti. Mentre la prima, denominata *Sardinia west* rientra nella Divisione delle Isole Baleari, la seconda (*Sardinia east*) viene raggruppata insieme alla Corsica e ad alcuni mari Italiani (Tab. 2.2).

Tab. 2.2 – Tavola delle Geographical Sub-Areas (GSAs) appartenenti alla Sub-Area FAO del Mediterraneo occidentale (GFCM,2009).

FAO SUBAREA	FAO STATISTICAL DIVISIONS	GSAs
WESTERN	1.1 BALEARIC	1 Northern Alboran Sea
		2 Alboran Island
		3 Southern Alboran Sea
		4 Algeria
		5 Balearic Island
		6 Northern Spain
	1.2 GULF OF LIONS	11.1 Sardinia (west)
		7 Gulf of Lions
	1.3 SARDINIA	8 Corsica Island
		9 Ligurian and North Tyrrhenian Sea
		10 South Tyrrhenian Sea
		11.2 Sardinia (east)
12 Northern Tunisia		

Attraverso il calcolo di un Holistic Acceptability Index (HAI) nell'ambito del progetto StockMed è stata proposta una suddivisione degli stock del nasello che considera 6 unità all'interno del bacino Mediterraneo, considerando le due sotto-aree della GSA11 all'interno di un unico stock di dimensioni più ampie comprendente il Mar Tirreno, il Mar Ligure, una parte del canale di Sicilia e parte del Mar Ionio (Fiorentino *et al.*, 2014).



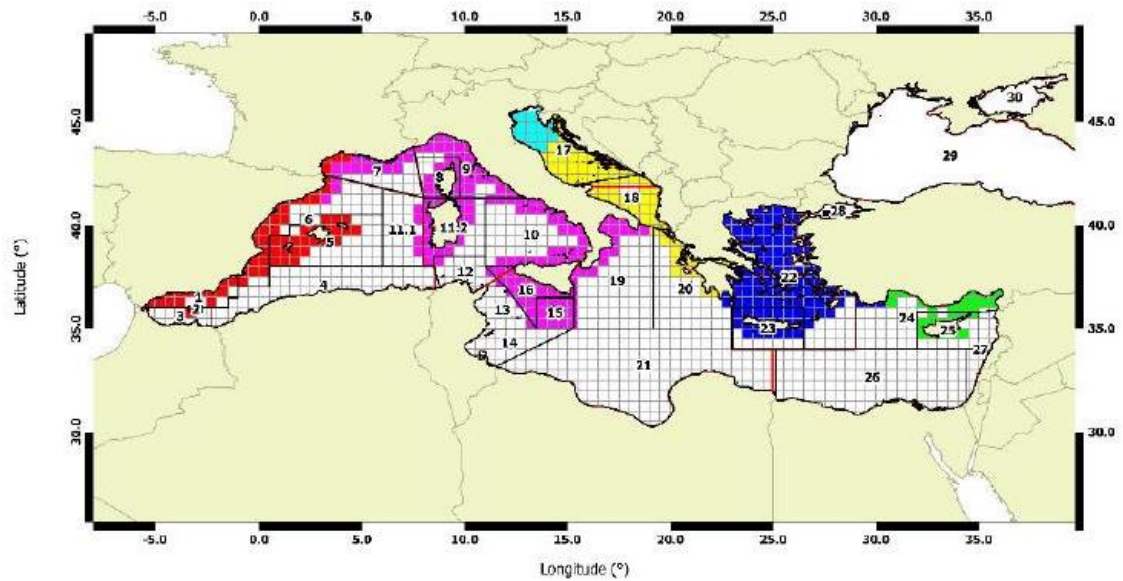


Fig. 2.6 – Configurazione delle sei unità di stock identificate nell'ambito del progetto StockMed in confronto con l'attuale confine delle GSA identificate dalla GFCM (Fiorentino *et al.*, 2014).

Alla luce di queste ultime informazioni ottenute, lo studio sviluppato in questa tesi è volto a dimostrare, attraverso il contributo dei nostri risultati relativi ad una scala spaziale più ristretta, se la suddivisione della GFCM ha ancora ragione di esistere o al contrario, sarebbe più opportuno considerare la popolazione della Sardegna come un unico stock, ampliandolo inoltre ad un area spaziale più grande.

## 2.4 Area di studio

L'area di studio, da cui sono stati prelevati tutti i campioni utilizzati in questo lavoro, è costituita dai mari circostanti la Sardegna (Fig. 2.5) e corrisponde alla Geographical Sub-Area (GSA) 11 per la GFCM. Rappresenta una delle aree più interessanti del bacino centro-occidentale del Mediterraneo, non solo per la sua posizione geografica, ma anche per l'estensione delle superfici potenzialmente sfruttabili dalla pesca e per le caratteristiche geomorfologiche dei fondali marini (Cau *et al.*, 1994).

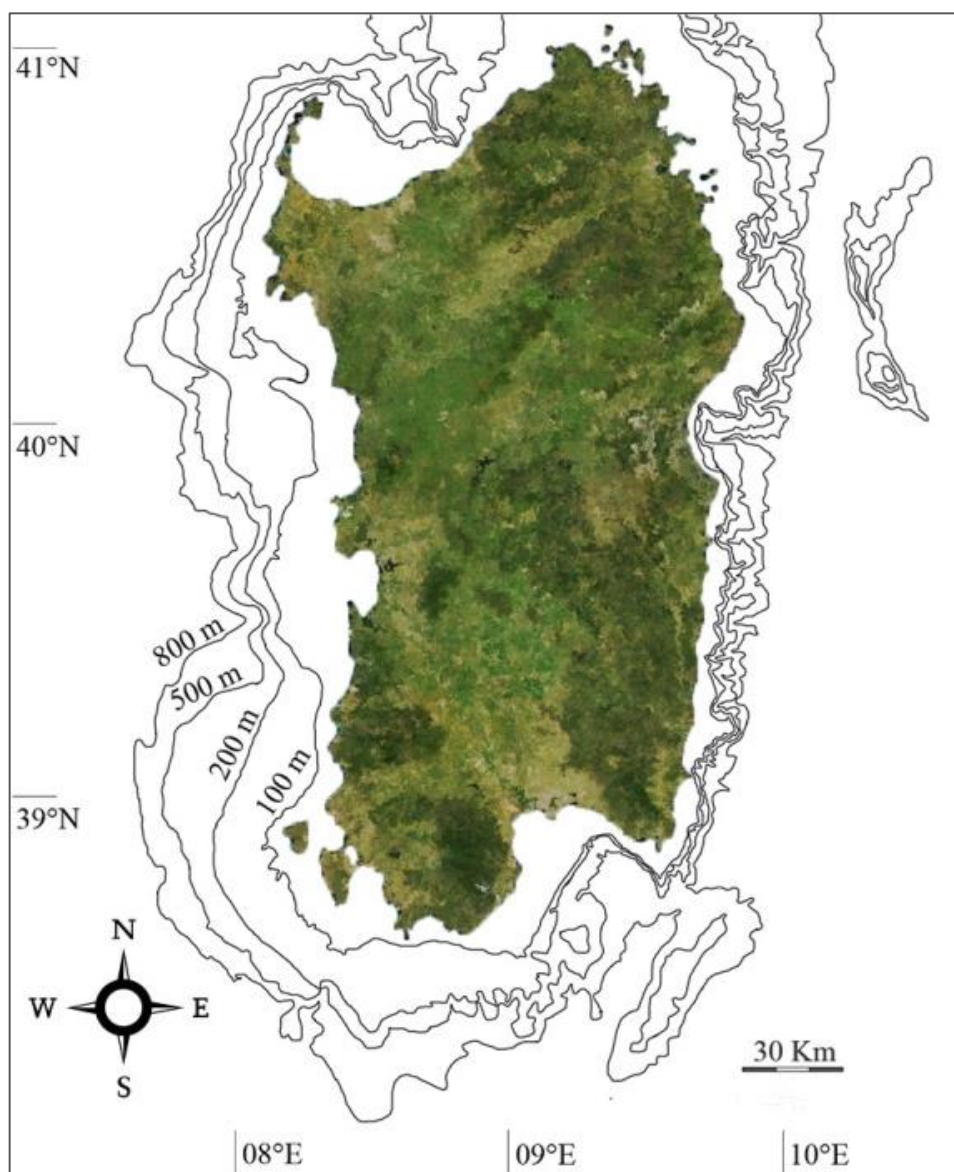


Fig. 2.7 – L'area di studio (GSA 11).

Su un totale di circa 27000 km<sup>2</sup> di area studiata, circa 23.700 (con batimetria compresa tra gli 0 e gli 800 m) sono infatti potenzialmente strascicabili, e sono distribuiti lungo le coste in maniera disomogenea, sia per quanto riguarda la posizione, che per la loro ampiezza.

Le differenze maggiori si riscontrano in particolare tra i fondali a sud-ovest e ad ovest dell'isola, rispetto a quelli adiacenti alla costa orientale. I primi sono caratterizzati infatti da una piattaforma continentale piuttosto ampia che presenta un declino progressivo che termina ad una profondità di circa 150-200 m e da una graduale scarpata continentale. Dal punto di vista sedimentologico, la piattaforma in quest'area è caratterizzata soprattutto da sabbia grossolana, mentre nella scarpata sono molto rappresentati i fondali costituiti da melme.

Al contrario, i fondali della costa est e sud-est presentano una piattaforma continentale più ristretta e a tratti quasi inesistente, che termina ad una profondità di circa 50-100 m, ed una scarpata continentale molto ripida (Sabatini, 2013). La piattaforma orientale presenta invece una costituzione prevalentemente ghiaiosa, ed è molto frequente il precoralligeno.

Infine, un complesso sistema di 29 canyons sottomarini incide nella piattaforma continentale che circonda l'isola (Würtz, 2012). Altre due strutture geomorfologiche caratterizzano tuttavia i fondali dell'area: due promontori sottomarini. Il primo, Baronie, situato a nord-est dell'isola; il secondo, denominato Ichnusa, si trova invece a sud-est.

## 2.5 Le campagne sperimentali di pesca a strascico

I campioni utilizzati in questo lavoro provengono interamente da campagne sperimentali di pesca a strascico condotte annualmente nei mari circostanti la Sardegna dal Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente (DiSVA).

La maggior parte delle analisi svolte in questa tesi (accrescimento con metodica diretta, analisi morfometriche, parassitologia) sono state condotte su campioni prelevati in occasione delle campagne MED.I.T.S. degli anni 2012, 2013 e 2014. Per quanto riguarda invece lo studio dell'accrescimento tramite metodica indiretta, sono state utilizzate le serie storiche di dati di entrambe le campagne MED.I.T.S. e GRU.N.D (Gruppo Nazionale Demersali) a partire dall'anno 1994.

### 2.5.1 La campagna MEDITS

Il progetto MED.I.T.S. nacque nel 1993 ed è finanziato dall'Unione Europea. L'obiettivo del programma di ricerca è quello di ottenere delle informazioni basilari su diverse specie bentoniche e demersali in termini di distribuzione delle popolazioni ma anche di struttura demografica, analizzando le aree della piattaforma continentale e la parte più superficiale della scarpata nel bacino del Mar Mediterraneo (Bertrand *et al.*, 2002). La prima campagna venne svolta nel 1994 e fu condotta dai primi 4 paesi partner del progetto (Spagna, Francia, Italia e Grecia). Successivamente entrarono a far parte del progetto anche i paesi balcanici che si affacciano sull'Adriatico (Albania, Croazia, Slovenia e Montenegro) ed altri come Marocco, Malta e Cipro.

Una delle sfide maggiori per i paesi membri fu l'adozione di una metodologia comune e standardizzata di campionamento: il protocollo sperimentale scelto prevede l'utilizzo dello stesso attrezzo di campionamento, la raccolta delle stesse informazioni ed ovviamente una gestione ed elaborazione comune dei dati.

La pesca a strascico utilizza le cosiddette reti da traino, queste sono reti attive, vengono cioè portate incontro al pesce che viene catturato per il loro progressivo avanzamento. Esistono tuttavia molti modelli di reti da traino, che differiscono non solo tra

le varie nazioni ma anche da regione a regione, in funzione delle specie che si vogliono catturare e delle caratteristiche dei mari in cui si opera.

Per ottenere la standardizzazione richiesta dal progetto è stato scelto quindi un unico attrezzo di campionamento, che fosse comune a tutti gli stati membri e potesse essere utilizzato in tutte le serie di campagne di pesca. L'attrezzo scelto è una rete a strascico da fondale progettata per la pesca sperimentale a scopo scientifico (GOC 73, MEDITS Handbook, 2013). Essa rappresenta un compromesso tra la varietà di reti utilizzate nelle diverse aree del Mediterraneo, in particolare le caratteristiche di questo attrezzo lo rendono utilizzabile in tutti i range di profondità e nelle varie condizioni incontrate nell'intera area di ricerca.

All'inizio del progetto fu stabilita inoltre una lista di specie bersaglio, che include teleostei (tra i quali *M. merluccius*), molluschi e crostacei selezionati in base al loro valore commerciale, alla loro accessibilità all'attrezzo ed infine per il loro potenziale interesse come indicatori biologici nelle diverse aree.

La campagna si svolge generalmente nel periodo tardo primaverile/estivo ed ogni imbarcazione è impegnata per circa un mese. La durata delle cale, per protocollo, è pari a 30 minuti per le profondità inferiori ai 200 m ed 1 ora per maggiori profondità (Bertrand *et al.*, 2002).

All'interno di ciascuna GSA vengono identificate diverse sotto-aree, nel caso della GSA 11 l'area di studio è stata suddivisa in 7 zone (Fig. 2.6). Le stazioni di campionamento all'interno di queste aree sono state distribuite applicando uno schema di campionamento di tipo random stratificato. Il parametro di stratificazione adottato è la profondità, selezionando i seguenti limiti batimetrici: 10, 50, 100, 200, 500 e 800 m (Bertrand *et al.*, 2002). Questo metodo permise di trovare il giusto compromesso tra le necessità di applicazione di un campionamento casuale e quella di assicurare un numero di campionamenti proporzionale alle dimensioni dello strato.

Per i campionamenti sono stati utilizzati pescherecci delle marinerie locali, in particolare il "Nuovo Splendore" e il "Gisella".

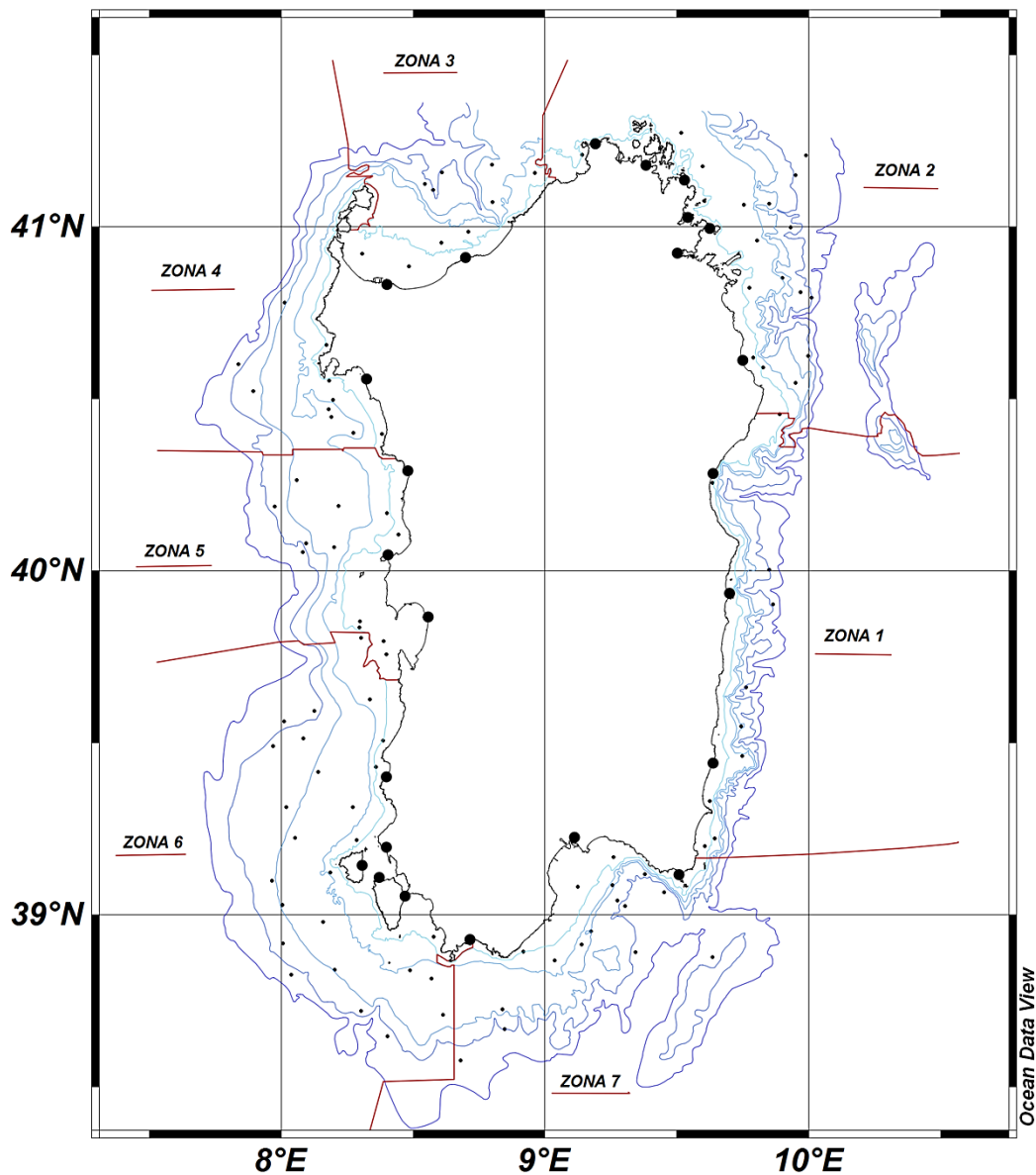


Fig. 2.8 – Suddivisione in zone della GSA11 (limiti geografici in rosso) e localizzazione delle cale nell'anno 2013 (Cau *et al.*, 2014a).

A partire dall'anno 2012 è stato infine inserito nel protocollo, oltre alle classiche variabili della taglia, del genere e dello stadio di maturità sessuale, anche il rilevamento dell'età per 3 specie di teleostei bersaglio: il nasello e le due triglie *Mullus barbatus* e *Mullus surmuletus*. Anche in questo caso, la selezione dei campioni per l'analisi dell'età segue un protocollo comune: il campionamento è stratificato per lunghezza, ed un numero fisso di individui vengono selezionati in maniera casuale da ciascuna classe di lunghezza e per ciascun sesso (MEDITS Handbook, 2013).

### 2.5.2 La campagna GRUND

La campagna GRU.N.D. è una campagna sperimentale svolta a livello nazionale a partire dall'anno 1985, con lo scopo di approfondire le conoscenze sullo stato di diverse specie demersali, per giungere ad una gestione razionale di queste risorse ed evitare il loro sovrasfruttamento. Questo programma, terminato nel 2008, è stato sostenuto dalla Direzione Generale della Pesca e dell'Acquacoltura del MiPAF ed è stato svolto unicamente nelle acque italiane. Il disegno di campionamento utilizzato in queste campagne viene definito "stratificato casuale con allocazione delle cale proporzionale all'estensione dei singoli strati dell'area indagata", ad eccezione del triennio 1990-1993 nel quale è stato eseguito un campionamento a transetti.

A differenza della MED.I.T.S. tuttavia, le cale, svolte in periodo autunnale, hanno tutte una durata pari ad 1 ora, indipendentemente dalla profondità e non è stato selezionato un attrezzo standard bensì venivano adottati gli attrezzi in uso alle marinerie locali. Le informazioni relative a ciascun attrezzo utilizzato sono state rese note in modo da permettere un confronto corretto dei risultati ottenuti da ciascuna unità operativa.

# 3. Analisi preliminari

---

## 3.1 Introduzione

Le analisi presentate in questo capitolo consistono in un'indagine esplorativa effettuata sulla struttura di taglia della specie *M. merluccius* nell'area di studio, per ottenere alcune informazioni preliminari prima di proseguire applicando metodiche più complesse.

La distribuzione taglia/frequenza di una specie rappresenta infatti uno dei parametri descrittivi basilari della dinamica di una popolazione. Diverse informazioni possono essere tratte da questo parametro, ad esempio per quanto riguarda il ritmo con cui le diverse generazioni di individui si susseguono le une alle altre (*cf.* cap. 4). Attraverso l'osservazione della composizione in lunghezza di una popolazione è per esempio possibile identificare se vi siano particolari aree, o particolari momenti nei quali viene riscontrata un'abbondanza inusuale di individui giovanili (Gulland e Rosenberg, 1992).

Conoscere le informazioni relative alla struttura di taglia di una popolazione ittica è importante poiché la taglia è un fattore fondamentale per la definizione della crescita, della riproduzione e del reclutamento di una popolazione, e modifiche in questo parametro possono essere un primo indizio della presenza di un disturbo (Langlois *et al.*, 2011).

Inoltre, i dati necessari per lo svolgimento di queste analisi possono venire acquisiti molto rapidamente, senza la necessità di effettuare campionamenti particolarmente dispendiosi. Le informazioni relative alla lunghezza degli individui possono comunque essere comunemente raccolte nell'ambito di ciascuna campagna sperimentale o monitoraggio della pesca. Per questo motivo è possibile ottenere facilmente una grande mole di dati, relativa anche a lunghi periodi di tempo e a diverse aree (Gulland e Rosenberg, 1992).

Nell'ambito di questo studio è stato scelto di verificare in particolare se esistessero differenze significative nella struttura di taglia di questa specie tra i due versanti della Sardegna (costa occidentale e costa orientale), che possano rappresentare un primo indizio di una separazione tra le popolazioni di questa specie, utilizzando i dati raccolti nell'ambito della campagna sperimentale di pesca MED.I.T.S..



I risultati ottenuti sono stati presentati in occasione del 44° congresso della Società Italiana di Biologia Marina (SIBM) (Vittori *et al.*, 2013).

## 3.2 Materiali e metodi

I dati utilizzati in questa analisi provengono dalle campagne sperimentali di pesca a strascico MED.I.T.S., effettuate nel periodo primaverile-estivo nei mari circostanti la Sardegna (GSA 11), in un periodo che va dal 2004 all'anno 2011. Per ciascun individuo campionato, come da protocollo, sono state rilevate la lunghezza totale (LT) in cm, il peso totale (PT) in grammi, il sesso e lo stadio di maturità gonadica. Dal pool di dati complessivo, sono stati in seguito selezionati quelli dei campioni provenienti dalla costa orientale (corrispondente alle Zone 1 e 2 della GSA) e dalla costa occidentale (Zone 4, 5 e 6).

Utilizzando i dati di lunghezza prelevati, sono state calcolate le distribuzioni taglia-frequenza (*length-frequency distribution*, LFD) percentuali, considerando classi di taglia di 1 cm. Queste sono state elaborate per area geografica (costa est e costa ovest) e per ciascun anno di campagna considerato. In seguito, per entrambe le coste, è stata calcolata la LFD complessiva per il totale di anni utilizzati.

Successivamente, le LFD percentuali per area e anno sono state usate per un'analisi dei cluster, per evidenziare eventuali differenze tra le strutture di taglia della costa occidentale ed orientale. È stata scelta la distanza Euclidea come unità di misura per la differenziazione tra i campioni e questi sono stati classificati utilizzando una analisi di tipo “*hierarchical agglomerative*” attraverso il metodo “*complete linkage*”. Infine, per ottenere una valutazione statistica sulle eventuali differenze riscontrate attraverso le analisi precedenti, è stato applicato un test ANOSIM (*Analysis of Similarity*). Entrambe queste analisi sono state svolte grazie al software Primer v.6.1.6 (Clarke e Gorley, 2006).

### 3.3 Risultati

Complessivamente, sono stati utilizzati i dati di un totale di 13158 individui (dei quali 2037 provenienti dalla costa est e 11121 da quella occidentale).

Per quanto riguarda la costa orientale (Fig. 3.1), i dati di lunghezza raccolti hanno variato da un minimo di 5 cm ad un massimo di 64 cm LT. La distribuzione polimodale mostra la presenza di due coorti principali, la prima in corrispondenza della classe modale di 10 cm (LT), e la seconda, che raggruppa un numero maggiore di individui, a 21 cm LT.

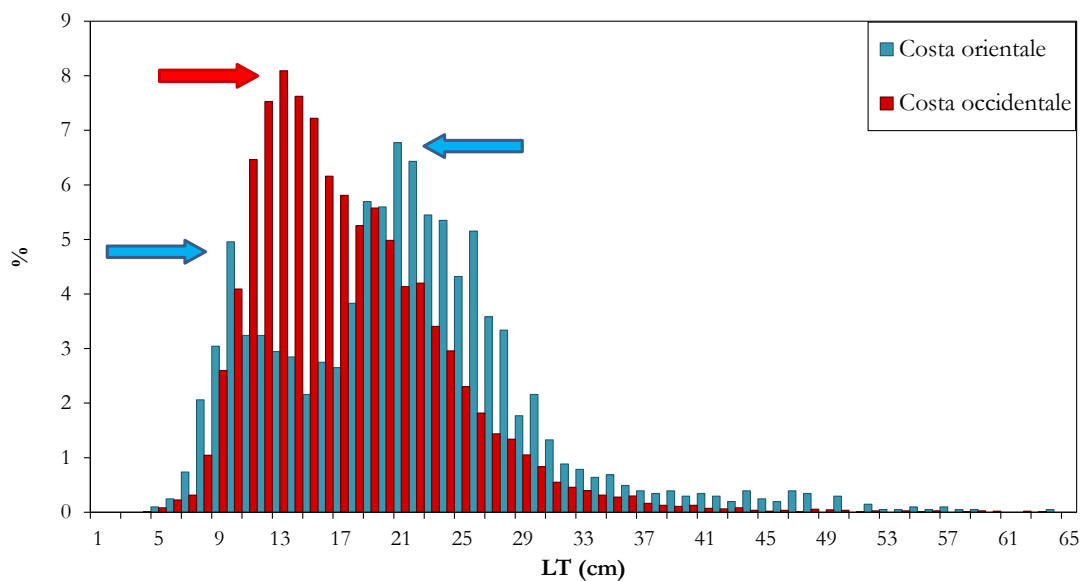


Fig. 3.1 - Distribuzioni taglia-frequenza (%) totali di *M. merluccius* nelle coste occidentale ed orientale della Sardegna. Le frecce indicano le classi modali delle distribuzioni della costa occidentale (*in rosso*) ed orientale (*in blu*).

Per quanto riguarda la costa occidentale (che presenta un range di LT che varia tra 4 e 60 cm) al contrario, si evince una distribuzione polimodale caratterizzata da una moda principale in corrispondenza dei 13 cm LT, mentre le successive coorti sono difficilmente distinguibili. Relativamente a quella della costa orientale dunque, la struttura di taglia della costa occidentale risulta in generale spostata verso sinistra, indicando la predominanza degli individui di piccola taglia.

L'analisi dei cluster, effettuata sulle LFD di ciascun anno per le due coste, ha evidenziato la presenza di due gruppi principali (Fig. 3.2). Nel primo, il più ampio, sono

stati raggruppati tutti i campioni provenienti dalla costa occidentale, insieme alle LFD della costa orientale corrispondenti agli anni 2004 e 2009.

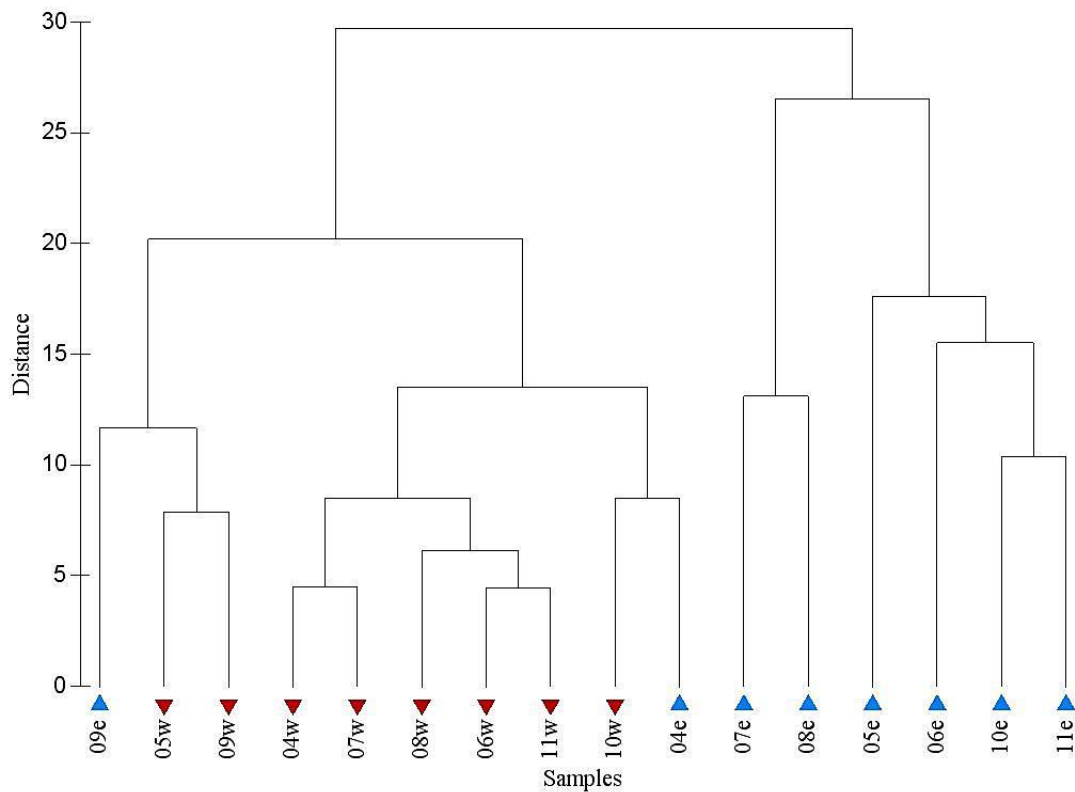


Fig. 3.2 – Risultato dell'analisi dei cluster per le LFD di *M. merluccius*  
(▲, costa occidentale; ▼, costa orientale).

Il secondo gruppo identificato comprende invece tutti i restanti campioni della costa orientale, i quali risultano tuttavia più variabili rispetto a quelli della costa ovest, come evidenziato dall'ampiezza della distanza visibile in Fig. 3.2.

Il test di ANOSIM, applicato agli stessi dati utilizzati per il cluster, ha confermato la presenza di una differenza significativa nelle LFD provenienti dalle due aree ( $P\text{-value} < 0,01$ ).

## 3.4 Discussione

L'analisi preliminare descritta in questo capitolo ha evidenziato la presenza di una certa differenziazione nelle strutture di taglia della popolazione di nasello tra la costa orientale e quella occidentale dell'isola. In particolare, in quest'ultima, pare vi sia una grande abbondanza di individui di piccola taglia, al contrario della costa orientale.

Nelle aree ad est della Sardegna, infatti, nonostante sia individuabile una coorte corrispondente ad individui molto piccoli, vi è una predominanza di individui di taglie maggiori. La coorte principale in questo caso viene rappresentata infatti dalla classe modale di 21 cm, la quale, secondo le stime esposte in seguito (*cf.* cap. 4.3) corrisponderebbe agli individui di circa 1 anno di età.

La differenza nella distribuzione delle taglie nelle due coste è stata convalidata anche attraverso due analisi statistiche. Il cluster ha fornito infatti una analisi descrittiva che ha dimostrato come, ad eccezione dei campioni orientali degli anni 2004 e 2009, le LFD vengano effettivamente raggruppate in base alla loro similarità proprio secondo il fattore "costa". Una conferma statistica è stata in seguito ottenuta attraverso il test ANOSIM.

Questa analisi ha quindi evidenziato la presenza di una certa complessità nella popolazione di *M. merluccius* nell'area analizzata. Considerato che le distribuzioni di frequenza possono riflettere il tipo di accrescimento degli individui, il reclutamento ed i tassi di mortalità di una popolazione (Tully e Hillis, 1995), è possibile che i due gruppi evidenziati appartengano a stock differenti, e di conseguenza rispondano in una maniera differente allo sfruttamento antropico. Queste informazioni preliminari hanno dunque costituito un primo passo verso una più approfondita conoscenza della struttura di popolazione della specie analizzata, e sono state in seguito integrate dalle analisi più approfondite esposte nei capitoli seguenti.

# 4. L'accrescimento

---

## 4.1 Introduzione

Con il termine accrescimento viene indicata la variazione nel tempo delle dimensioni corporee di un organismo intese in termini di lunghezza somatica o peso. Tuttavia, mentre l'aumento di lunghezza è generalmente irreversibile, il peso può oscillare in maniera significativa, ed è influenzato dalle riserve dell'organismo e dallo sviluppo delle gonadi.

Nell'ambito della biologia della pesca la stima del tasso di crescita di una popolazione è estremamente importante per diverse applicazioni, ad esempio è necessario per la comprensione del ciclo vitale della specie in esame e della sua dinamica di popolazione (età di reclutamento, età di prima maturità, periodo riproduttivo, migrazioni, mortalità naturale e da pesca). Tuttavia, una delle applicazioni principali delle informazioni sull'accrescimento di una specie è la definizione della sua struttura demografica per l'utilizzo dei modelli di *assessment* strutturati per età, i quali permettono di ottenere stime di abbondanza e mortalità per ciascuna classe di età della popolazione, ovvero il suo stato di sfruttamento (de Pontual *et al.*, 2002).

Il modello più comune per l'analisi dell'accrescimento delle specie ittiche è quello di von Bertalanffy (1938) ed assume che gli individui si accrescano verso una lunghezza (indicata con  $L_{\infty}$ ) massima teorica e che man mano che ci si avvicina a questo valore il tasso di accrescimento rallenti sempre più. La velocità alla quale un organismo si accresce varia infatti a seconda della fase della sua vita. Mentre la porzione giovanile di una popolazione si accresce molto velocemente, quella adulta ha generalmente un tasso di crescita inferiore, poiché la riproduzione sottrae energie alla crescita.

Le numerose metodiche esistenti per ottenere la stima dell'accrescimento di una specie vengono generalmente suddivise in due gruppi principali: quelle dirette, che consistono appunto nell'analisi diretta di un subcampione di individui per i quali verrà stimata un'età; e quelle indirette, che utilizzano generalmente le serie storiche di dati raccolti su una determinata popolazione, estraendo da questi, con metodi statistici, informazioni sull'accrescimento degli individui.

La stima diretta dell'età di un individuo viene fatta generalmente attraverso l'osservazione delle cosiddette "strutture dure", parti del corpo più o meno calcificate, come gli otoliti, le scaglie, i raggi spiniformi delle pinne, le vertebre ed altri. E' stato osservato infatti che queste strutture nei teleostei presentano spesso dei pattern strutturali più o meno periodici che sono spiegabili con variazioni nel tasso di crescita indotto sia da fattori ambientali (biotici o abiotici) che da fattori endogeni come gli eventi ontogenici (de Pontual *et al.*, 2002).

I più utilizzati per lo studio dell'età dei teleostei sono sicuramente gli otoliti (Fig. 4.1a), strutture calcificate situate nell'orecchio interno dei teleostei. La loro forma è caratteristica di ciascuna specie, e generalmente si ritrovano tre coppie di otoliti in ciascun individuo, differenti in base alle dimensioni e alla forma: asterischi, lapilli e sagitte.

Come quasi tutte le strutture calcificate, sono in grado di accrescersi durante tutta la vita del pesce ed è stato generalmente riscontrato che la loro velocità di accrescimento può variare a seconda di fattori ambientali, come la stagione. In molti casi sono infatti visibili all'interno della struttura diverse bande concentriche (detti annuli) che si alternano (Fig. 4.1b): quelle ialine e trasparenti, sono dovute ad un accrescimento lento che normalmente avviene in inverno; e quelle opache, connesse ad un accrescimento più rapido, solitamente legato all'estate.

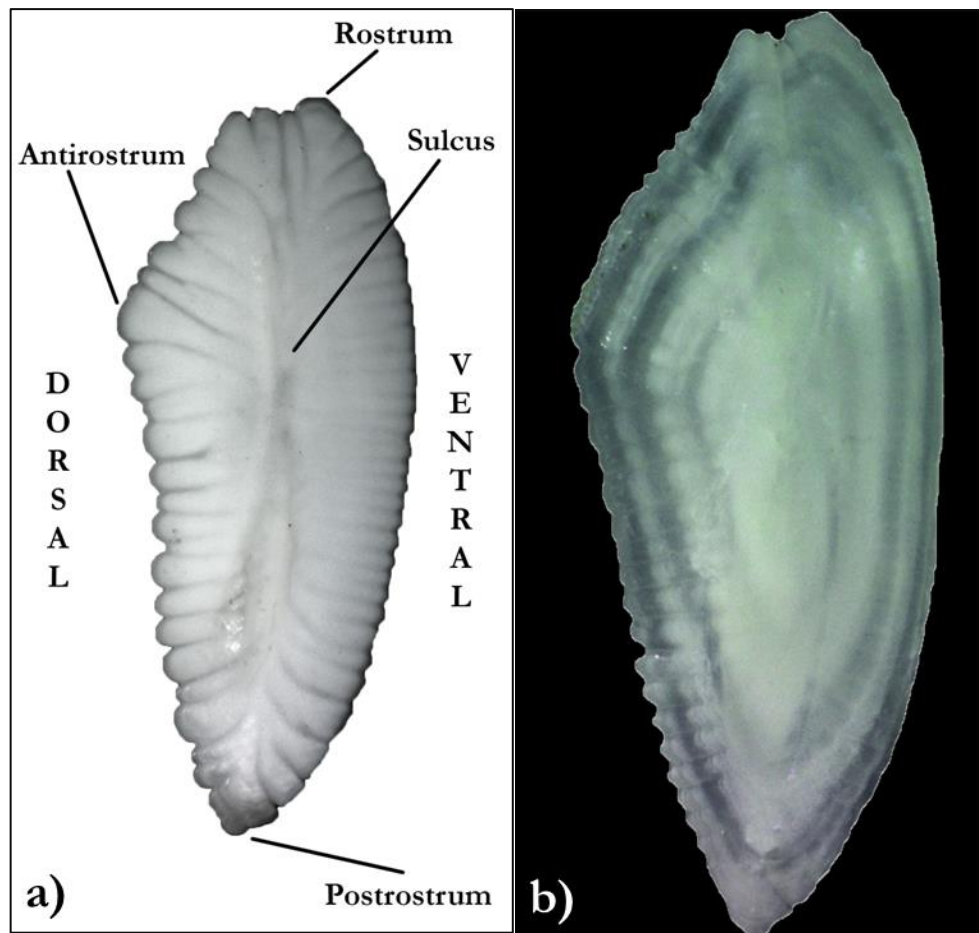


Fig. 4.1 – a) Otolite (saggitta) sinistro di *M. merluccius* e relativa nomenclatura. La faccia visibile è quella prossimale, mentre la faccia distale è quella nascosta; b) faccia prossimale fotografata tramite stereomicroscopio su sfondo scuro per rendere ben evidenti gli *annuli*.

L'attribuzione dell'età ad un organismo avviene dunque attraverso l'osservazione diretta di questo pattern, a cui fa seguito la “conta” degli annuli, considerando un anno per ogni combinazione di una banda opaca e della traslucida successiva.

Analisi come questa rientrano nell'ambito della “sclerocronologia”, una scienza che mira alla ricostruzione della vita passata degli organismi viventi attraverso lo studio delle strutture dure (de Pontual *et al.*, 2002).

A differenza delle tecniche dirette, che si basano sullo studio dei singoli individui, le analisi indirette dell'accrescimento si basano su intere popolazioni. Una metodica che rientra in questa categoria è l'analisi di Bhattacharya (Bhattacharya, 1967), che analizza le distribuzioni taglia-frequenza di una popolazione stimando l'accrescimento a partire dalla progressione nel tempo delle singole coorti (Fig. 4.2).



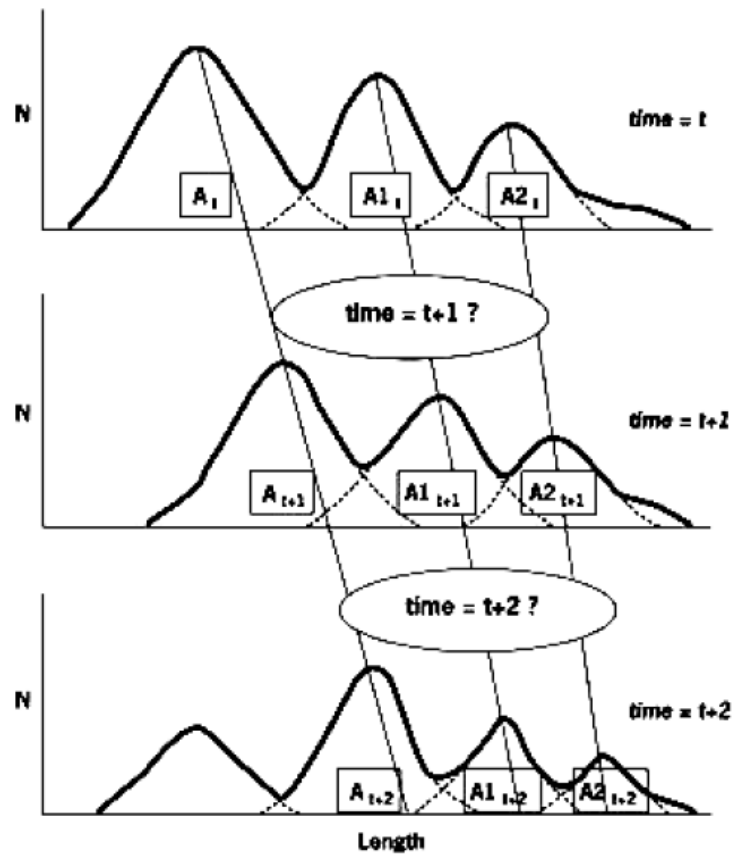


Fig. 4.2 – Ipotetica distribuzione taglia-frequenza che mostra tre differenti gruppi di età in tre anni successivi (da Panfili *et al.*, 2002).

L'analisi indiretta dell'età nel caso del nasello è relativamente più complessa rispetto ad altre specie, infatti il lungo periodo riproduttivo causa spesso una certa sovrapposizione delle coorti negli istogrammi di frequenza (Morales-Nin e Aldebert, 1997; Ligas *et al.*, 2011).

Sebbene le metodiche dirette forniscano una stima dell'età più accurata, il confronto delle stime ottenute tramite la lettura diretta delle strutture calcificate con quelle ottenute tramite metodi statistici fornisce una validazione, seppure indiretta, dell'analisi effettuata.

Nonostante il grande interesse nello studio dell'accrescimento del nasello nell'Atlantico e nel Mediterraneo da parte di diversi esperti, vi è ancora un certo grado di incertezza relativamente al tasso di crescita di questa specie e alla sua longevità (Morales-Nin *et al.*, 1998; Courbin *et al.*, 2007; García-Rodríguez ed Esteban, 2002; Ligas *et al.*, 2011; Pattoura *et al.*, 2014; ed altri).

Così come altri appartenenti all'ordine *Gadiformes*, il nasello presenta infatti un pattern di deposizione delle bande traslucide ed opache non sempre semplice da interpretare. I problemi principali sono dovuti alla presenza di falsi anelli, in particolare nella zona del nucleo, che rendono difficoltosa l'identificazione del primo anello. Altra problematica è legata invece al fatto che anche gli anelli annuali successivi, piuttosto che bande ben definite, possono essere costituiti da un pattern di bande traslucide più sottili e più o meno ravvicinate. Queste, in particolare, sono probabilmente dovute all'ampia stagione riproduttiva di questa specie e dunque al reclutamento quasi continuo durante l'anno (Pattoura *et al.*, 2014).

La complessità dell'interpretazione dell'età del nasello è stata sottolineata ampiamente in letteratura (Morales-Nin *et al.*, 1998; Piñeiro e Saínza, 2003; Mellon-Duval *et al.*, 2010; Pattoura *et al.*, 2014) e diversi workshop internazionali sono stati rivolti allo sviluppo di una metodologia affidabile per l'analisi degli otoliti di questa specie (Piñeiro, 2000; Piñeiro *et al.*, 2000; Piñeiro *et al.*, 2004; ICES, 2010) ed alla promozione di tecniche miranti alla validazione del pattern di deposizione degli anelli di accrescimento nei Gadoidi (ICES, 2013b).

Grazie a questi, è stato possibile stabilire dei criteri, accettati internazionalmente, per l'interpretazione dell'età nel nasello sino alla classe di età 5 e diversi autori negli ultimi anni hanno rivolto il loro interesse alla validazione indiretta per lo meno delle prime classi di età.

Mellon-Duval *et al.* (2010), attraverso il primo utilizzo della tecnica della marcatura e ricattura per la specie *M. merluccius* nel Mediterraneo, ha ottenuto un modello di crescita validato sino alla LT massima di 57 cm per le femmine e 39 cm per i maschi.

Nei mari italiani (Tirreno settentrionale) Ligas *et al.* (2011) ha ottenuto una validazione indiretta attraverso il confronto con le taglie ad età ottenute con retro-calcolo, evidenziando come attraverso l'utilizzo dei criteri adottati sia possibile l'interpretazione di otoliti di individui con LT fino a 50 cm.

Un lavoro simile è stato svolto da Vittori *et al.* (2014) per ottenere una prima validazione dell'attribuzione dell'età nel nasello nei mari sardi. Anche in questo caso, attraverso il confronto con le lunghezze medie ad età ottenute tramite retro-calcolo, è stato possibile corroborare le stime effettuate tramite letture dirette per il range di età tra i 2 ed i 6 anni per le femmine, e tra i 2 e 4 anni nel caso dei maschi.

Un contributo a favore del possibile utilizzo degli otoliti del nasello per la determinazione dell'età è stato fornito da Courbin *et al.* (2007) che ha svolto un'analisi statistica della distribuzione delle diverse macrostrutture delle bande ialine, indicando come due su tre macrostrutture identificate fossero rilevanti a livello di popolazione e rispondessero a variazioni stagionali.

Dunque, l'interpretazione dell'età attraverso l'osservazione degli otoliti del nasello può ancora essere considerata un importante metodo per approfondire le conoscenze sugli aspetti dell'accrescimento di questa specie ancora dibattuti, purché venga basata sui criteri riconosciuti internazionalmente e supportata da metodi di validazione (Ligas *et al.*, 2013).

L'accrescimento rientra tra quei parametri, caratteristici di una specie e di una particolare popolazione, indicati con il termine di *life history*. Molti di questi tratti stanno alla base della struttura degli stock ed hanno un ruolo storico ed ininterrotto nell'identificazione di questi (Begg *et al.* 1999a; McBride, 2013). Inoltre, rappresentano un mezzo efficiente ed economicamente poco dispendioso per l'identificazione di uno stock poiché i dati necessari vengono spesso raccolti di routine per scopi gestionali (Begg *et al.*, 1999a). Infine, i parametri di *life history* sono particolarmente promettenti in questo campo perché possono essere direttamente connessi a processi genetici (Begg *et al.*, 1999a), soprattutto quando sono soggetti a selezione naturale. La selezione che agisce sui tratti di *life history* può infatti indurre rapidi cambiamenti nelle frequenze geniche, anche quando è presente un flusso genico consistente (McBride, 2013).

Tuttavia, spesso è complicato analizzare la relazione che esiste tra la struttura genetica e la diversità fenotipica. Anche quando è presente infatti una variabilità ereditabile nei tratti della *life history* può essere complicato dimostrare la presenza di una strutturazione genetica. Eppure, anche quando ci si riferisce esclusivamente ad eco-fenotipi, questi parametri sono comunque rilevanti per la gestione degli stock in maniera sostenibile. Le condizioni ambientali possono infatti influenzare direttamente i tassi di crescita, la produttività e la stagionalità della riproduzione, quindi, che abbiano un'origine genetica o fenotipica, i tratti della *life history* sono parametri fondamentali di input per i modelli dello *stock assessment* e per la definizione di *reference points* per la gestione sostenibile della pesca (McBride, 2013).

Considerato infatti il chiaro collegamento tra i parametri di *life history* di una specie, la sua fitness ed il tasso di accrescimento della popolazione (Swain *et al.*, 2005), la loro

conoscenza costituisce un primo passo fondamentale nell'identificazione di uno stock, prima che vengano applicate analisi più specifiche (Pawson e Jennings, 1996; Begg *et al.*, 1999b; Begg, 2005; Abaunza *et al.*, 2008b). In particolare, l'accrescimento degli individui di una popolazione è un parametro fondamentale della *life history*, e la sua variabilità, anche quando non connessa alla genetica, può comunque essere importante per la gestione perché può influire direttamente sul rendimento di uno stock sfruttato (Law, 2000).

La soluzione migliore è quella di considerare i parametri della *life history* come parte di un approccio interdisciplinare, che incorpori una varietà di linee indipendenti di analisi per supportare le ipotesi formulate e per costituire delle più robuste inferenze sulla struttura dello stock. Infatti, sebbene questi parametri da soli non risultano sufficienti per caratterizzare la struttura di uno stock, possono essere un utile strumento complementare per fornire un contesto basato sulla storia “naturale” di uno stock, per evidenziare come questo si è costituito, come viene mantenuto e per predire quanto questo sarà stabile in futuro (McBride, 2013).

Nell'ambito di questo studio è stato dunque scelto di analizzare e definire il tipo di accrescimento che caratterizza il nasello nelle diverse aree di studio, ed utilizzare questo parametro come indicatore della eventuale variabilità presente nella *life history* di questa specie.

## 4.2 Materiali e metodi

### 4.2.1 Campionamento ed estrazione degli otoliti

Gli esemplari di *M. merluccius* utilizzati in questa tesi per lo studio tramite metodica diretta dell'accrescimento provengono dalle campagne di pesca a strascico MED.I.T.S. effettuate negli anni 2012, 2013 e 2014. Un subcampione di individui è stato selezionato in ciascuna di queste campagne utilizzando un approccio di campionamento random ma stratificato in base alle classi di lunghezza, in modo che queste potessero essere tutte correttamente rappresentate, così come richiesto anche dal protocollo MED.I.T.S. (Handbook 2013 v.7). La selezione è stata fatta indipendentemente per i due sessi. Nell'ambito di questo studio sono stati analizzati esclusivamente gli esemplari provenienti dalle coste occidentale (Zone 4, 5 e 6 della GSA 11) ed orientale della Sardegna (Zone 1 e 2).

Dagli esemplari selezionati, in seguito al rilevamento dei parametri comuni di lunghezza totale (LT) in cm, peso totale (PT) in grammi ed infine sesso e stadio di maturità gonadica, sono stati prelevati gli otoliti (sagitte) attraverso un taglio frontale trasversale al livello del preopercolo (Fig. 4.3).

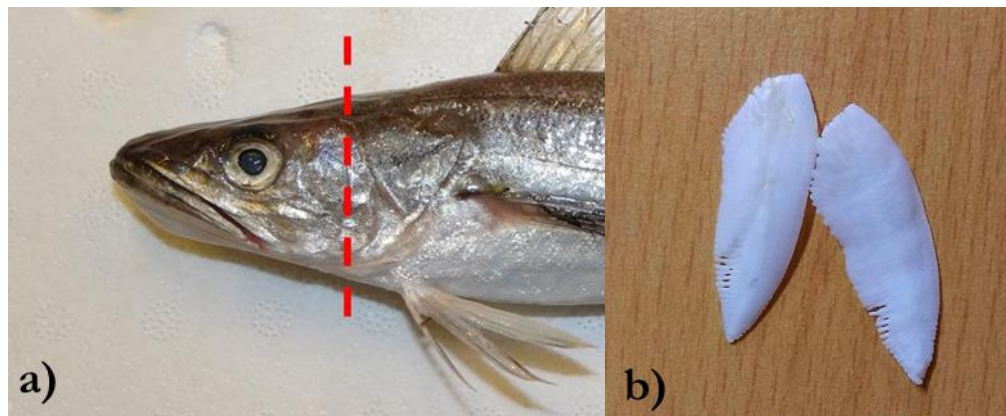


Fig. 4.3 – a) Indicazione dell'area interessata nel taglio trasversale negli esemplari di *M. merluccius* per l'estrazione degli otoliti; b) esempio di sagitte di *M. merluccius* appena estratte.

Gli otoliti, dopo essere stati estratti, sono stati puliti con acqua, in modo da rimuovere eventuali residui di tessuti, sangue ecc., asciugati accuratamente e conservati a secco all'interno di piccoli contenitori plastici sterili di dimensioni adeguate alla lunghezza degli otoliti stessi.

### 4.2.2 Preparazione degli otoliti

Gli otoliti degli individui giovanili ( $LT < 20$  cm) sono generalmente poco spessi e non eccessivamente opachi, sono dunque stati utilizzati per il processo della conta degli annuli “*in toto*”, ossia senza essere sezionati (Oliver *et al.*, 1991; MedSudMed, 2005; Rizzo *et al.*, 2005). La procedura consiste nell'acquisizione dell'immagine digitale degli otoliti attraverso uno stereomicroscopio (Zeiss Stemi 2000-C) con annessa fotocamera (Pixelink PL-A686C). Per l'acquisizione dell'immagine gli otoliti vengono posizionati con la faccia prossimale rivolta verso l'alto, su fondo scuro e vengono immersi in un sottile strato di acqua.

Per quanto riguarda invece gli otoliti dei naselli di dimensioni maggiori di 20 cm ( $LT$ ) è stato necessario effettuare per ciascuno di essi una sezione trasversale passante per il nucleo (Fig. 4.4).

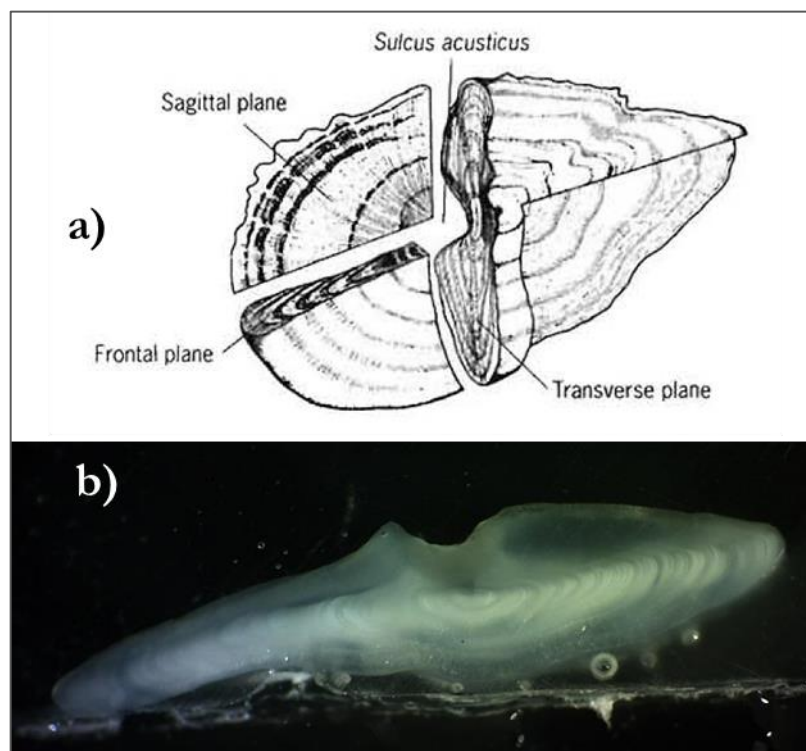


Fig. 4.4 – a) Schema dei diversi piani e possibili sezioni di un otolite; b) sezione trasversale passante per il nucleo di un otolite di *M. merluccius*. L'estremità più larga corrisponde al lato ventrale.

Per ottenere le sezioni gli otoliti vengono innanzi tutto inclusi in resina epossidica bicomponente ad alta trasparenza (Struers Caldo-fix 2) (Fig. 4.5). In seguito vengono fissati su vetrini porta-oggetto e limati attraverso una lappatrice Struers DAP-V che utilizza fogli abrasivi a granulometria progressivamente più fine (120, 320, 800, 1000 grit), fino al raggiungimento di uno spessore di circa 0,5 mm (Fig. 4.6).

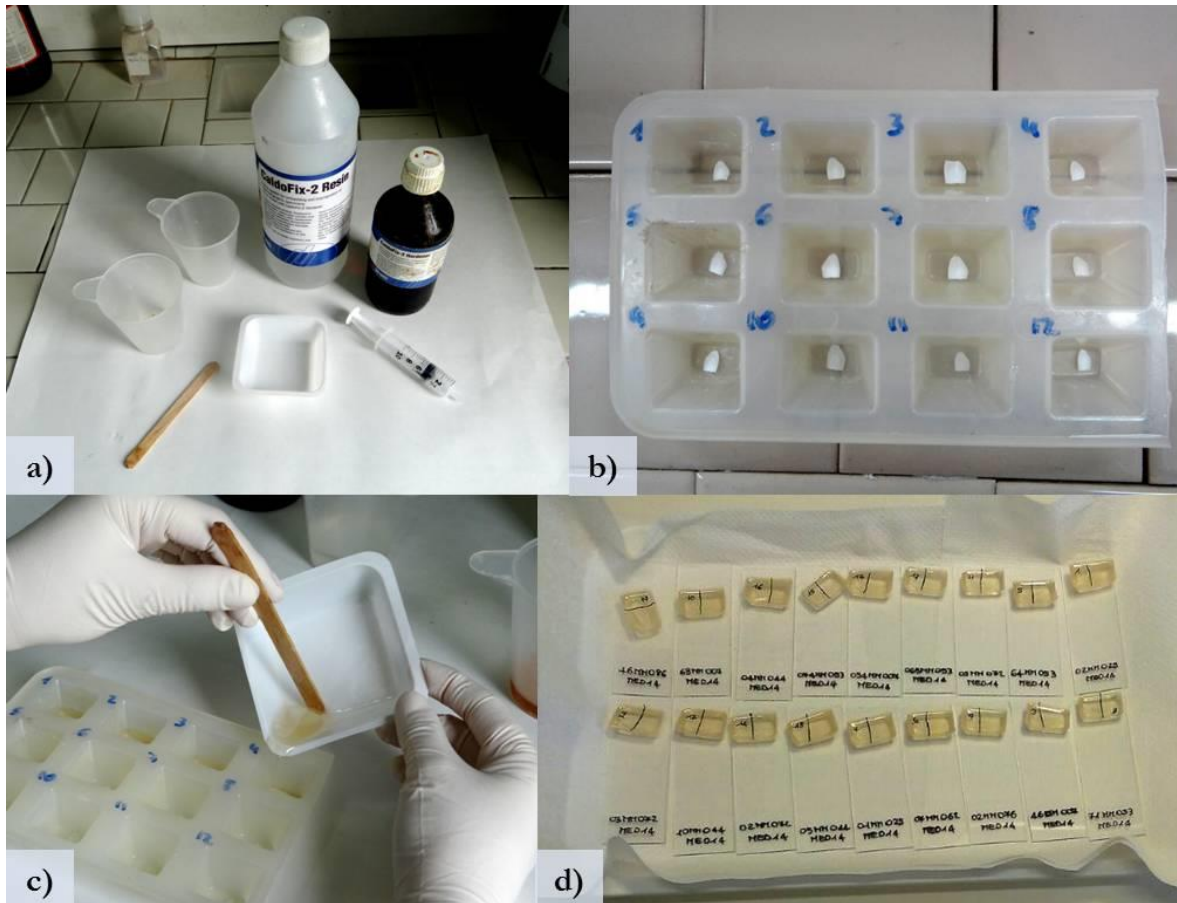


Fig. 4.5 – Diverse fasi dell'inclusione; a) resina epossidica (Struers Caldo-fix2) ed accessori utilizzati per il procedimento; b) la parte centrale di ciascun otolite viene posizionata nelle apposite formelle ed identificata con un numero; c) immersione dell'otolite nella resina e d) identificazione della sezione finale e preparazione del vetrino.

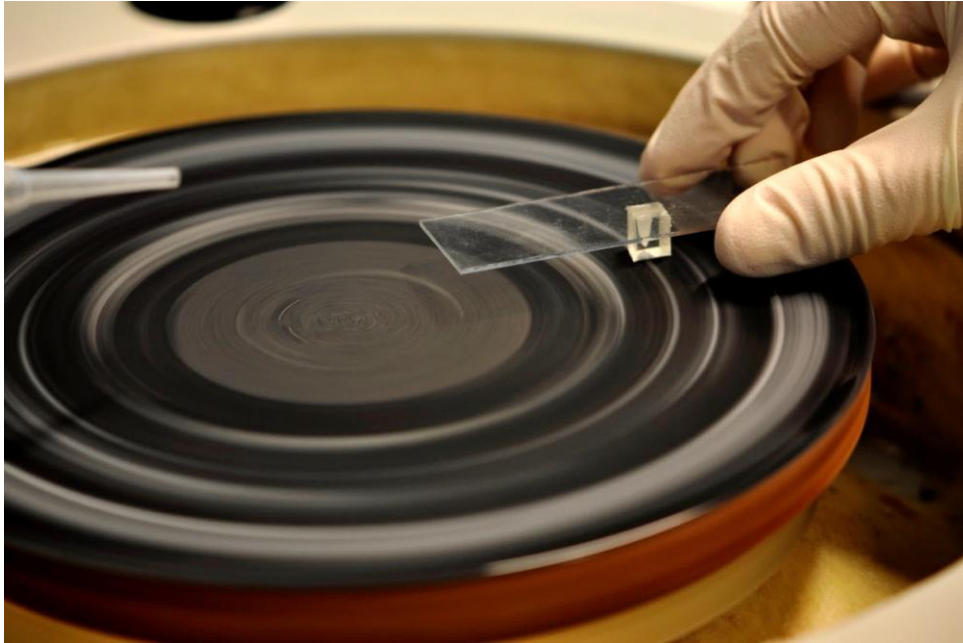


Fig. 4.6 – Esempio del processo di limatura di un otolite di nasello incluso in resina epossidica e fissato su vetrino.

Una volta ottenute le sezioni, queste sono state fotografate seguendo la procedura già citata sopra per gli otoliti *in toto*.

### 4.2.3 Determinazione dell'età

Sia le sezioni che gli otoliti *in toto* sono stati in seguito osservati per la conta degli anelli annuali da due diversi operatori, e la conta è stata ripetuta dopo un determinato periodo di tempo.

Il grado di precisione, accuratezza e riproducibilità delle letture è stato stimato utilizzando l'Index of Average Percent Error (IAPE) (Beamish & Founier, 1981), il Coefficiente di Variazione (CV, %) (Chang, 1982) e la Percentuale di Accordo (PA, %), calcolati secondo le formule seguenti:

$$IAPE = \frac{1}{N} \sum \left( \frac{1}{R} \sum \frac{(|X_{ij} - X_j|)}{X_j} \right) \times 100$$



$$\%CV_j = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^R \frac{(X_{ij} - X_j)^2}{R-1}}}{X_j} \times 100$$

$$PA = \left( \frac{n^\circ \text{ agreed}}{n^\circ \text{ read}} \right) \times 100$$

Dove  $N$  rappresenta il numero di campioni letti;  $R$  corrisponde al numero delle ripetizioni delle letture;  $X_{ij}$  è l' $i$ -esima lettura del  $j$ -esimo individuo;  $X_j$  equivale all'età media calcolata per il  $j$ -esimo individuo.

Pur essendo una misura più robusta dell' IAPE, il CV risulta molto sensibile ai valori di età molto piccoli (ICES, 2010). Infatti, in un individuo con età modale 1 una sovrastima pari ad un solo anno dell'età significherebbe comunque l'attribuzione di un valore doppio di quello reale, mentre per un individuo con un'età molto maggiore, ad esempio 6 anni, un errore di 1 anno avrebbe un'importanza ed un peso inferiore nella stima.

E' stato calcolato inoltre anche il livello di soggettività dei due lettori, per evidenziare qualora esistessero errori sistematici (*bias*) nelle loro letture, utilizzando un apposito workbook di Excel sviluppato da Eltink (2000). Infine, solo i campioni le cui letture hanno concordato nel 75% dei casi (3 letture concordi su 4) sono state mantenuti per la stima dell'accrescimento.

#### 4.2.4 Stima dei parametri di crescita e confronto tra le aree

I dati di lunghezza/età così ottenuti sono stati analizzati per evidenziare eventuali differenze nelle lunghezze medie per classe di età tra i due sessi. Una volta determinata la normalità dei dati è stato quindi applicato un test ANOVA tra le lunghezze medie ad età dei due sessi, utilizzando il software STATGRAPHICS Centurion XVI (Vers. 16.1.11). Sono state quindi escluse da questo confronto le classi di età estreme, poiché non erano sufficientemente rappresentate. Il risultato complessivo è stato valutato attraverso la percentuale cumulativa di differenze significative, dividendo il numero dei gruppi di età nei

quali sono state evidenziate differenze statisticamente significative tra le aree ed il numero totale di classi di età esaminate (Abaunza *et al.*, 2008b; Sequeira *et al.*, 2012).

I dati di lunghezza ad età sono quindi stati suddivisi in base alle aree di provenienza dei campioni e si è proceduto all'elaborazione per la stima dell'accrescimento attraverso il software FISAT II – FAO ICLARM Stock Assessment Tools (Gayanilo, *et al.*, 2005). Il modello applicato per la descrizione della crescita della specie studiata è quello di von Bertalanffy (1938), secondo la seguente formula:

$$LT = L_{\infty}(1 - e^{-k(t-t_0)})$$

In cui **LT** corrisponde alla lunghezza totale dell'animale al tempo  $t$  (all'età  $t$ );  $L_{\infty}$  è la lunghezza massima teorica asintotica;  $k$  è detto coefficiente di crescita e rappresenta la pendenza della curva e la velocità a cui la lunghezza massima viene raggiunta; infine  $t_0$  è l'intersezione della curva con l'asse delle  $x$  e rappresenta l'età teorica alla lunghezza zero. Poiché alla nascita un individuo ha una lunghezza maggiore di zero, tale parametro risulta generalmente negativo.

Le curve e i parametri di accrescimento sono stati calcolati per ciascuna area di studio sia considerando i sessi separatamente, che per l'intero campione di individui per area.

Successivamente, si è proceduto al confronto delle lunghezze medie ad età ottenute per le coste occidentale ed orientale, secondo la procedura descritta precedentemente. I confronti sono stati ripetuti per ciascun sesso e per il totale degli individui in ciascuna area, e poiché in alcuni casi i dati sono risultati caratterizzati da eteroschedasticità (i gruppi mostrano diverse deviazioni standard), piuttosto che il classico test ANOVA è stato applicata la variante Welch's ANOVA, che non richiede la omoschedasticità dei dati, attraverso un apposito workbook in Excel sviluppato da McDonald (2014).

### 4.2.5 Stima dell'accrescimento attraverso il metodo indiretto

Successivamente all'analisi diretta dell'accrescimento, è stata ottenuta una stima di questo anche attraverso una metodica indiretta. Per questa analisi, sono stati utilizzati i dati relativi alle campagne sperimentali di pesca a strascico estive (MED.I.T.S) ed autunnali (GRU.N.D.), svolte rispettivamente tra il 1994 e il 2013 e tra il 1994 e il 2005.

Per ciascuno di questi campionamenti è stata calcolata la distribuzione di frequenza degli individui considerando classi di taglia pari ad 1 cm, e questi dati sono stati elaborati, secondo il metodo di Bhattacharya (Bhattacharya, 1967), tramite il software FISAT II per scomporre le distribuzioni di frequenza in distribuzioni normali distinte, assumendo che ogni moda della distribuzione identificata rappresenti una coorte (Fig. 4.7).

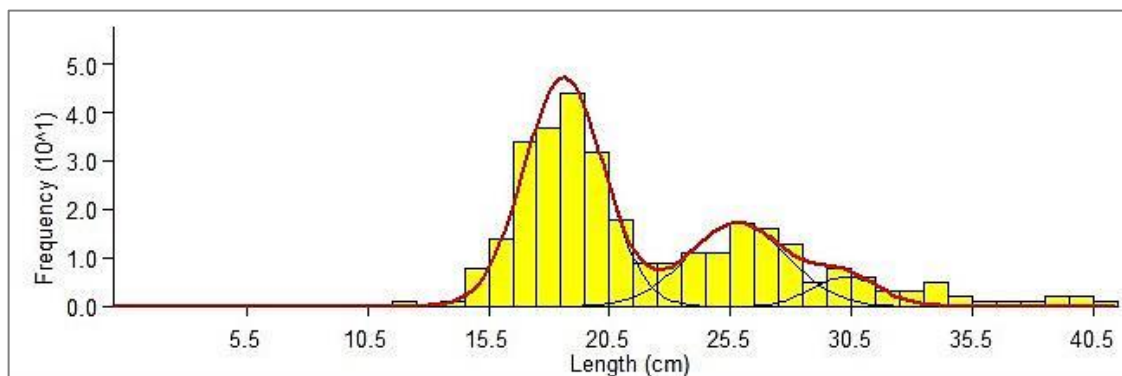


Fig. 4.7 – Esempio di scomposizione modale applicato alla distribuzione taglia-frequenza della specie *M. merluccius* attraverso il software FISAT II.

I risultati ottenuti con questa analisi comprendono un valore di LT media più la deviazione standard rilevata per ogni coorte in ciascun campionamento e sono stati utilizzati per il passaggio successivo, chiamato “*Linking of Means*” ed implementato anch'esso nel pacchetto FISAT II. Questo procedimento permette di identificare la progressione temporale di ciascuna coorte all'interno dei vari campionamenti analizzati, e di stimare quindi i dati di età-lunghezza per la specie. Questi, secondo lo stesso procedimento utilizzato nel caso della metodica diretta, vengono utilizzati per il calcolo dei parametri di accrescimento e della relativa curva di von Bertalanffy.

### 4.2.6 Confronto tra le metodiche

Per ottenere una valutazione dell'attendibilità delle stime ottenute con le due diverse metodiche è stato effettuato un confronto tra i dati di lunghezza-età ottenuti nei due casi, considerando il campione totale degli individui. I test utilizzati nelle diverse classi di età sono l'analisi della varianza ANOVA, il test di Kruskal-Wallis per i campioni con distribuzione non normale (entrambi implementati nel software STATGRAPHICS Centurion XVI (Vers. 16.1.11) ed infine il test Welch's ANOVA per i campioni caratterizzati da eteroschedasticità (Excel workbook sviluppato da McDonald, 2014).

Anche in questo caso è stata considerata la percentuale cumulativa di differenze significative, descritta sopra, per ottenere un risultato complessivo.

## 4.3 Risultati

### 4.3.1 Metodica diretta

Per l'analisi dell'accrescimento tramite metodica diretta sono stati analizzati un totale di 304 otoliti, dei quali 130 provenienti dalla costa est e 174 da quella ad ovest della Sardegna. Per quanto riguarda il campione orientale, questo è suddiviso in 65 femmine e 65 maschi, con un range di lunghezza variabile da 13,6 a 58,7 cm LT per le femmine, e tra 8,8 e 42,1 cm LT per i maschi. L'età massima attribuita ai campioni di quest'area è pari a 6 anni per entrambi i sessi.

Nella costa occidentale sono stati invece analizzati gli otoliti di 84 femmine, con un range di LT compreso tra 11,2 e 64,2 cm, e 90 maschi, con LT compresa tra 8,5 e 36,4 cm. In questo caso invece l'età massima stimata per i maschi è pari a 4 anni, mentre per le femmine è 7 anni.

Le classi di lunghezza al di sopra dei 40 cm sono meno rappresentate nei campioni di entrambe le coste e questo è dovuto soprattutto al fatto che gli individui di grandi dimensioni vengono difficilmente catturati attraverso la pesca a strascico

### 4.3.2 Stima della precisione e dell'accuratezza delle letture

Una volta ottenute entrambe le letture di ciascun operatore, è stata analizzato il grado di precisione. Un totale di 15 otoliti (il 4,9% del totale), provenienti sia da individui maschi che femmine, sono stati esclusi dalle analisi successive perché le stime degli operatori sono risultate discordi (meno di 3 letture su 4 concordi).

L'accuratezza dell'operazione di attribuzione dell'età è stata valutata attraverso vari parametri, come l'Index of Average Percent Error (IAPE), risultato pari a 8,8%; il Coefficiente di Variazione (CV), pari al 11,3% ed infine la Percentage of Agreement tra le letture, risultata essere il 90,8%.

Nella figura sotto riportata (Fig. 4.8) sono illustrati gli andamenti di questi parametri in relazione all'età modale. Questi possono infatti variare a seconda dell'età considerata, ed aiutano ad identificare le classi di età più problematiche. Per quanto riguarda il CV (%) il grafico mostra come questo sia più elevato per le prime classi di età (andamento tipico per

questo parametro), e raggiunga il suo valore minimo nella classe di età modale 4. Questo non avviene per la Percentuale di Agreement, possiamo notare infatti come la PA (%) tra le letture sia piuttosto alta per la classe di età 0, decrementi leggermente nelle successive, raggiunga il massimo in corrispondenza della classe di età 4 (la più precisa, nel complesso), e diminuisca discretamente per le ultime classi, nelle quali una grande variabilità è dovuta al piccolo numero di campioni e al fatto che gli anelli relativi alle età maggiori risultano generalmente meno chiari ed evidenti.

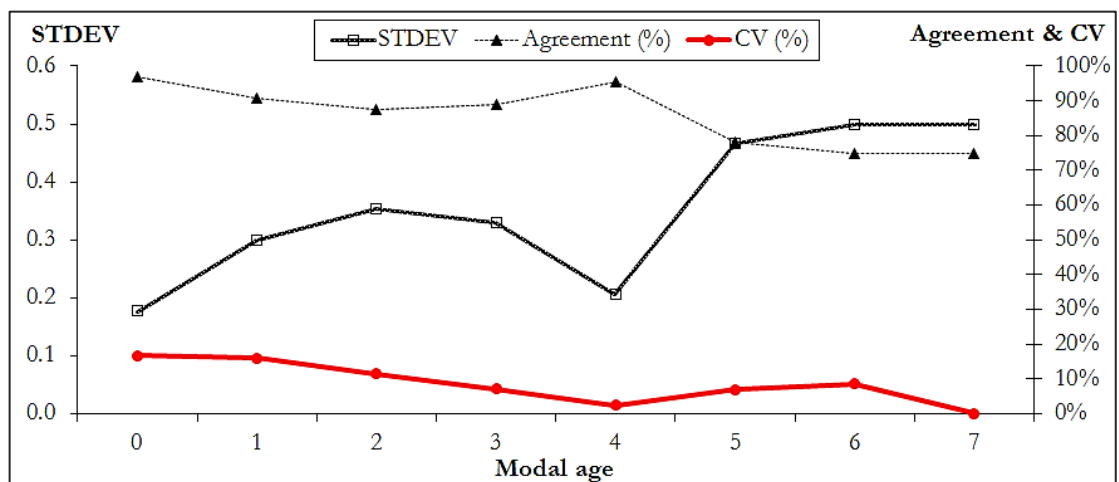


Fig. 4.8 – Deviazione standard (STDEV), Percentuale di accordo (PA %) e Coefficiente di variazione (CV %) in relazione all'età modale.

Tra i due lettori non è stato evidenziato alcun errore sistematico (*bias*), non è stata dunque rilevata nessuna sovrastima o sottostima sistematica dell'età ( $z = -0.561$ ).

In Fig. 4.9 sono riportati invece gli *age-bias plots* relativi a ciascuna replica di entrambi i lettori, e nei quali è riportata l'età media rilevata  $\pm$  la deviazione standard contro l'età modale.

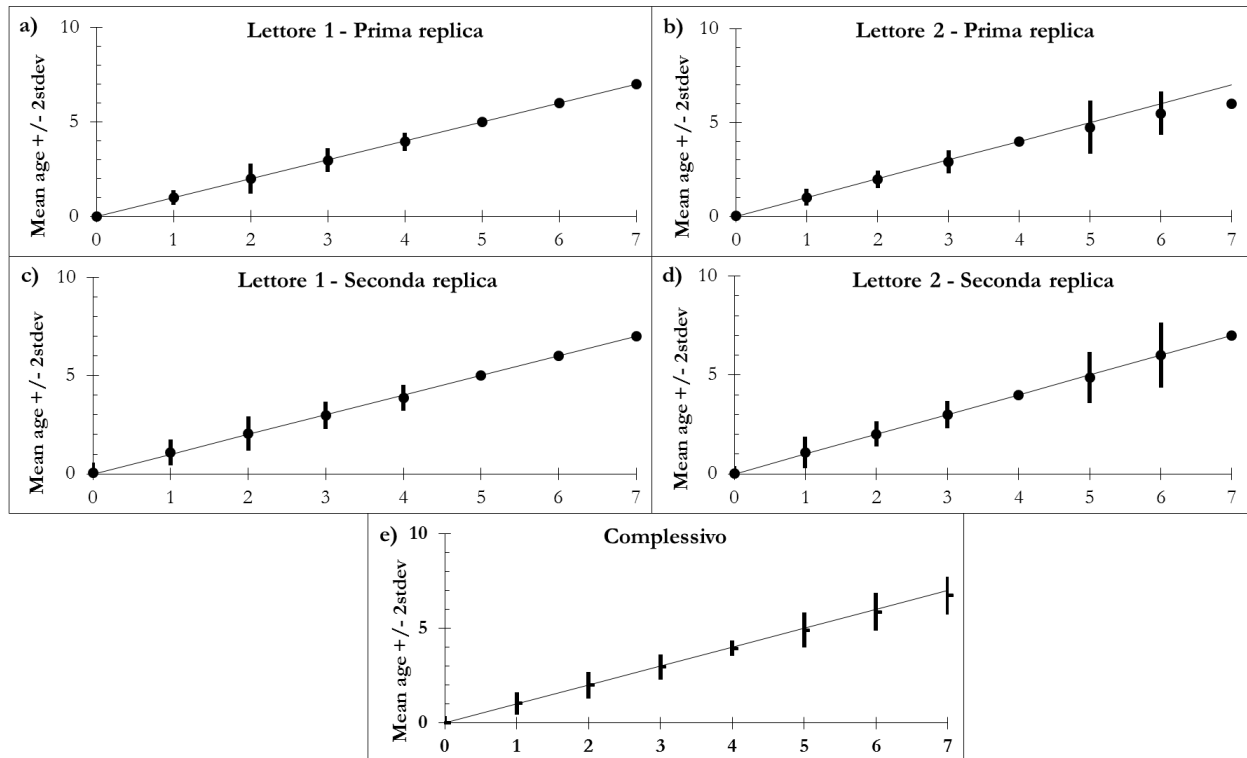


Fig. 4.9 – Age-bias plots per ciascuna replica effettuata da entrambi i lettori e complessivo.

Dai grafici è osservabile come non vi siano appunto errori sistematici compiuti da nessuno dei due lettori (sovrastima o sottostima) ma che mentre il lettore n°1 ha ottenuto una variabilità minima nelle ultime classi di età ed una variabilità più evidente per le classi di età 2 e 3 (Fig. 4.9a,c), il secondo operatore al contrario ha mostrato una variabilità maggiore nelle classi di età 5 e 6 (Fig. 4.9b,d). Non vi sono differenze evidenti tra la prima e la seconda ripetizione per entrambi i lettori, questi non hanno dunque modificato la loro interpretazione dei preparati con il passare del tempo. Dal grafico complessivo è possibile notare come la classe di età 4, insieme a quella di età 0 risulti quella con meno variabilità, come già evidenziato dai parametri di precisione.

Nonostante la nota difficoltà nel riconoscimento del primo anello con valore annuale negli otoliti di questa specie, questi parametri non hanno evidenziato un particolare calo di accuratezza in corrispondenza della classe modale 1.

### 4.3.3 Stima dei parametri di crescita tramite metodica diretta

Prima di procedere alla stima dell'accrescimento della specie, è stata analizzata la variabilità nelle lunghezze medie ad età tra i due sessi. E' stato possibile testare le classi di età comprese tra l'età 0 e l'età 4 poiché per le successive i maschi sono scarsamente o per nulla rappresentati (Tab. 4.1). Come è mostrato in tabella, tra queste l'unica classe di età che non ha mostrato differenze statisticamente significative tra i due sessi è la classe 1, mentre le altre differiscono sensibilmente ( $P\text{-value}<0.05$  per le classi 1 e 3;  $P\text{-value}<0,01$  per la classe 2). La percentuale cumulativa di differenze statisticamente significativa è dunque pari al 75%, ed indica una sostanziale differenza nell'accrescimento dei due sessi per questa specie. Per questo motivo, le stime sull'accrescimento successive sono state effettuate, oltre che per il campione totale, anche per i maschi e le femmine separatamente.

Tab. 4.1 – Confronto delle lunghezze medie (LT) ad età di *M. merluccius* e la loro deviazione standard (Dev.St.) tra i due sessi, effettuato tramite il test della varianza ANOVA. \*,  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*,  $0.001 < P < 0.01$ ; NS, non significativo; NC, non calcolato.

Classe età	Femmine			Maschi			P
	LT media	Dev.St.	n	LT media	Dev.St.	n	
0	14.8	2.26	23	13.1	2.72	37	*
1	20.7	3.09	31	20.9	2.7	46	NS
2	27	3.06	32	24.9	3.04	36	**
3	32.8	3.1	29	30.8	2.96	27	*
4	40	2.86	15	34.9	1.2	2	NC
5	46.9	3.19	6	42.1	-	1	NC
6	55.1	5.72	3	-	-	-	NC
7	64.2	-	1	-	-	-	NC

L'accrescimento della specie è stato dunque stimato per entrambe le coste e per entrambi i sessi. In Tab. 4.2 sono riportati i parametri dell'equazione di von Bertalanffy stimati e la numerosità dei campioni utilizzati. In entrambe le coste, è possibile notare come il tasso di accrescimento  $k$  sia più elevato nei maschi, indicando quindi un accrescimento più rapido. Allo stesso modo, questi presentano un valore di  $L_{\infty}$  (51,7 cm ad est e 46,1 cm nella costa ovest) sensibilmente inferiore a quello delle femmine (87,2 e 86,1 cm rispettivamente nelle coste orientale ed occidentale), come è noto per questa specie.



Tab. 4.2 - Parametri di accrescimento dell'equazione di Von Bertalanffy ottenuti per le femmine (F), i maschi (M), e per sessi combinati (C) di *M. merluccius* nelle due aree, tramite metodica diretta.  $L_{\infty}$  = lunghezza massima teorica;  $k$  = tasso di accrescimento;  $t_0$  = dimensioni teoriche all'età 0.

Est	$n$	$L_{\infty}$	e.s.	$k$	e.s.	$t_0$	e.s.
<b>F</b>	63	82.7	22.1	0.14	0.05	-1	0.31
<b>M</b>	61	51.7	10.6	0.23	0.08	-1.1	0.26
<b>C</b>	124	71.6	12	0.16	0.04	-1	0.17
Ovest	$n$	$L_{\infty}$	e.s.	$k$	e.s.	$t_0$	e.s.
<b>F</b>	77	86.1	20.7	0.12	0.04	-1.1	0.18
<b>M</b>	88	46.1	9.6	0.24	0.09	-1.44	0.28
<b>C</b>	165	74.7	13.7	0.14	0.03	-1.2	0.15

Nei grafici seguenti (Figg. 4.10; 4.11; 4.12; 4.13; 4.14; 4.15) sono riportate invece le rappresentazioni grafiche delle curve di accrescimento stimate, insieme ai dati di lunghezza-età ottenuti per ciascuna area per sessi separati e combinati. Si può osservare come a volte le osservazioni relative alle ultime classi di età risultino particolarmente variabili e non rappresentate correttamente dalla curva stimata, indice della difficoltà nell'interpretazione degli otoliti di individui di taglia grande. Questo è particolarmente evidente per le femmine, che raggiungono età maggiori (Fig. 4.10; 4.13).

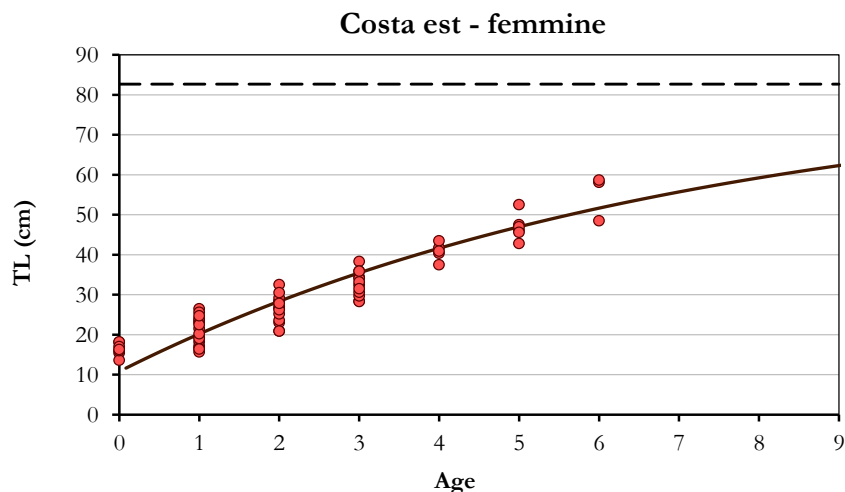


Fig. 4.10 – Curva di accrescimento delle femmine di *M. merluccius* nella costa orientale della Sardegna.

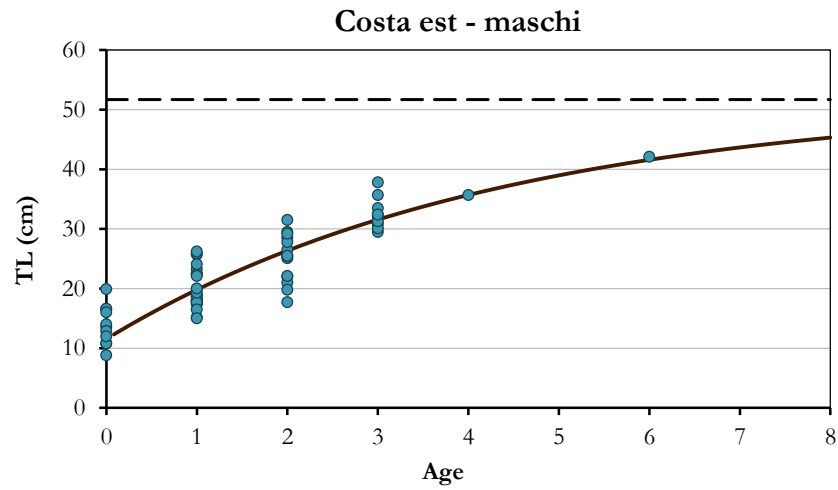


Fig. 4.11 - Curva di accrescimento dei maschi di *M. merluccius* nella costa orientale della Sardegna.

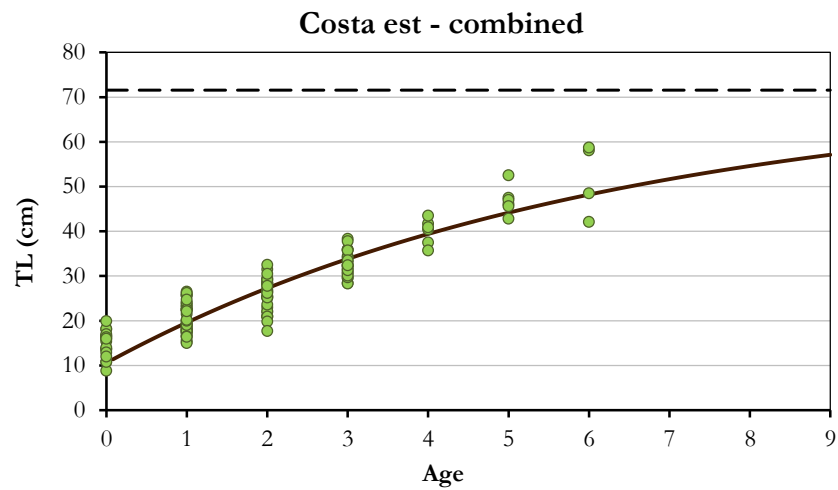


Fig. 4.12 - Curva di accrescimento per sessi combinati di *M. merluccius* nella costa orientale della Sardegna.

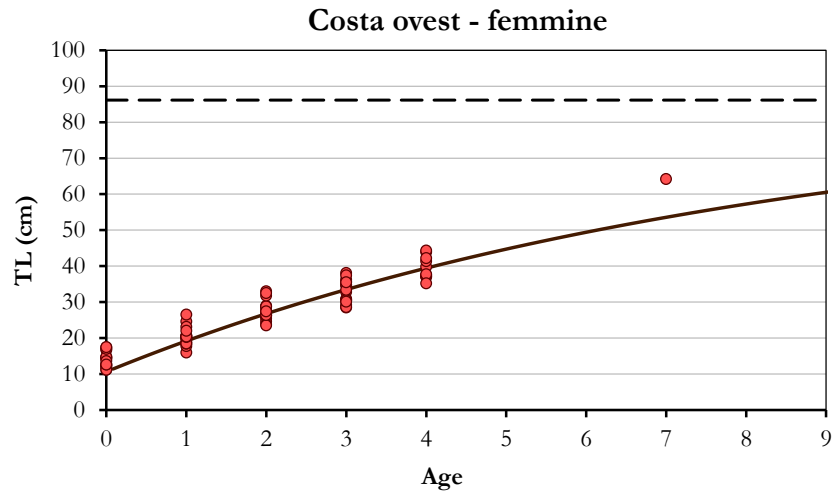


Fig. 4.13 - Curva di accrescimento delle femmine di *M. merluccius* nella costa occidentale della Sardegna.

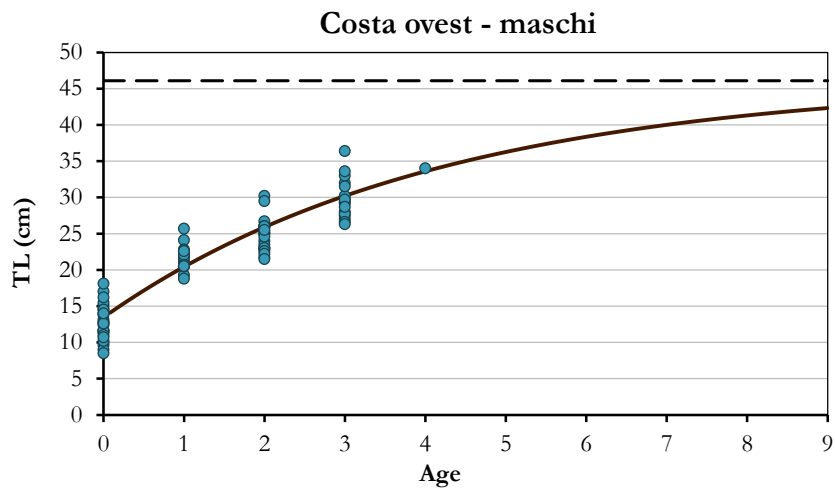


Fig. 4.14 - Curva di accrescimento dei maschi di *M. merluccius* nella costa occidentale della Sardegna.

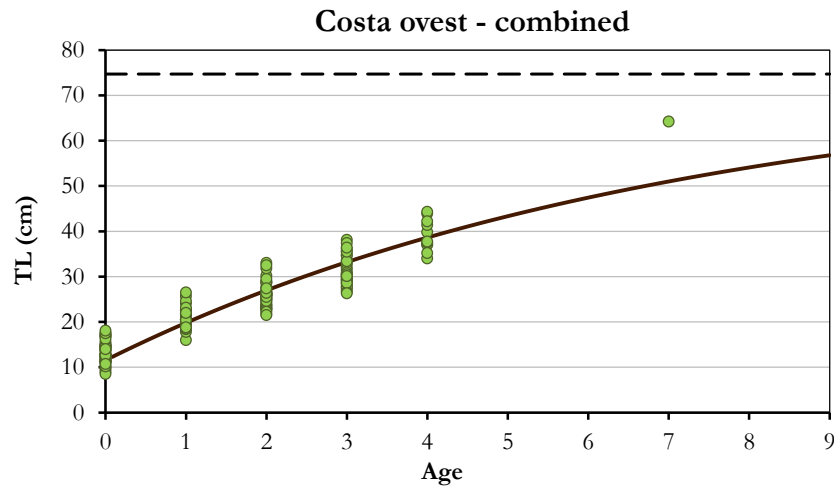


Fig. 4.15 - Curva di accrescimento per sessi combinati di *M. merluccius* nella costa occidentale della Sardegna.

#### 4.3.4 Confronto tra le coste

Successivamente, è stato effettuato il confronto tra le due coste. Per quanto riguarda le femmine (Tab. 4.3), è stato possibile confrontare le prime 5 classi di età (0 – 4 anni), poiché le classi 5 e 6 non sono state rilevate nella costa ovest, viceversa per la classe di età 7 è stato registrato esclusivamente 1 individuo nella costa occidentale.

Tab. 4.3 – Confronto delle lunghezze medie (LT) ad età delle femmine di *M. merluccius* e la loro deviazione standard (Dev.St.) tra le due coste, ottenuto tramite il test della varianza ANOVA. \*,  $0.01 < P < 0.05$ ; NS, non significativo; NC, non calcolato.

Femmine Classe età	Costa EST			Costa OVEST			P
	LT media	Dev.St.	n	LT media	Dev.St.	n	
0	16.4	1.61	7	14	2.17	16	*
1	20.9	3.51	16	20.5	2.68	15	NS
2	26.4	3.43	14	27.5	2.74	18	NS
3	32.7	3.16	12	32.8	3.16	17	NS
4	40.8	2.19	5	39.6	3.18	10	NS
5	46.9	3.19	6	-	-	-	NC
6	55.1	5.72	3	-	-	-	NC
7	-	-	-	64.2	-	1	NC

Come si può evincere dalla Tab. 4.3, tra le 5 classi di età, solo nel caso della classe 0 i test (ANOVA, Welch's ANOVA e Kruskal-Wallis, a seconda delle caratteristiche dei dati) hanno evidenziato una differenza statisticamente significativa ( $P\text{-value} < 0,05$ ). In particolare, nella costa ovest le LT medie alla classe 0 sono risultate significativamente inferiori rispetto ai valori della costa est, indicando probabilmente la maggiore presenza di individui di piccola taglia.

Il confronto tra i dati relativi ai maschi ha riguardato invece le classi di età da 0 a 3 (Tab. 4.4) e anche in questo caso solo in una classe è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa. Nonostante anche questa volta la LT media per la classe 0 nella costa ovest sia inferiore di quella della costa est, la differenza significativa è relativa alla classe 3 ( $P\text{-value} < 0,05$ ), con la costa occidentale che presenta un valore inferiore di 2,8 cm rispetto a quella orientale.

Tab. 4.4 – Confronto delle lunghezze medie (LT) ad età dei maschi di *M. merluccius* e la loro deviazione standard (Dev.St.) tra le due coste, ottenuto tramite: (1) test della varianza ANOVA; (2) test Welch-Anova. \*,  $0,01 < P < 0,05$ ; NS, non significativo; NC, non calcolato.

Maschi Classe età	Costa EST			Costa OVEST			P
	LT media	Dev.St.	n	LT media	Dev.St.	n	
0	13.8	3.24	11	12.8	2.46	26	NS <sup>(1)</sup>
1	20.1	3.31	24	21.6	1.55	22	NS <sup>(2)</sup>
2	25.1	4.08	14	24.8	2.26	22	NS <sup>(2)</sup>
3	32.6	2.55	10	29.8	2.75	17	* <sup>(1)</sup>
4	35.7	-	1	34	-	1	NC
5	-	-	-	-	-	-	NC
6	42.1	-	1	-	-	-	NC

Il confronto è stato infine ripetuto anche per sessi combinati (Tab. 4.5) ed ha interessato le classi di età da 0 a 4 anni. Mentre utilizzando l'intero pool di dati non è più rilevabile la differenza riscontrata nella classe di età 3, quella corrispondente alla classe 0 è evidente anche in questo caso ( $P\text{-value} < 0,05$ ).

Tab. 4.5 - Confronto delle lunghezze medie (LT) ad età del campione totale di *M. merluccius* e la loro deviazione standard (Dev.St.) tra le due coste, ottenuto tramite: (1) test della varianza ANOVA; (2) test Welch-Anova. \*,  $0.01 < P < 0.05$ ; NS, non significativo; NC, non calcolato.

Combined	Costa EST			Costa OVEST			P
Classe età	LT media	Dev.St.	n	LT media	Dev.St.	n	
0	14.8	2.95	18	13.2	2.42	42	*(1)
1	20.4	3.37	40	21.2	2.12	37	NS(2)
2	25.8	3.76	28	26	2.8	40	NS(1)
3	32.6	2.83	22	31.3	3.29	34	NS(1)
4	40	2.86	6	39.1	3.46	11	NS(1)
5	46.9	3.19	6	-	-	-	NC
6	51.9	8.01	4	-	-	-	NC
7	-	-	-	64.2	-	1	NC

Le percentuali cumulative di differenze significative sono risultate dunque molto simili per tutti i confronti (20% per femmine e sessi combinati, 25% per i maschi) e corrispondono, nel complesso, ad un valore di 21,4%. Le classi sono state confrontate soltanto fino all'età 4, oltre questa età, infatti, non si hanno dati sufficienti per i test statistici. I risultati sopra esposti tendono ad indicare tuttavia, con una buona approssimazione, la assenza di sostanziali differenze nell'accrescimento della specie nelle due aree oggetto di studio.

#### 4.3.5 Metodica indiretta

Per la stima dell'accrescimento tramite il metodo indiretto, nella costa occidentale sono stati utilizzati un totale di 68047 individui campionati, considerando i maschi, le femmine e gli individui per cui non è stato possibile determinare il sesso (Fig. 4.16), con un range di taglie compreso tra i 4 e i 92 cm LT. Nel confronto tra i sessi, alcuni campionamenti sono stati esclusi a causa del numero insufficiente di campioni per la corretta rappresentazione delle coorti, e sono stati utilizzati un totale di 14310 femmine (con LT comprese tra 8 e 92 cm) e 14812 maschi (con un range di taglia compreso tra 6 e 60 cm LT) (Fig. 4.17).

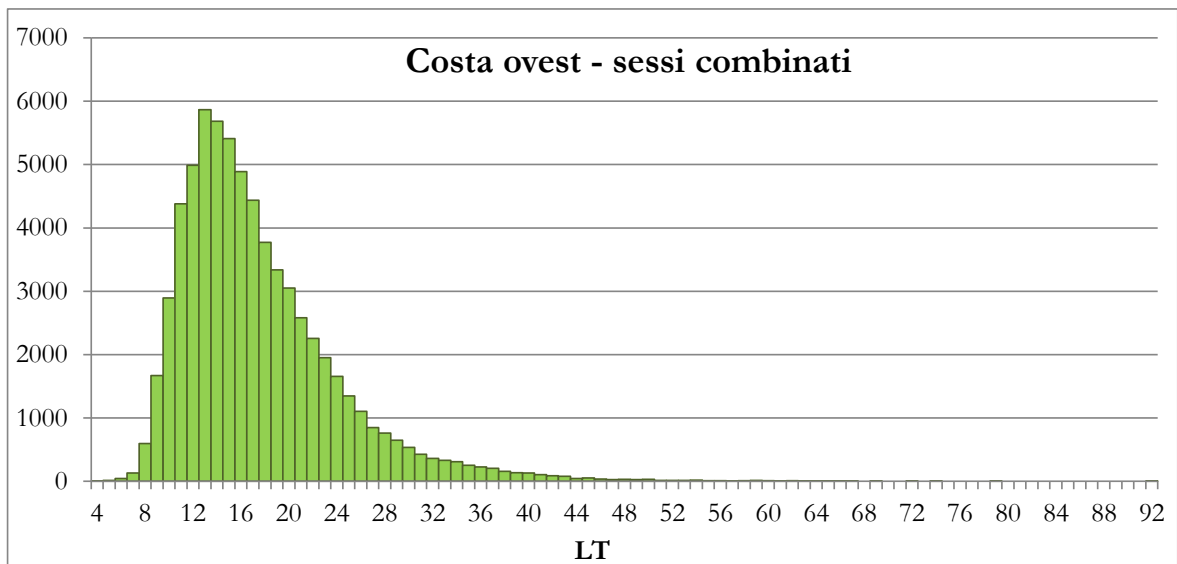


Fig. 4.16 – Distribuzione taglia-frequenza dei campioni di *M. merluccius* analizzati nella costa ovest (sessi combinati).

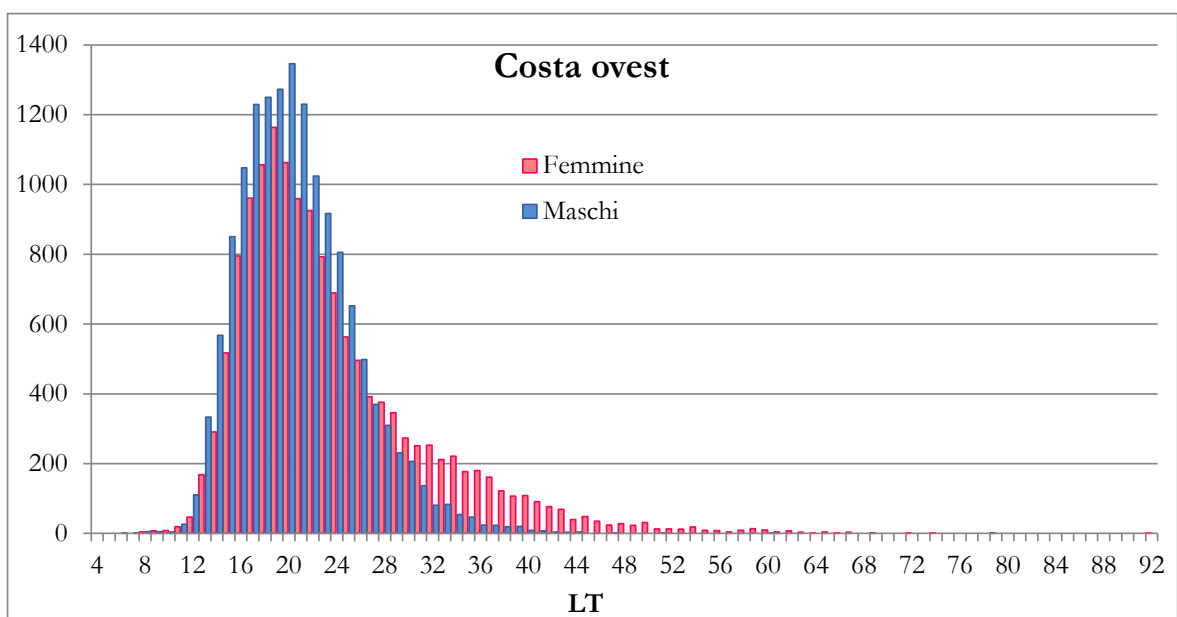


Fig. 4.17 - Distribuzione taglia-frequenza dei campioni di *M. merluccius* analizzati nella costa ovest (maschi e femmine).

Per quanto riguarda invece la costa orientale, i dati utilizzati per l'analisi complessiva sono pari a 8751 individui con taglie variabili tra i 5 e i 79 cm di LT (Fig. 4.18), mentre nella stima dell'accrescimento per sessi separati sono stati utilizzati i dati di 3235 femmine (LT comprese tra 8 e 74 cm) e 2016 maschi, con un range di taglie compreso tra i 7 e i 48 cm LT (Fig. 4.19).

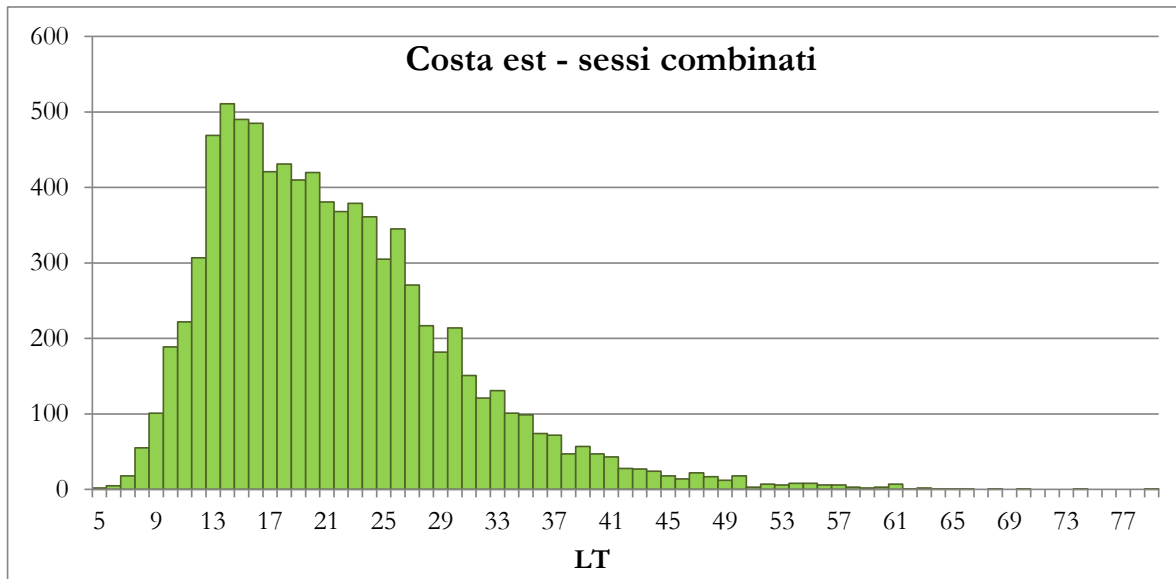


Fig. 4.18 – Distribuzione taglia-frequenza dei campioni di *M. merluccius* analizzati nella costa est (sessi combinati).

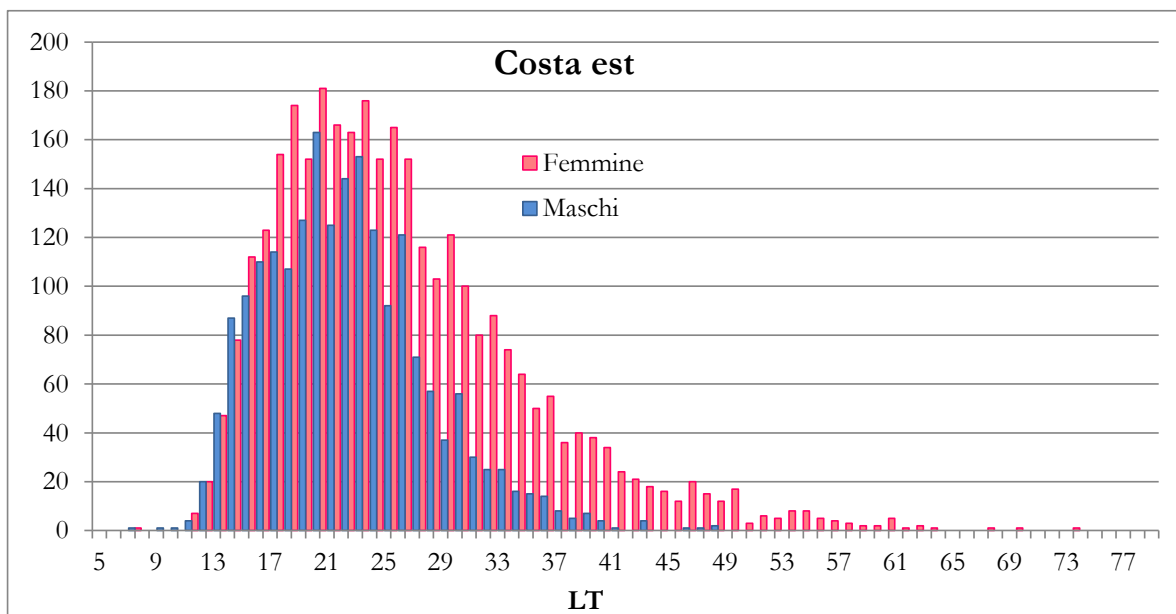


Fig. 4.19 - Distribuzione taglia-frequenza dei campioni di *M. merluccius* analizzati nella costa est (maschi e femmine).

Il metodo di scomposizione delle coorti di Bhattacharya ed il successivo passaggio del “*Linking of means*” ha permesso di ottenere dei dati stimati di lunghezza ad età, che sono stati utilizzati per il calcolo dei parametri di accrescimento dell’equazione di von Bertalanffy, riportati in Tab. 4.6, per entrambe le coste. In generale, con questa metodica è stato stimato un valore di  $L_{\infty}$  minore rispetto alla metodica diretta (Tab. 4.2) ed un tasso di accrescimento  $k$  inferiore, che indica un accrescimento più lento. Il valore che più si differenzia tra i parametri ottenuti con le due metodiche è tuttavia l’età teorica alla



lunghezza zero ( $t_0$ ), che con la metodica indiretta è risultato sensibilmente maggiore, arrivando anche a valori positivi.

Tab. 4.6 - Parametri di accrescimento dell'equazione di Von Bertalanffy ottenuti per le femmine (F), i maschi (M), e per sessi combinati (C) di *M. merluccius* nelle due aree, tramite la metodica indiretta.

$L_\infty$  = lunghezza massima teorica;  $k$  = tasso di accrescimento;  $t_0$  = dimensioni teoriche all'età 0.

<b>Est</b>	<b><i>n</i></b>	<b><math>L_\infty</math></b>	<b>e.s.</b>	<b><i>k</i></b>	<b>e.s.</b>	<b><math>t_0</math></b>	<b>e.s.</b>
<b>F</b>	3235	93.9	6.28	0.08	0.007	0.24	0.064
<b>M</b>	1712	68.06	13.9	0.11	0.03	0.6	0.245
<b>C</b>	8751	71.74	5.25	0.16	0.018	0.06	0.066
<b>Ovest</b>	<b><i>n</i></b>	<b><math>L_\infty</math></b>	<b>e.s.</b>	<b><i>k</i></b>	<b>e.s.</b>	<b><math>t_0</math></b>	<b>e.s.</b>
<b>F</b>	14310	87.8	10.46	0.09	0.015	-0.05	0.13
<b>M</b>	14812	48.05	5.8	0.22	0.049	0.17	0.177
<b>C</b>	68047	69.36	4.6	0.14	0.015	-0.04	0.06

Le curve ottenute per la costa est (Fig. 4.20) sono risultate piuttosto coerenti rispetto alle osservazioni effettuate, soprattutto nel caso delle femmine (b). Una variabilità maggiore è evidente nel caso dei maschi (c) al di sopra dei 3 anni di età, probabilmente a causa della difficoltà nell'identificazione delle coorti successive a questa.

Anche nel caso della costa orientale (Fig. 4.21), è evidente una variabilità maggiore per i maschi (c), mentre le curve per sessi combinati (a) e soprattutto quella delle femmine (b) presentano un ottimo *fitting* sui dati.

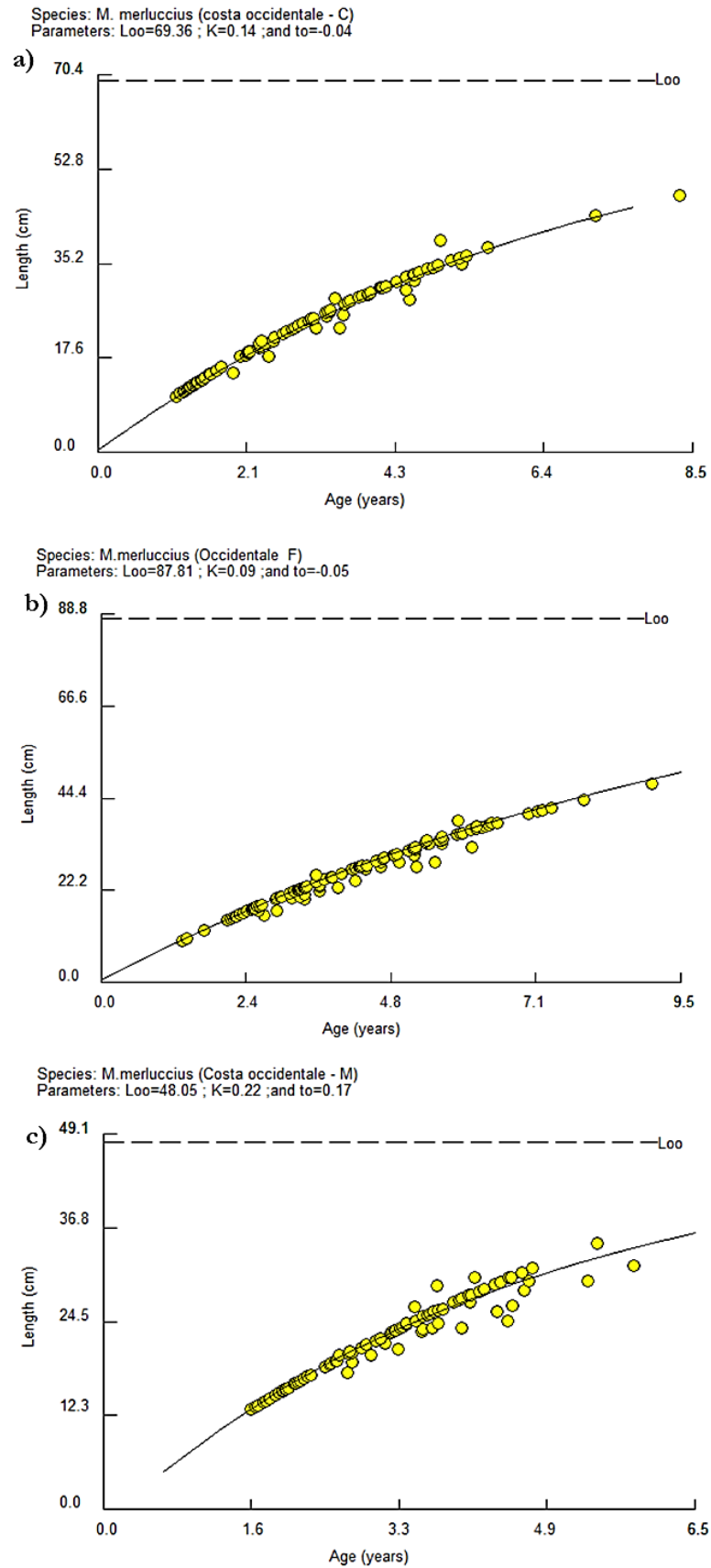


Fig. 4.20 - Curve di accrescimento di *M. merluccius* nella costa occidentale, calcolate attraverso il metodo indiretto, per (a) sessi combinati, (b) femmine e (c) maschi.

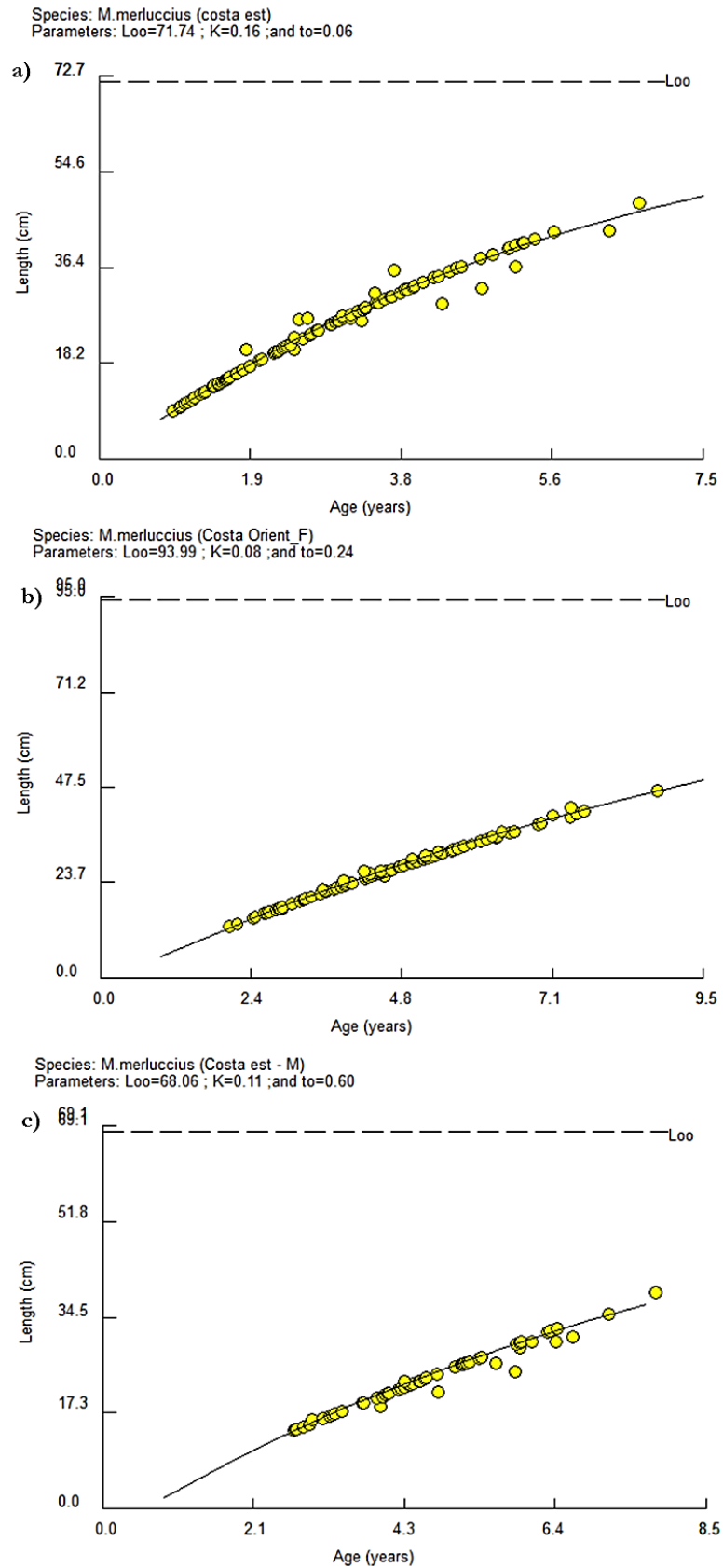


Fig. 4.21 - Curve di accrescimento di *M. merluccius* nella costa orientale, calcolate attraverso il metodo indiretto, per (a) sessi combinati, (b) femmine e (c) maschi.

### 4.3.6 Confronto tra le metodiche

I test applicati alle lunghezze medie per classe di età ottenute attraverso le metodiche dirette e quelle indirette hanno indicato risultati contrastanti. Nel confronto relativo alla costa orientale (Tab. 4.7), di 5 classi di età testate (tra gli 0 e i 4 anni) soltanto nella prima sono state evidenziate differenze statisticamente significative ( $P\text{-value}<0,05$ ). Il metodo diretto ha infatti mostrato una LT media più grande rispetto a quella del metodo indiretto, probabilmente perché in questo caso sono stati considerati individui indeterminati di piccola taglia.

Tab. 4.7 - Confronto delle lunghezze medie (LT) ad età del campione totale di *M. merluccius* nella costa Est e la loro deviazione standard (Dev.St.) tra le due metodiche, ottenuto tramite: (1) test della varianza ANOVA; (2) test Welch-Anova; (3) Kruskal-Wallis. \*,  $0,01<P<0,05$ ; NS, non significativo; NC, non calcolato. (n) n° di campioni letti; (N) n° campionamenti in cui è stata rilevata la coorte.

EST	Metodo indiretto			Metodo diretto			P
	LT media	Dev.St.	N	LT media	Dev.St.	n	
0	13	2.27	19	14.8	2.95	18	* <sup>(1)</sup>
1	20.4	1.48	18	20.4	3.37	40	NS <sup>(2)</sup>
2	25.6	1.38	19	25.8	3.76	28	NS <sup>(2)</sup>
3	31.2	3.02	17	32.6	2.83	22	NS <sup>(3)</sup>
4	36.5	3.94	5	40	2.86	6	NS <sup>(1)</sup>
5	48.5	-	1	46.9	3.19	6	NC
6	-	-	-	51.9	8.01	4	NC

Nel caso della costa occidentale invece (classi di età analizzate: 0-4 anni) i test hanno evidenziato delle differenze significative per le classi 1 e 3 ( $P\text{-value}<0,05$ ) e per la classe 4 ( $P\text{-value}<0,001$ ), ed i risultati sono riportati in Tab. 4.8. In tutti questi casi il metodo indiretto ha rilevato delle LT medie per classi di età inferiori rispetto a quelle ottenute dall'osservazione degli otoliti. Questo dato è in linea con l'accrescimento più lento indicato da questa metodica, già evidenziato nell'analisi delle curve.

Tab. 4.8 - Confronto delle lunghezze medie (LT) ad età del campione totale di *M. merluccius* nella costa Ovest e la loro deviazione standard (Dev.St.) tra le due metodiche, ottenuto tramite: (1) test della varianza ANOVA; (2) test Welch-Anova. \*,  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; NS, non significativo; NC, non calcolato. (n) n° di campioni letti; (N) n° campionamenti in cui è stata rilevata la coorte.

OVEST	Metodo indiretto			Metodo diretto			P
	Classe età	LT media	Dev.St.	N	LT media	Dev.St.	
0	13	1.29	20	13.2	2.42	42	NS <sup>(2)</sup>
1	19.8	1.34	20	21.2	2.12	37	* <sup>(1)</sup>
2	25.2	1.47	19	26	2.8	40	NS <sup>(2)</sup>
3	29.7	1.5	17	31.3	3.29	34	* <sup>(2)</sup>
4	34.1	1.55	9	39.1	3.46	11	*** <sup>(1)</sup>
5	38.1	-	1	-	-	-	NC
6	-	-	-	-	-	-	NC

Le percentuali cumulative di differenze significative ottenute dai confronti dei due metodi analizzando le due diverse coste sono risultate piuttosto differenti. Mentre per la costa orientale è infatti pari al 20%, per quella occidentale è più elevata, ed arriva al 60%. Considerando l'analisi nel suo complesso otteniamo dunque un valore del 40%, che indica una stima dell'accrescimento simile tra i due sessi, ma che suggerisce anche la presenza di alcune differenze, riscontrate soprattutto nelle stime per la costa occidentale.

## 4.4 Discussione

In complesso, le analisi svolte nell'ambito di questo studio hanno fornito una stima dell'accrescimento della specie *M. merluccius* nei mari sardi, differenziata per le due coste principali dell'isola. E' stato possibile ottenere preziose informazioni su un importante parametro della *life history* della specie, il quale è stato inoltre utilizzato come mezzo per investigare la struttura dello stock nell'area di studio.

Per quanto riguarda appunto il processo di determinazione dell'età attraverso gli otoliti, questo si è dimostrato sufficientemente accurato e preciso, come mostrato dagli indici calcolati, in particolare dalla Percentuale di Accordo tra i lettori (per una specie della durata della vita medio-lunga, Campana, 2001). Il valore ottenuto per il Coefficiente di Variazione, pur essendo superiore a quello mediamente riscontrato in lavori di stima dell'accrescimento dell'età (Campana, 2001), può essere considerato discretamente buono, tenendo in considerazione le note difficoltà dell'interpretazione del pattern di accrescimento di questa specie. Non esiste infatti un valore di precisione che può essere designato a priori come una soglia da raggiungere per gli studi di questo tipo, poiché la precisione è fortemente influenzata dalla specie e dalla natura della struttura dura, non esclusivamente dagli operatori (Campana, 2001). L'accuratezza dei lettori è stata inoltre evidenziata anche dal *Bias-test*.

Nonostante le ben note difficoltà nell'identificazione del primo anello con valenza annuale negli otoliti del nasello, dall'analisi della precisione per classi di età non è stata evidenziata una particolare variabilità in corrispondenza di questa età. I lettori sono risultati dunque successivamente concordi nella distinzione di questo anello da quelli falsi presenti in corrispondenza del nucleo.

E' risultata evidente, al contrario, una certa difficoltà nell'attribuzione delle età per gli individui di taglie grandi, nei quali il pattern di bande diventa sempre più complesso (Courbin *et al.*, 2007), riscontrata per questo motivo spesso nelle femmine.

Questa difficoltà è evidente anche nell'elevato valore dell'errore standard relativo al parametro  $L_{\infty}$  (anche in questo caso, in particolare per le femmine). La difficoltà nella preparazione delle strutture dure e nell'interpretazione degli individui più grandi, ha probabilmente influenzato la variabilità di questo parametro.

Il parametro più interessante, stimato nell'ambito di questo lavoro, è tuttavia il tasso di accrescimento,  $k$ . Questo infatti è risultato piuttosto diverso tra i due sessi (variabile tra 0.12 e 0.14 per le femmine e 0.23 e 0.24 per i maschi).

La velocità dell'accrescimento per questa specie è un altro argomento molto discusso in letteratura (Tab. 4.9), e per molto tempo il nasello è stato considerato una specie ad accrescimento lento (con un valore di  $k$  di circa  $0,1 \text{ year}^{-1}$ ) (Aldebert e Recasens, 1995).

Tuttavia da diversi anni alcuni studi effettuati sia nel nord-est Atlantico e nel Mediterraneo centro-occidentale, basati su esperimenti di marcatura e analisi degli incrementi giornalieri hanno ipotizzato e sostenuto che la specie abbia una crescita più rapida (Arneri e Morales-Nin, 2000; Piñeiro e Saínza, 2003; Belcari *et al.*, 2006; de Pontual *et al.*, 2006; Piñeiro *et al.*, 2007; Mellon-Duval *et al.*, 2010; Otxotorena *et al.*, 2010). Questi autori ipotizzano dunque che vi sia stata finora una sovrastima dell'età, dovuta probabilmente alla grande quantità di falsi anelli, e quindi una sottostima dell'accrescimento della specie.

I risultati del presente lavoro, molto simili tra le due aree, sono del tutto in linea con la tesi dell'accrescimento rapido per quanto riguarda i maschi ( $k$  variabile tra 0.23 e 0.24), mentre i valori del tasso di accrescimento delle femmine risultano più vicini a quelli stimati dagli autori che sostengono l'ipotesi dell'accrescimento lento (Aldebert e Recasens, 1995; Pattoura *et al.*, 2014; Philips, 2014).

Risultati simili, con un tasso di accrescimento dei maschi sensibilmente più alto di quello delle femmine, sono stati evidenziati proprio in aree vicine a quella del presente studio, ossia nel Tirreno centro-settentrionale (Colloca *et al.*, 2003; Ligas *et al.*, 2011), mentre in altri casi (relativamente al Mar Ionio) è stato indicato un accrescimento più rapido nelle femmine rispetto ai maschi (Pattoura *et al.*, 2014).

Tab. 4.9 – Parametri di accrescimento stimati per la specie *M. merluccius* nel Mediterraneo (F, femmine; M, maschi; C, sessi combinati).

Riferimento	Località	Sesso	$L_{\infty}$	$k$	$t^0$	metodo
Philips, 2014	Egitto	M	58.9	0.16	0.23	otoliti
		F	69.2	0.13	0.27	otoliti
		C	74.2	0.11	0.28	otoliti
Ligas, 2011	Tirreno settentrionale	M	53.3	0.224	-0.974	otoliti
		F	92.2	0.131	-0.615	otoliti
		C	90.7	0.131	-0.645	otoliti
Mellon-Duval, 2010	Golfo del Leone	F	100.7	0.236	-	Modello 1
		M	72.8	0.233	-	Modello 1
		F	114.6	0.197	-	Modello 2
		M	83	0.192	-	Modello 2
		C	110	0.178	-	Modello 3
Colloca, 2003	Tirreno centrale	M	45.7	0.4	0.1	Back calculations
		F	93.2	0.13	-0.35	Back calculations
García-Rodríguez e Esteban, 2002	Golfo di Alicante	M	86	0.23	-0.035	ELEFAN
		F	116	0.17	-0.018	ELEFAN
García-Rodríguez e Esteban, 1996, 1998	Santa Pola Bay (Spagna)	F	105	0.2	0.39	ELEFAN
		M	90	0.19	0.24	ELEFAN
		C	106	0.2	0.4	ELEFAN
		M	73.3	0.172	-0.108	Fishparm
		F	99.7	0.153	0.264	Fishparm
		C	113.2	0.123	0.137	Fishparm
Aldebert e Recasens, 1995	Golfo del Leone	M	72.8	0.149	-0.383	
		F	100.7	0.124	-0.35	
Alemany e Oliver, 1995	Baleari	F	126.9	0.184	-	Fishparm



I parametri ottenuti, sono stati utilizzati come indice della *life history* della specie, per evidenziare in particolare eventuali differenze sostanziali della popolazione nelle due coste della Sardegna. I test utilizzati sui dati forniti dalla stima diretta dell'età hanno tuttavia riscontrato poche differenze tra le due coste, andando ad indicare una probabile omogeneità di questi parametri nei mari circostanti l'isola.

E' stata evidenziata in particolare una differenziazione nelle taglie degli individui più piccoli nelle due coste (classe di età 0), con la costa occidentale che presenta una taglia significativamente inferiore rispetto alla costa est. Alla luce dei risultati esposti tuttavia, è ipotizzabile che questa differenza sia dovuta alla grande quantità di reclute presenti appunto nella costa occidentale della Sardegna, come noto in letteratura (AA.VV., 2011; Vittori *et al.*, 2013).

Infine, la tecnica di Bhattacharya associata al processo di *Linking of means* ha permesso di ottenere una stima dell'accrescimento per entrambe le aree anche attraverso una metodica indiretta. Questa stima è stata utilizzata come termine di paragone con le stime ottenute attraverso la metodica diretta dell'osservazione degli otoliti. I parametri dell'accrescimento ottenuti per entrambe le coste sono accompagnati da valori di errore più bassi rispetto a quelli della metodica diretta, e le curve calcolate presentano un buon *fitting* sui dati stimati. In tutti i casi tuttavia questa metodica ha prodotto dei valori di  $L_{\infty}$  più elevati, e tassi di accrescimento ( $k$ ) più bassi, associabili all'accrescimento lento (ad eccezione dei maschi della costa ovest).

In complesso, le analisi hanno evidenziato una certa similitudine tra le stime ottenute tramite le due metodiche, tuttavia queste non sono completamente concordi. Questo è probabilmente dovuto alla difficoltà nell'applicazione dei metodi indiretti ad una specie come il nasello, caratterizzata da un periodo riproduttivo molto ampio e con diversi picchi nella riproduzione. Per questo motivo, ulteriori metodiche dovrebbero essere approfondite e promosse come valido strumento di corroborazione dell'età per questa specie.

# 5. Morfometria geometrica

---

## 5.1 Introduzione

L'analisi della forma degli individui gioca un ruolo essenziale in diversi ambiti della biologia. Una grande varietà di processi biologici possono infatti produrre delle differenze nella morfologia degli organismi, come ad esempio malattie e lesioni, lo sviluppo ontogenico, l'adattamento a fattori geografici locali oppure la diversificazione evolutiva a lungo termine (Zelditch *et al.*, 2004).

Inoltre, la classificazione tassonomica degli organismi e lo studio della diversità della vita biologica sono storicamente entrambi basati sulla descrizione della forma morfologica ed hanno costituito un elemento centrale della biologia per secoli.

Con in termine “morfometria” si intende in particolare una tecnica quantitativa che permette di effettuare dei confronti tra diverse forme, come ad esempio alcune caratteristiche anatomiche degli organismi, superando dunque l'utilizzo classico della morfologia, tipicamente qualitativo e descrittivo (Adams *et al.*, 2004).

Sebbene sia un concetto noto a tutti, definire il termine “forma” ed ottenere una misura di questa non è un processo particolarmente semplice. In letteratura, con questo termine viene indicato “*l'insieme dell'informazione geometrica che si ottiene una volta filtrati dall'oggetto tutti gli effetti dovuti al posizionamento, alla scala e alla rotazione*” (Kendall, 1977; Zelditch *et al.*, 2004).

La forma è infatti un parametro piuttosto complesso, che può essere influenzato e spiegato da diversi fattori.

Ad esempio, gli studiosi di morfometria hanno dovuto da sempre tenere in considerazione la problematica dovuta al fatto che il concetto di forma e quello di dimensione sono strettamente correlati (Zelditch *et al.*, 2004). Questo fatto viene identificato con il fenomeno dell'allometria, termine che indica l'associazione statistica tra forma e dimensione (Mosimann, 1970) e può avere come conseguenza ad esempio il diverso tasso di accrescimento tra le parti del corpo di un organismo vivente. In questo caso, le differenze riscontrate nella forma possono essere dovute esclusivamente al fattore

dimensione, e non rappresenterebbero dunque differenze tassonomiche o dovuta a influenze ambientali.

Questo fenomeno non è per nulla raro in biologia, ed è riscontrabile ad esempio anche nell'uomo, nel quale è possibile osservare un diverso rapporto tra le dimensioni della testa e quelle del corpo a seconda che si considerino i bambini oppure gli individui adulti (Mosimann, 1970).

Per questo motivo, ciascuno studio svolto in questo campo ha dovuto considerare l'allometria e grande interesse è stato indirizzato allo sviluppo di metodiche per la correzione dell'effetto taglia, così che le variabili utilizzate dipendessero esclusivamente dalla forma (e.g. Mosimann, 1970; Jungers *et al.*, 1995).

### 5.1.1 La morfometria tradizionale

Tradizionalmente, i dati morfometrici utilizzati corrispondevano a semplici misure di lunghezza, profondità ed ampiezza (Fig. 5.1).

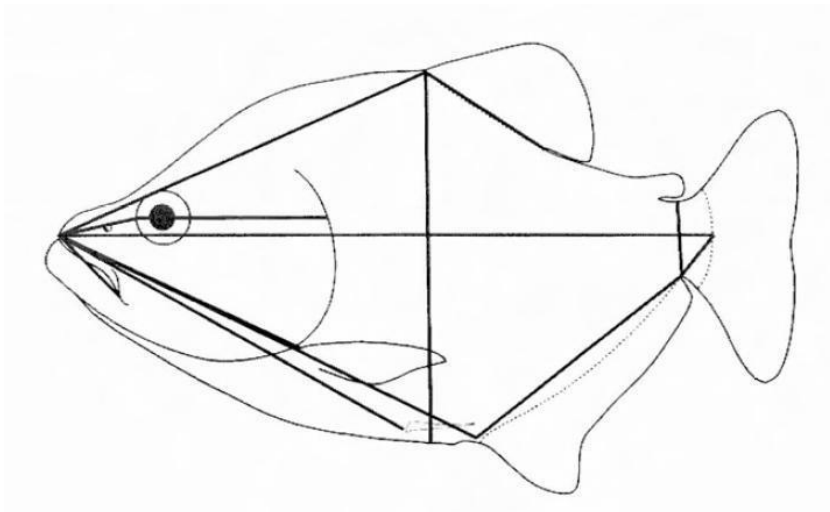


Fig. 5.1 – Misure morfometriche tradizionali della forma esterna del corpo di un teleosteo, adattato da uno schema di Lagler *et al.*, 1962 (da Zelditch *et al.*, 2004).

Tuttavia, un data-set di questo tipo contiene relativamente poche informazioni connesse effettivamente alla forma, ed alcune di queste possono essere considerate ambigue. Spesso infatti queste misure si diramano da un singolo punto, dunque il loro valore non può essere completamente indipendente dalle altre (Zelditch *et al.*, 2004).

Un altro fattore da prendere in considerazione è il fatto che in uno schema di misurazione di questo tipo viene a mancare l'informazione connessa alle relazioni spaziali tra le misure. Questa è fornita solo in maniera grafica nello schema, ma non è presente nelle misure di lunghezza rilevate, che costituiscono i veri e propri dati sui quali verranno svolte le analisi.

Infine, alcune delle misure ottenute in questo modo potrebbero non essere omologhe tra i campioni considerati. Questo può succedere nel caso di misure come l'ampiezza massima del corpo, che non è definita da precisi punti omologhi.

Lo schema classico di misurazione è stato dunque sensibilmente migliorato, senza alterare la sua struttura matematica di base, attraverso il cosiddetto “*box-truss*” o “*truss-network*” (Fig. 5.2), ideato da Bookstein e colleghi (Strauss e Bookstein, 1982; Bookstein *et al.*, 1985).

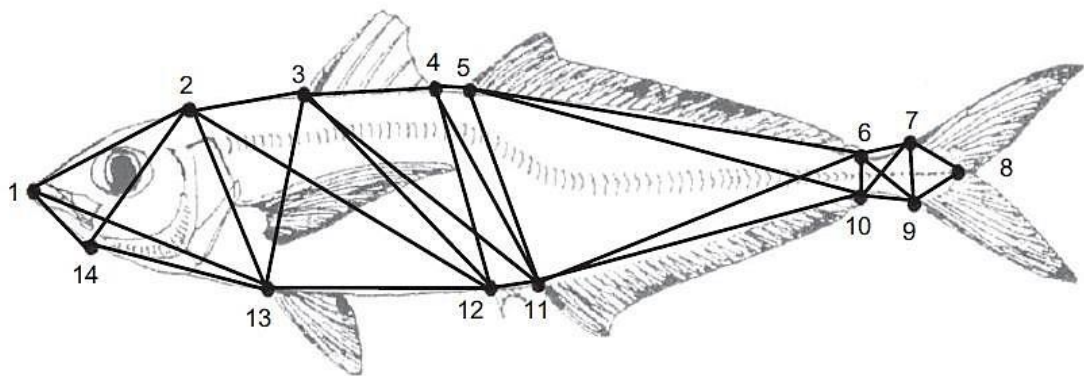


Fig. 5.2 – Esempio di posizionamento dei *landmarks* per la costituzione di un *truss-network* per l'analisi morfometrica della specie *Trachurus mediterraneus* (da Turan, 2004).

In questo modo, l'estrazione delle informazioni è meglio distribuita nel corpo dell'individuo e, soprattutto, i punti terminali di ciascuna misura corrispondono a punti anatomici biologicamente omologhi, che possono essere identificati in ciascun individuo così come in specie differenti. Questi punti vengono indicati con il termine di *landmarks*.

Sebbene questa tecnica rappresenti un chiaro miglioramento rispetto alle analisi classiche, il risultato ottenuto, anche in questo caso, è limitato ad una lista di numeri (valori della lunghezza dei segmenti, o meglio, le loro proporzioni), con tutti i problemi legati alla visualizzazione e all'interpretazione che ne derivano (Zelditch *et al.*, 2004).

### 5.1.2 La morfometria geometrica

Nei primi anni '90 tuttavia, si è verificato un cambiamento nella quantificazione della forma delle strutture morfologiche e nell'analisi dei dati. Questo cambiamento ha enfatizzato i metodi che sono in grado di descrivere la geometria delle parti morfologiche studiate e di conservare questa informazione durante tutta l'analisi (Adams *et al.*, 2004). Rohlf e Marcus (1993) in una review, identificarono questo nuovo approccio con il termine “**morfometria geometrica**” sostenendo come questa innovazione potesse rappresentare una sorta di rivoluzione in questo campo.

L'innovazione sviluppata con la morfometria geometrica sta nel fatto che i dati non sono più costituiti da misure lineari di lunghezza, ma dalle coordinate (a due o a tre dimensioni) dei *landmarks* (Fig. 5.3), ossia di punti con un significato biologico, omologhi ed identificabili in ciascun individuo.

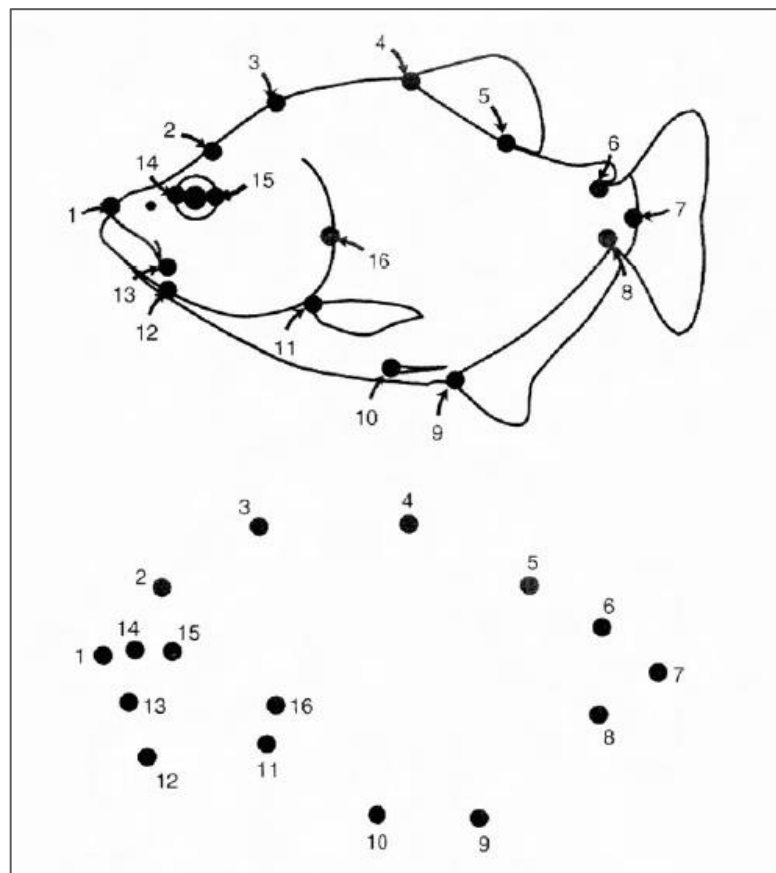


Fig. 5.3 – Esempio di analisi morfometrica di un teleosteo attraverso l'utilizzo dei landmarks (da Zelditch *et al.*, 2004).

Sono state definite tre diverse categorie di *landmarks* in base al loro livello di omologia e definizione (Bookstein, 1991; Marcus *et al.*, 1996):

- **Landmarks di Tipo I:** punti matematici la cui omologia è sempre supportata da delle prove robuste come un pattern locale in cui vi è l'affiancamento di due tessuti diversi, l'intersezione tra due strutture anatomiche, oppure una piccola area istologicamente differente;
- **Landmarks di Tipo II:** punti matematici la cui omologia è supportata esclusivamente da motivazioni geometriche, e non istologiche: per esempio, la curvatura molto appuntita di un dente;
- **Landmarks di Tipo III:** punti che difettano almeno di una coordinata. Ad esempio, il punto finale del diametro massimo, oppure il fondo di una concavità. Possono essere utilizzati come gli altri landmarks in alcune analisi, ma la loro scarsa definizione deve essere tenuta in considerazione durante ogni interpretazione.

In aggiunta a queste categorie, in alcune analisi vengono utilizzati dei punti definiti come “*semi-landmarks*”, generalmente posizionati su una curva in maniera arbitraria, ma che possono provvedere informazioni circa la curvatura di un oggetto in due o tre dimensioni, se questo non può essere analizzato attraverso i normali *landmarks* (Gunz e Mitteroecker, 2013).

L'enorme sviluppo che i sistemi di analisi di immagine hanno subito negli ultimi anni ha inoltre facilitato il progresso e la diversificazione delle tecniche morfometriche, espandendo enormemente la loro potenziale applicazione come mezzo per l'identificazione di uno stock (Cadrin e Friedland, 1999). Queste nuove tecnologie per l'analisi delle immagini hanno spostato l'approccio dell'acquisizione delle immagini dalla raccolta manuale di caratteri morfometrici lineari all'archiviazione automatica delle coordinate morfometriche dei *landmarks* e verso l'uso di più avanzate tecniche geometriche ed analitiche (Begg *et al.*, 1999).

Oltre ai metodi di analisi morfometrica basati sui *landmarks* (sia tramite metodiche tradizionali che di morfometria geometrica) esiste un altro ramo dello studio della morfometria che si basa invece sull'analisi dei contorni (Stransky, 2013). La differenza tra i due metodi sta nel fatto che quando vengono utilizzati i *landmarks* si analizzano dati ricavati

da punti morfometrici ben definiti, e le distanze e le relazioni geometriche tra di essi; invece nel caso dell'analisi dei contorni vengono rilevate le differenze nel perimetro di due o più forme. Questi studi, se rivolti a popolazioni di specie ittiche, utilizzano generalmente gli otoliti e la loro forma come elemento di discriminazione (Campana e Casselman, 1993; Karlou-Riga, 2000; Torres *et al.* 2000; Stransky *et al.*, 2008; Radhakrishnan *et al.*, 2012).

Le analisi svolte nell'ambito di questa tesi rientrano tuttavia nel campo della morfometria basata sui *landmarks*, quindi, nelle pagine seguenti, verranno approfondite esclusivamente le problematiche e le procedure connesse a questo tipo di analisi.

### 5.1.3 Le tecniche di *superimposition*

Come descritto precedentemente, la forma di un organismo vivente non viene influenzata dalle operazioni che modificano il suo posizionamento nello spazio (trasposizione), la sua rotazione o la sua scala (Fig. 5.4).

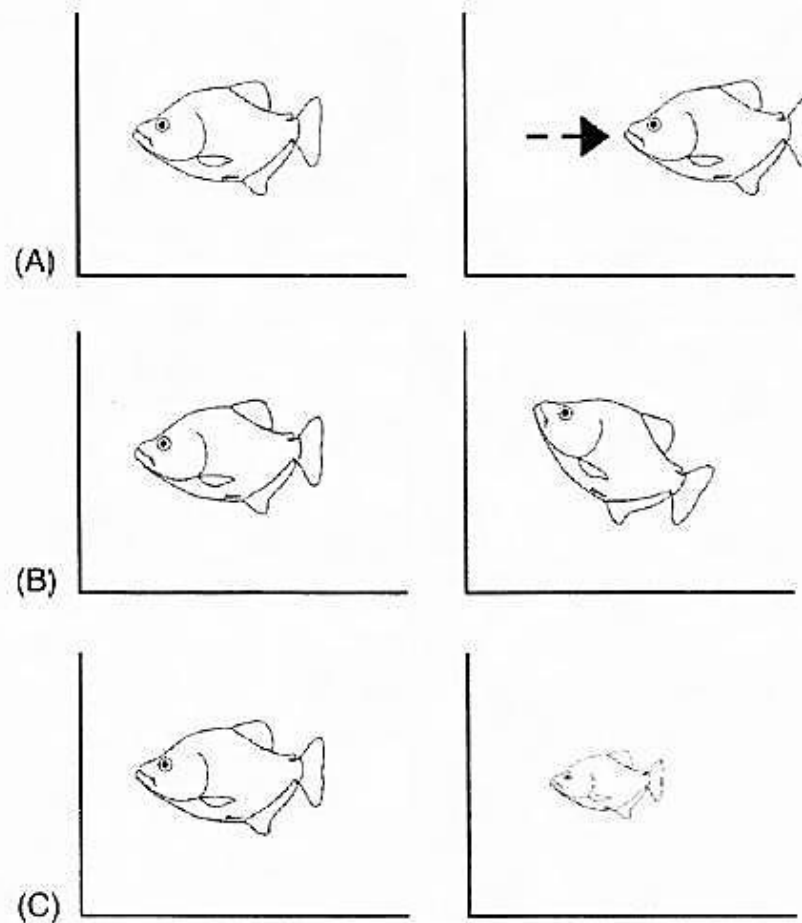


Fig. 5.4 – Rappresentazione delle tre operazioni che non alterano la forma: (A) traslazione, (B) rotazione e (C) modifica della scala (da Zelditch *et al.*, 2004).

Da ciò consegue che, per effettuare un confronto tra due forme, è necessario eliminare preliminarmente dalla variabilità quella componente dovuta alla posizione, alla rotazione ed infine alla scala, e questo processo viene chiamato *superimposition* (sovrapposizione).



Per identificare quest'ultima componente (la scala di un oggetto) è necessario innanzitutto localizzare il centro della conformazione studiata (definito *centroid*) e calcolare successivamente la distanza tra questo e ciascun *landmark*. Viene quindi calcolato il “*centroid size*”, una misura corrispondente alla radice quadrata della somma dei quadrati di ciascuna di queste distanze, e che rappresenta una misura di quella parte del “fattore dimensione” che è matematicamente indipendente dalla forma (Zelditch *et al.*, 2004).

Una volta ottenuta questa misura, vengono applicate le tecniche di sovrapposizione, tra le quali la più utilizzata è la **Generalized Least Squares Procrustes Superimposition (GLS)**. I diversi passaggi di questa procedura, descritti in dettaglio da Rohlf (1990), sono rappresentati in Fig. 5.5 e vengono qui riportati in sintesi:

- 1) Ciascuna configurazione di landmarks viene centrata all'origine sottraendo le coordinate del suo *centroid* dalle coordinate (X o Y) corrispondenti di ciascun *landmark*. Questa operazione ha come risultato la traslazione di ciascun *centroid* all'origine (Fig. 5.5b).
- 2) Le configurazioni vengono in seguito portate ad una stessa scala, dividendo le coordinate di ciascun *landmark* per il *centroid size* di quella configurazione (Fig. 5.5c).
- 3) Infine, una configurazione viene scelta come riferimento e le successive vengono ruotate in modo da minimizzare la “*Procrustes distance* parziale” (ossia la somma dei quadrati delle distanze di due *landmarks* omologhi) (Fig. 5.5d).

In questo senso, viene definita *Procrustes distance* (totale) la misura quantitativa del grado di similarità tra due o più configurazioni di landmarks (Rohlf, 1990).

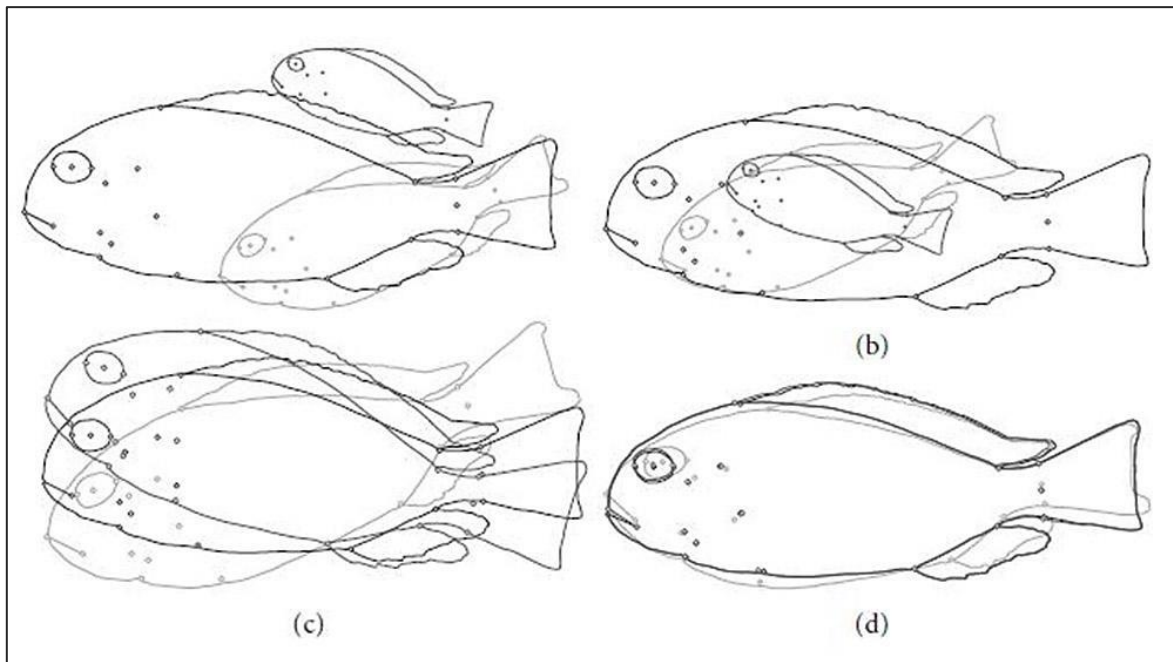


Fig. 5.5 – Descrizione della *Procrustes superimposition* delle configurazioni originali (a) di diversi teleostei. (b) Il *centroid* di ciascuna configurazione è traslato all'origine; (c), le configurazioni vengono riportate alla stessa scala e (d) vengono ruotate per minimizzare le differenze quadrate tra i *landmarks* corrispondenti (modificato da Kerschbaumer e Sturmhuber, 2011).

Il risultato di questa procedura consiste in una serie di coordinate di landmarks omologhi che possono essere confrontate tra loro, discriminando, attraverso diverse analisi, quali componenti della variabilità riscontrata siano connesse al fattore allometria, e quali siano invece influenzate da altri fattori (genetici o ambientali).

#### 5.1.4 La discriminazione degli stock attraverso la morfometria

La morfologia degli individui è infatti un tratto fenotipico influenzato da numerosi fattori che comprendono geni ereditari ma anche le condizioni ambientali, soprattutto quelle sperimentate durante le prime fasi di vita (Cadrin, 2000). Per questo la forma del corpo può essere considerata un prodotto dell'ontogenesi, e le differenze riscontrate nella morfometria possono essere connesse a differenze nei tassi di crescita e maturazione di un individuo (Cadrin, 2013).

Lo studio della variabilità morfometrica ha avuto numerose applicazioni in letteratura, ad esempio come fattore per rilevare la presenza di dimorfismo sessuale in una specie (Benitez, 2013).

Già da tempo, tuttavia, l'analisi della variabilità morfometrica è stata utilizzata nel campo dell'identificazione degli stock. Infatti è considerata un ottimo strumento per ottenere informazioni sulla variabilità genetica oppure sui pattern dei movimenti di una specie, e, negli ultimi anni, diversi lavori hanno associato le analisi morfometriche ad altre metodiche per ottenere una visione più completa della struttura di alcuni stock ittici. Associata ad altre tecniche infatti, la morfometria può fornire preziose informazioni sugli stock intesi in senso fenotipico, ossia sui gruppi di individui che si differenziano in base all'accrescimento, alla mortalità ed ai tassi riproduttivi (Booke , 1981).

Un esempio di approccio multidisciplinare che comprendesse le analisi morfometriche è rappresentato dall'analisi svolta da Murta *et al.* (2008) per la struttura di popolazione del sugarello (*Trachurus trachurus*), studio effettuato nell'ambito del più ampio *HOMSIR project* (*cf.* cap. 2.1.2). In questo studio, attraverso l'utilizzo di tecniche morfometriche tradizionali e geometriche, sono state evidenziate differenze significative in diverse aree geografiche, sia nell'Oceano Atlantico che nel Mar Mediterraneo (Fig.5.6).

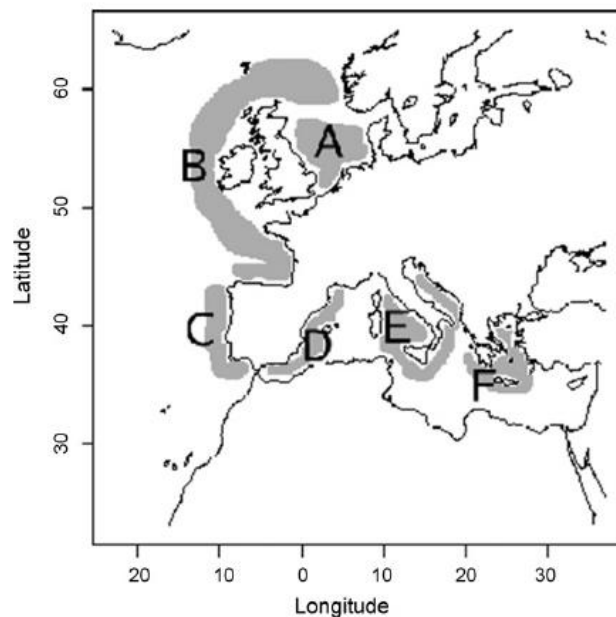


Fig. 5.6 – Stocks del sugarello (*Trachurus trachurus*) identificati attraverso l'analisi morfometrica (da Murta *et al.*, 2008).

In questo bacino, tre diversi gruppi sono stati identificati: uno occidentale, corrispondente alle isole Baleari, al mare di Alborán ed alla Catalogna; uno orientale, che include i mari Ionio ed Egeo ed infine uno centrale, comprendente i mari Tirreno ed Adriatico, insieme alle isole della Sardegna e della Sicilia. Anche per questa specie dunque l'areale dei mari sardi appare associato al resto del bacino centrale del Mediterraneo.

Zischke *et al.* (2013) ha invece associato un'analisi morfometrica tradizionale (analizzando le diverse misure rilevate all'interno di un *truss-network*) all'analisi dei parassiti per investigare la popolazione di wahoo (*Acanthocybium solandri*) in un areale molto ampio, comprendente l'Oceano Pacifico settentrionale, una regione del Pacifico orientale ed infine l'Oceano Indiano orientale. Nonostante le precedenti informazioni relative all'omogeneità genetica di queste popolazioni, sia le analisi parassitologiche che quelle morfometriche hanno suggerito, in questo caso, la presenza di diversi stock fenotipici all'interno dell'areale, fornendo uno spunto per ulteriori analisi.

Nell'Atlantico occidentale invece, il già citato progetto EU (Redfish Project) (*cf.* cap. 2.1.2), ha ottenuto una discriminazione delle popolazioni del genere *Sebastes* nell'Irminger sea, utilizzando tra le varie metodiche di indagine, anche la morfometria (ICES, 2004). Successive analisi morfometriche e meristiche (Trella *et al.*, 2013) hanno in seguito confermato questa separazione, andando a convalidare la decisione di istituire due differenti unità gestionali per queste popolazioni.

Ad oggi, ancora pochi studi che utilizzassero l'approccio morfometrico sono stati rivolti all'investigazione della struttura delle popolazioni di nasello.

Torres *et al.* (2000) ha analizzato l'efficacia delle analisi della forma degli otoliti nell'identificazione di diversi stock fenotipici testando questo approccio su tre diverse specie appartenenti al genere *Merluccius* (*M. gayi*, *M. hubbsi* e *M. merluccius*), in diverse aree del mondo. In particolare, il nasello europeo è stato selezionato perché la sua distribuzione geografica comprende aree molto differenti. Per quanto riguarda *M. merluccius* tuttavia gli autori hanno confrontato esclusivamente i campioni provenienti da due aree, una atlantica (*Bay of Biscay*) ed una nel Mediterraneo (Golfo del Leone), ottenendo una chiara discriminazione di queste popolazioni attraverso i test applicati. Queste informazioni sono risultate dunque in linea con gli studi citati precedentemente (*cf.* cap.2) riguardo alla presenza di almeno due stock differenziati di *M. merluccius* nel Mar Mediterraneo e nell'Oceano Atlantico.

Lo studio svolto da Levi *et al.* (2004) è stato invece rivolto ad un'analisi su scala meno ampia della variabilità delle popolazioni di nasello presenti nei due versanti dello stretto di Sicilia, nel Mar Mediterraneo. Gli autori in questo caso hanno scelto un approccio multidisciplinare affiancando la morfometria tradizionale ad analisi genetiche e dell'accrescimento. Nonostante i risultati ottenuti attraverso il metodo morfometrico e meristico indicassero alcune differenze tra le due aree studiate (in particolare per gli individui giovani di sesso femminile), le altre metodiche hanno mostrato risultati discordi, portando gli autori ad ipotizzare la presenza di un'unica popolazione di *M. merluccius* nell'area.

In questo lavoro di tesi, è stato scelto di svolgere uno studio della morfometria degli individui di *M. merluccius* per ottenere una stima della variabilità fenotipica all'interno dell'areale studiato, ed in particolare per effettuare un confronto tra le coste orientale ed occidentale della Sardegna. L'approccio seguito è quello della morfometria geometrica basata sui *landmarks* che, come descritto sopra, permette di svolgere un'analisi più approfondita e corretta della forma di un organismo. Questo rappresenta dunque anche la prima applicazione di uno studio morfometrico più avanzato per la specie *M. merluccius* in Mediterraneo.

I risultati ottenuti in questo capitolo verranno successivamente integrati a quelli ottenuti in seguito alle analisi dell'accrescimento e parassitologiche per ottenere una visione d'insieme.

## 5.2 Materiali e metodi

Prima di effettuare il campionamento degli individui di *M. merluccius* da destinare all'analisi morfometrica, è stata svolta una ricerca che portasse all'identificazione dei punti anatomici più adatti per il posizionamento dei *landmarks* e per definire il protocollo dell'acquisizione delle immagini.

Questo processo ha portato all'identificazione di 11 punti adatti per il posizionamento dei *landmarks* (Fig. 5.7), la cui descrizione è riportata in Tab. 5.1.

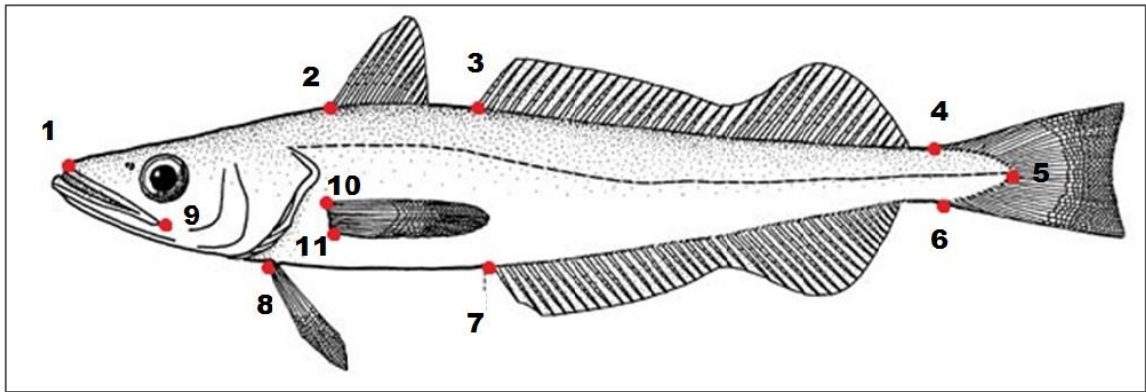


Fig. 5.7 – Schema descrittivo della posizione degli 11 *landmarks* utilizzati nell'analisi.

Tab. 5.1 – Descrizione della posizione di ciascun *landmark* selezionato in base alle strutture anatomiche di *M. merluccius*.

Landmark n°	Descrizione
1	Estremità anteriore del muso (mascella superiore)
2	Origine del primo raggio della prima pinna dorsale
3	Origine del primo raggio della seconda pinna dorsale
4	Inserzione del primo raggio dorsale della pinna caudale
5	Termine posteriore della linea laterale
6	Inserzione del primo raggio ventrale della pinna caudale
7	Origine del primo raggio della pinna anale
8	Origine della pinna ventrale
9	Estremità posteriore della mandibola
10	Inserzione del primo raggio dorsale della pinna pettorale
11	Inserzione del primo raggio ventrale della pinna pettorale

Diversi altri punti sono stati inizialmente presi in considerazione per l'analisi, ma sono stati scartati perché difficilmente identificabili oppure poco definiti. Ad esempio, è il caso dell'estremità posteriore dell'opercolo, caratterizzata da una curva molto ampia nella quale è difficoltoso individuare il punto di massima curvatura, oppure le estremità delle pinne, spesso fragili e quindi danneggiate.

Una volta identificati i punti anatomici più adatti, è stata effettuata la selezione degli individui per l'acquisizione delle immagini.

I campioni di nasello utilizzati per questa analisi sono stati raccolti in occasione della campagna sperimentale MED.I.T.S. dell'anno 2013 e provengono dalle coste occidentale ed orientale della Sardegna. Sono state acquisite un totale di 234 immagini di campioni provenienti dalla costa orientale ( $n = 109$ ) ed occidentale ( $n = 125$ ).

Per l'acquisizione delle immagini ciascun individuo è stato posizionato, insieme ad un codice identificativo, su di una tavola di polistirene bianco con il lato sinistro rivolto verso la camera (Fig. 5.8). Le principali strutture del corpo (le pinne dorsali, ventrali, ecc.) sono state messe in evidenza tramite l'utilizzo di spilli. Le immagini, ognuna dotata di un riferimento all'unità di misura, sono state acquisite attraverso una fotocamera reflex digitale Nikon D3100, fissata su uno stativo e con obiettivo Micro Nikkor con lunghezza focale 85 mm ed apertura 3,5 (adatto ad evitare la distorsione ottica).



Fig. 5.8 – Esempio del posizionamento di un campione di *M. merluccius* per l'acquisizione dell'immagine digitale.

Le foto ottenute sono state successivamente visionate e valutate per selezionare quelle adatte all'inclusione nell'analisi. Perché i campioni possano essere considerati è infatti necessario che tutti i *landmarks* siano identificabili e le strutture anatomiche corrispondenti non siano danneggiate né distorte. L'impossibilità di identificare anche un solo *landmark* impedisce l'utilizzo del campione. Per mantenere alcuni punti nell'analisi è stato dunque necessario escludere diverse immagini, come nel caso del *landmark* n°5 (termine posteriore della linea laterale), risultato spesso in posizione scorretta a causa della distorsione della pinna caudale (Fig. 5.9).



Fig. 5.9 – Esempio di problematica connessa alla distorsione dei campioni. Nella prima foto (*a sinistra*) è rappresentata il corretto posizionamento della pinna caudale di un campione di *M. merluccius* per l'identificazione dei landmarks n° 4,5 e 6. Nella seconda foto (*a destra*) la pinna caudale risulta storta causando l'esclusione del campione.

Una volta completata la selezione delle immagini, queste sono state riunite in un unico file in formato tps tramite il software tps-Util vers. 1.58, successivamente, per ciascuna foto è stata attribuita una scala in base all'unità di misura presente ed infine si è proceduto all'acquisizione delle coordinate dei *landmarks* attraverso il software tps-Dig vers. 2.17 (entrambi sviluppati da Rohlf, 2013).

Una volta digitalizzato, ciascun campione viene rappresentato da una configurazione di coordinate di *landmarks*, chiamata “matrice di configurazione” (Zelditch *et al.*, 2004).

Una volta ottenuta la matrice di configurazione, i dati sono stati importati nel software MorphoJ (Klingenberg, 2011) per le successive analisi.

Come primo passaggio, è stata applicata una *Procrustes superimposition* per estrarre le informazioni relative alla forma dai dati. Questa tecnica produce un nuovo dataset di coordinate sovrapposte, che mantiene tuttavia l'informazione relativa alla dimensione dei



campioni sotto forma di *centroid size*. In aggiunta, fornisce le coordinate della “*mean shape*” ossia la configurazione media di ciascun *landmark* sul totale del campione.

Successivamente è stata applicata una Regressione multivariata sui dati sovrapposti per ottenere una stima della presenza di allometria nei dati, e se presente, eliminarne l'effetto (Sequeira *et al.*, 2011). Questo avviene perché la regressione separa quella componente della variabilità della variabile dipendente (la forma) che è predetta dalla variabile indipendente (la taglia) dai residui, che rappresentano invece quella parte della variabilità della forma non correlata alla variabile indipendente (Fig. 5.10)(Klingenberg, 2008).

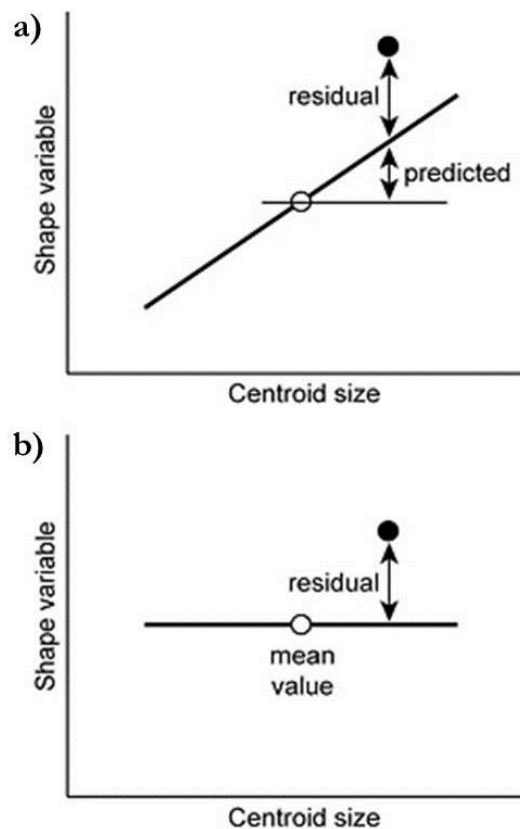


Fig. 5.10 – Esempio di eliminazione dell'effetto taglia attraverso la regressione per un singolo punto (*in nero*): (a) la sua deviazione dalla media del campione (*punto bianco*) è suddivisa in una componente “predetta” dalla variabile indipendente e da una residua. (b) Una volta eliminata la componente predetta, la variabilità residua corrisponde esclusivamente alla forma (modificato da Klingenberg, 2008)

Per le analisi successive verrà infatti utilizzato il database dei residui, fornito dal software.

Per ottenere questo risultato è stata utilizzata come variabile dipendente la *Procrustes distance* (informazioni sulla forma) e come variabile indipendente il *Centroid-size* trasformato logaritmicamente (che include l'informazione sulla taglia). Per ottimizzare la discriminazione di eventuali gruppi, è stata selezionata una *pooled-within-group regression*, indicando il fattore area come discriminante tra i gruppi.

Il software fornisce inoltre il valore percentuale della variabilità spiegata dalla taglia insieme al risultato di un *Permutation test* (con 10.000 *runs*) effettuato per valutare l'ipotesi nulla dell'indipendenza tra taglia e forma.

Per ottenere un'indicazione riguardo alla presenza di dimorfismo sessuale ed una informazione preliminare circa la differenziazione dei campioni tra le due coste è stata effettuata una *Procrustes ANOVA*, selezionando come fattori da testare sia la variabile area che il sesso. Poiché l'analisi ha evidenziato la presenza di dimorfismo sessuale, le successive analisi sono state applicate separatamente per ciascun sesso.

Una volta effettuata la correzione per la taglia, per ottenere un esame generale della variabilità della forma all'interno del campione è stata applicata una *Principal Component Analysis* (PCA) ai campioni provenienti dalle due coste.

Infine, per approfondire le eventuali differenze riscontrate ed ottenere una valutazione statistica di queste è stata utilizzata una *Discriminant Function Analysis* (DFA). Questa tecnica esamina la separazione tra due gruppi di osservazioni che sono noti a priori. La sua affidabilità viene valutata secondo diverse metodiche: un test parametrico *T-square*, per la differenza tra le medie nei gruppi, una tavola con le percentuali di corretta classificazione, ed una *leave-one-out cross-validation* (Lachenbruch, 1967). Questa tecnica fornisce una stima della accuratezza di un modello predittivo escludendo dal campione un dato alla volta e utilizzando il modello per predire la sua riclassificazione.

Infine, è stato incluso nell'analisi anche un *Permutation test* (10.000 *runs*) che si basa sulle *procrustes distances*.

## 5.3 Risultati

La verifica e la valutazione delle immagini ha portato all'esclusione di 33 di queste dal campione, mantenendo per le analisi un totale di 201 immagini di *M. merluccius* provenienti dalle coste occidentale ed orientale della Sardegna. In Tab. 5.2 sono riportate dunque le numerosità di ciascun campione utilizzato ed i rispettivi range di lunghezza totale (LT).

Tab. 5.2 – Numero totale di campioni di *M. merluccius* e range di lunghezza totale (LT) analizzati per ciascuna area.

	n	Range (LT, cm)	LT media $\pm$ dev.st. (cm)
<b>Est</b>	97	16,6 – 58,1	26,6 $\pm$ 7,9
<b>Ovest</b>	104	19 – 73,5	30,2 $\pm$ 8,5

La *Procrustes superimposition* applicata al database originale delle coordinate dei *landmarks* ha permesso di ottenere un database di coordinate sovrapposte in cui è stata eliminata la componente della variabilità dovuta alla posizione, rotazione e scala dei campioni. In Fig. 5.11 è riportata per ciascun *landmark* sia la posizione “media” ottenuta dall'intero campione (punti in blu) che la configurazione dei *landmark* di ciascun individuo compreso nel campione (punti in nero).

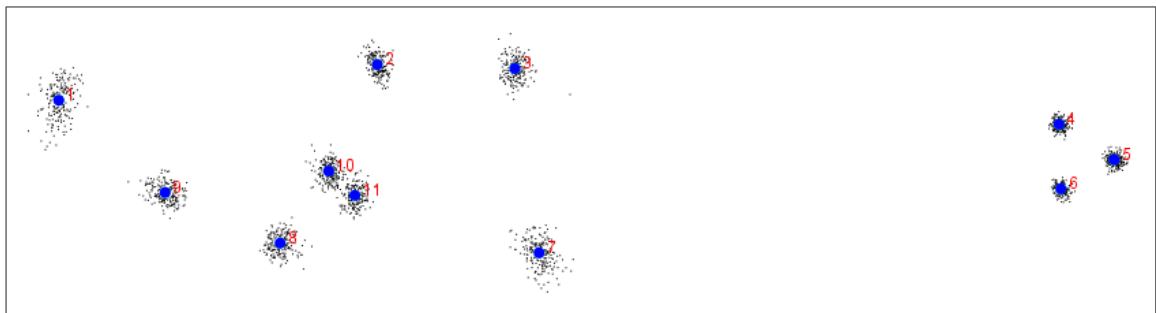


Fig. 5.11 – Schema rappresentante la sovrapposizione dei campioni ottenuta attraverso la procedura della *Procrustes superimposition*. In blu è indicata la posizione media per ciascun landmark mentre in nero sono indicate le configurazioni dei landmark di ciascun individuo.

Da questi dati è stata successivamente valutata la presenza di allometria nel database attraverso una regressione multipla (Fig. 5.12). La quantità di variazione della forma spiegata dalla regressione (quindi dovuta all'effetto taglia) è risultata pari al 3,69%. Nonostante il valore non molto elevato, il *Permutation test* ha tuttavia confermato la presenza di una correlazione statisticamente significativa tra taglia e forma ( $P\text{-value} < 0,001$ ). Per questo motivo per le successive analisi è stato utilizzato il database dei residui della regressione.

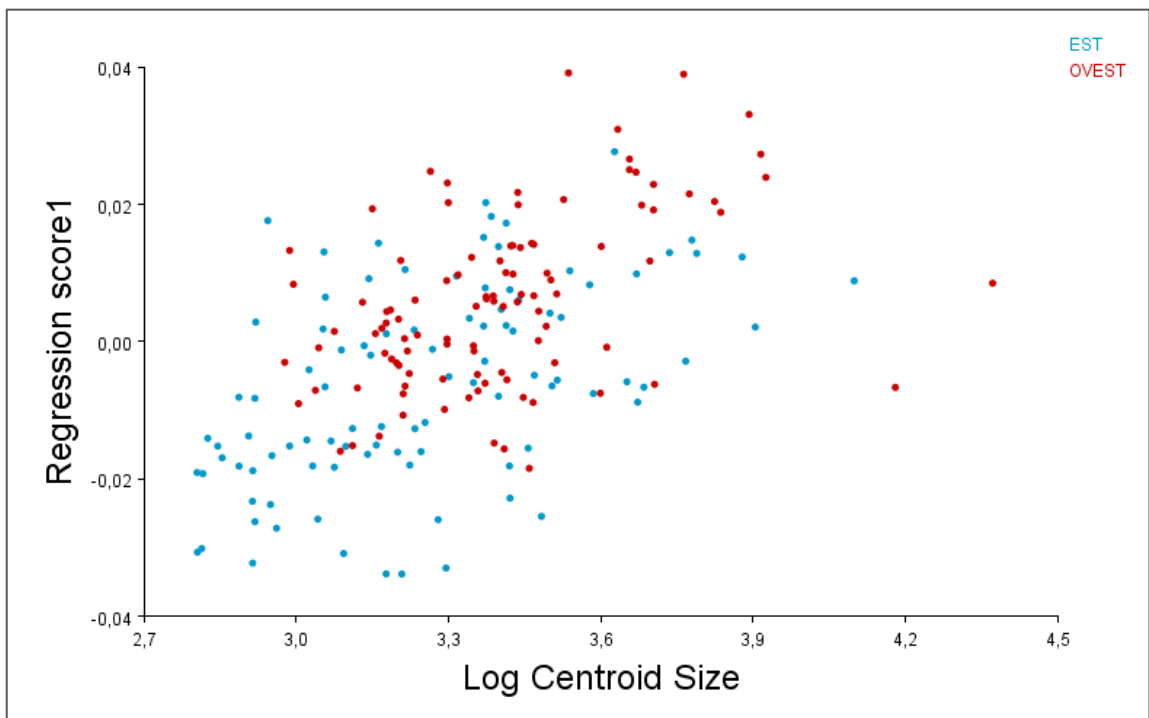


Fig. 5.12 - Scatterplot dei dati corrispondenti agli *shape scores* in funzione della variabile indipendente (*log centroid size*) che rappresenta la presenza di allometria dovuta all'ontogenesi.

L'analisi della variabilità della forma tra i sessi e tra le rispettive aree di campionamento, effettuata attraverso una *Procrustes ANOVA*, ha mostrato una differenza statisticamente significativa sia per il fattore "area" che per la variabile "sesso" ( $P\text{-value} < 0,0001$ ). Per questo motivo, le analisi successive per investigare la variabilità tra le aree sono state effettuate separatamente per ciascun sesso.

Il database dei residui ottenuto attraverso la regressione è stato utilizzato per l'applicazione della PCA. I risultati ottenuti mostrano come la prima PC, per entrambi i

sessi, arrivi a spiegare circa il 40% della variabilità totale del campione, mentre complessivamente le prime cinque PC superino l'81% (Fig. 5.13).

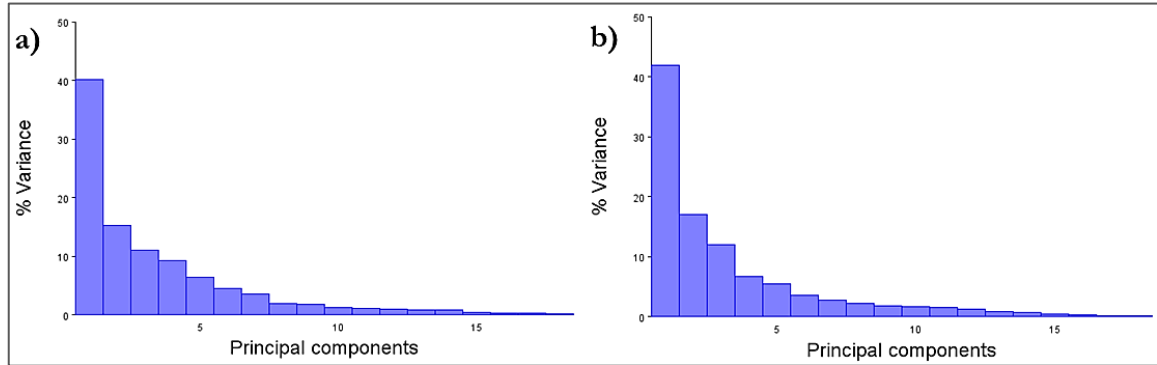


Fig. 5.13 – Istogrammi che riportano le percentuali della varianza totale spiegate da ciascuna PC per le femmine (a) ed i maschi (b) di *M. merluccius*.

Le modifiche della forma connesse alla prima PC sono illustrate in Fig. 5.14 e, per entrambi i sessi, riguardano in generale un inarcamento nel lato dorsale dei campioni. I maggiori cambiamenti sono relativi al landmark n°1, che insieme al n°9 indica un posizionamento della bocca a livello inferiore, così come i punti corrispondenti alla pinna caudale (n° 4, 5 e 6). Al contrario, i landmark presenti nella parte mediana del corpo indicano uno spostamento verso l'alto.

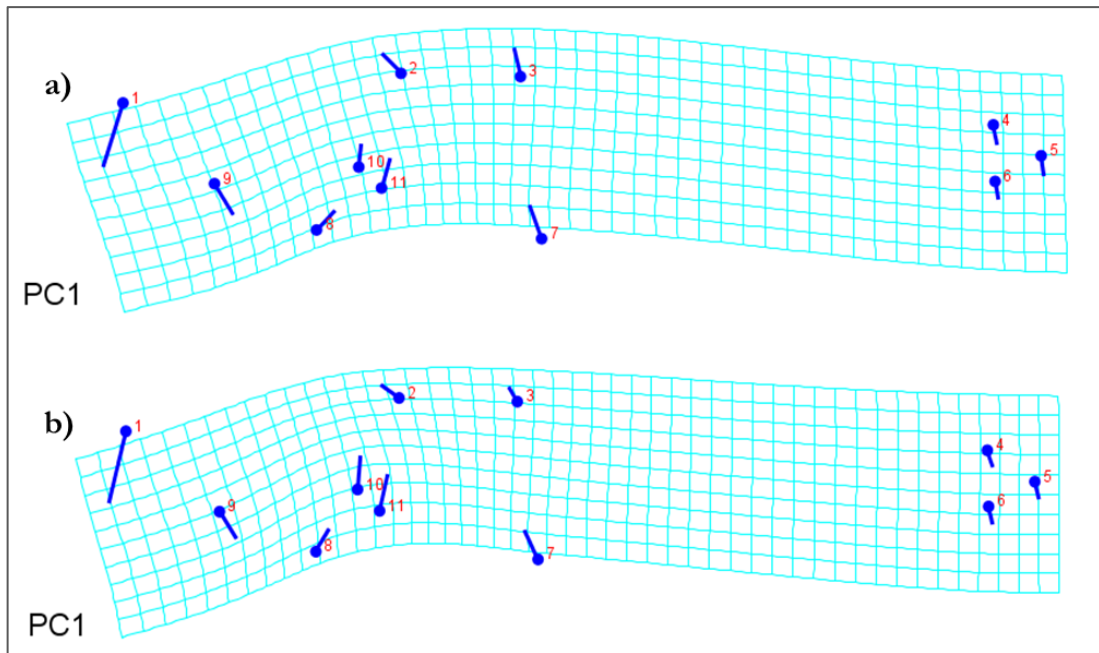


Fig. 5.14 – Grafico che mostra la griglia di trasformazione delle variazioni alla forma connesse alla prima PC per le femmine (a) ed i maschi (b) di *M. merluccius* (scale factor: 0.1 procrustes distance).

L'analisi dello scatterplot delle prime due PC (Fig. 5.15) ha fornito una prima stima del livello di differenziazione dei due gruppi (campioni orientali ed occidentali) all'interno dei campioni suddivisi per sesso. Come mostrato dagli ellissi di confidenza (90% di probabilità) i due campioni risultano sovrapposti per una buona percentuale, in maniera più evidente nel caso delle femmine.

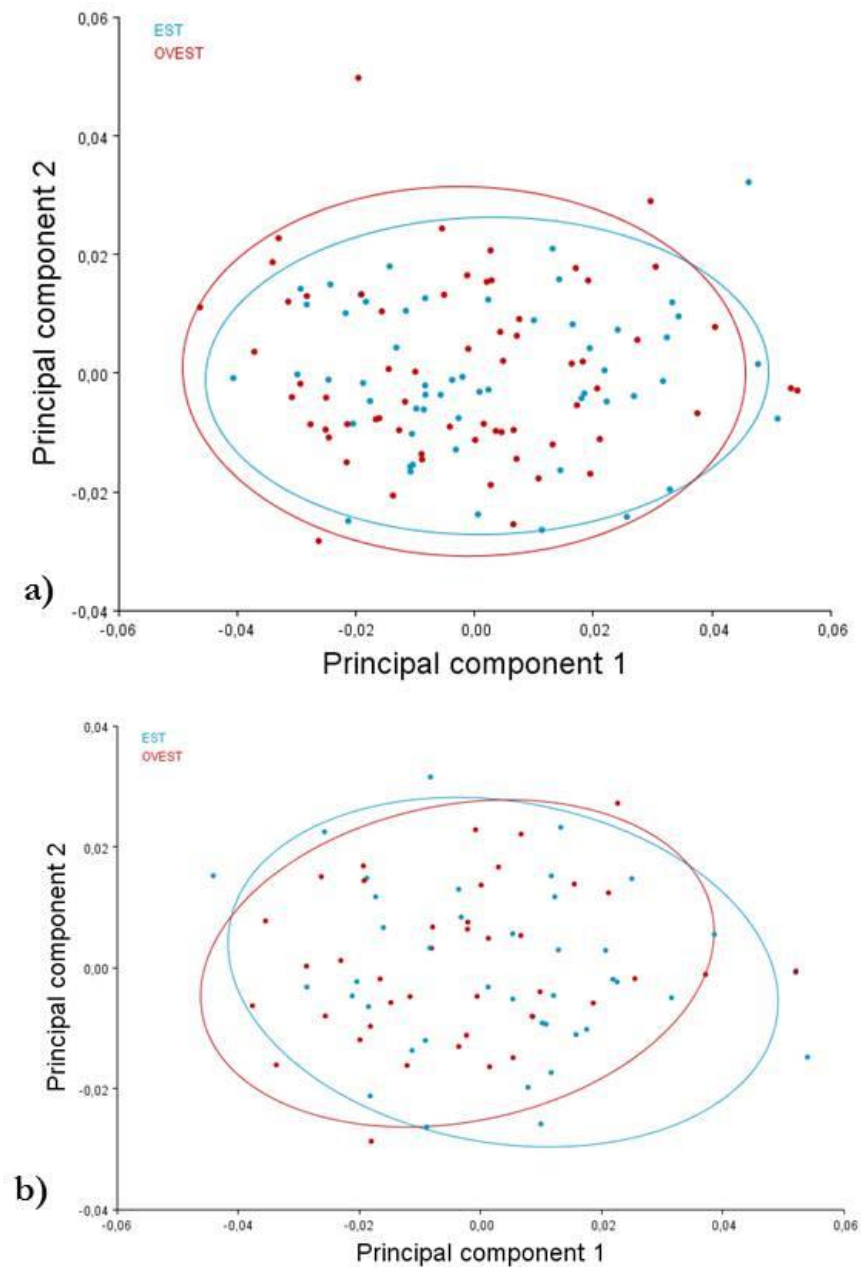


Fig. 5.15 – Scatterplot dei PC *scores* delle prime due PC in termini di variabilità spiegata per le femmine (a) ed i maschi (b) di *M. merluccius*.

La differenziazione è stata tuttavia analizzata più approfonditamente attraverso una DFA per ottenere inoltre una conferma statistica.

L'analisi ha permesso di ottenere il valore di *Procrustes distance* tra i campioni delle due aree che è risultato pari a 0,0113 per le femmine, e 0,0116 per i maschi. Il test *T-square* è stato utilizzato per testare la differenza tra le medie nei due gruppi ed ha fornito un valore

significativo in entrambi i casi ( $T$ -square: 81,93 e 136,2 per femmine e maschi rispettivamente;  $P$ -value<0.001). Inoltre, una conferma della significatività della differenza tra i campioni delle due aree è stata ottenuta anche attraverso il *Permutation test* ( $P$ -value<0.001).

Questi risultati sono riportati in forma grafica nelle Figg. 5.16 e 5.17, nelle quali sono riportati i valori dei *discriminant scores* ottenuti in primo luogo dai dati originali (Fig. 5.16) ed in seguito dal risultato della *cross-validation* (Fig. 5.17) per entrambi i sessi.

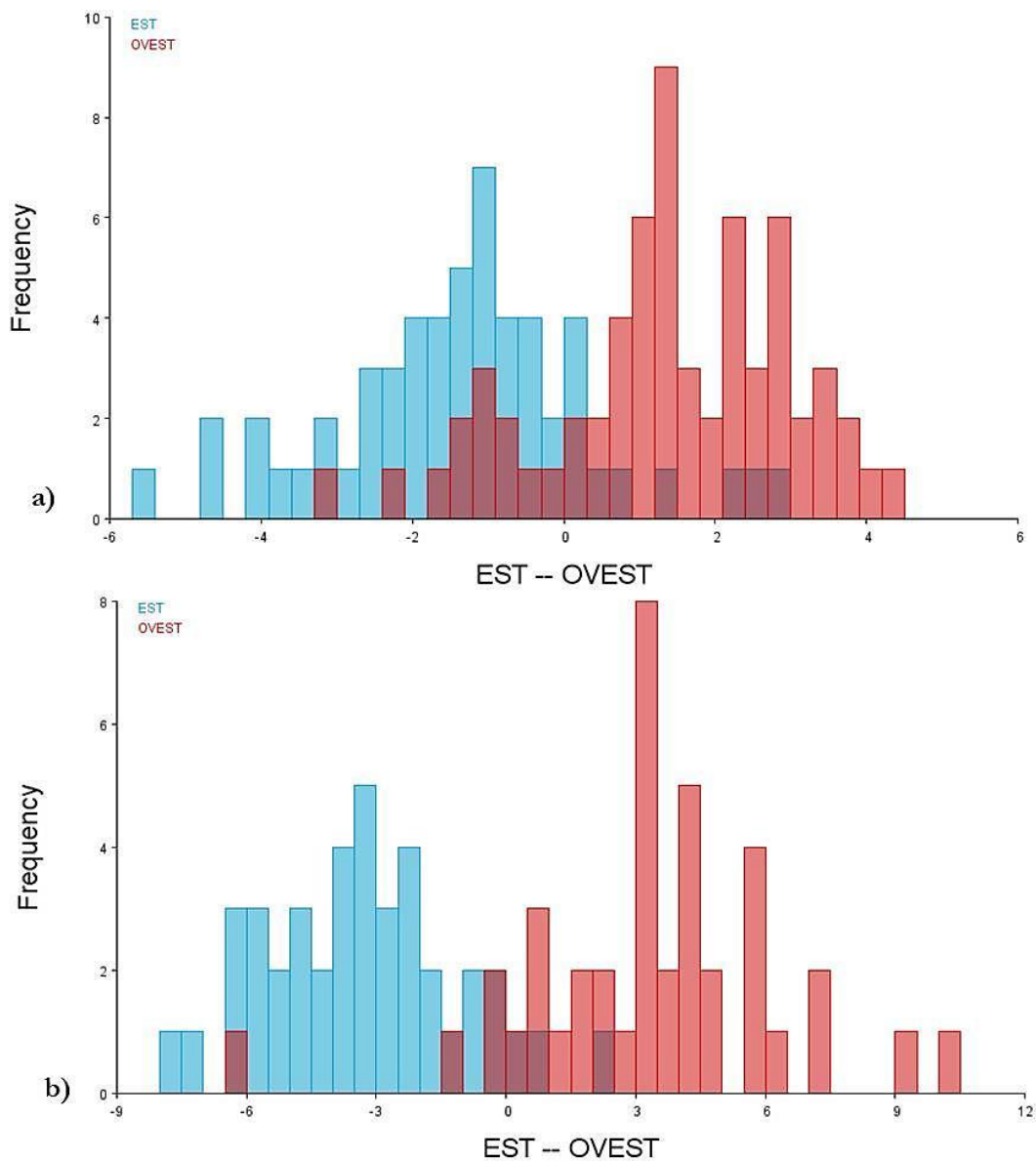


Fig. 5.16 – Istogramma che riporta i valori dei *discriminant scores* ottenuti dai dati originali per le femmine (a) ed i maschi (b) di *M. merluccius*.



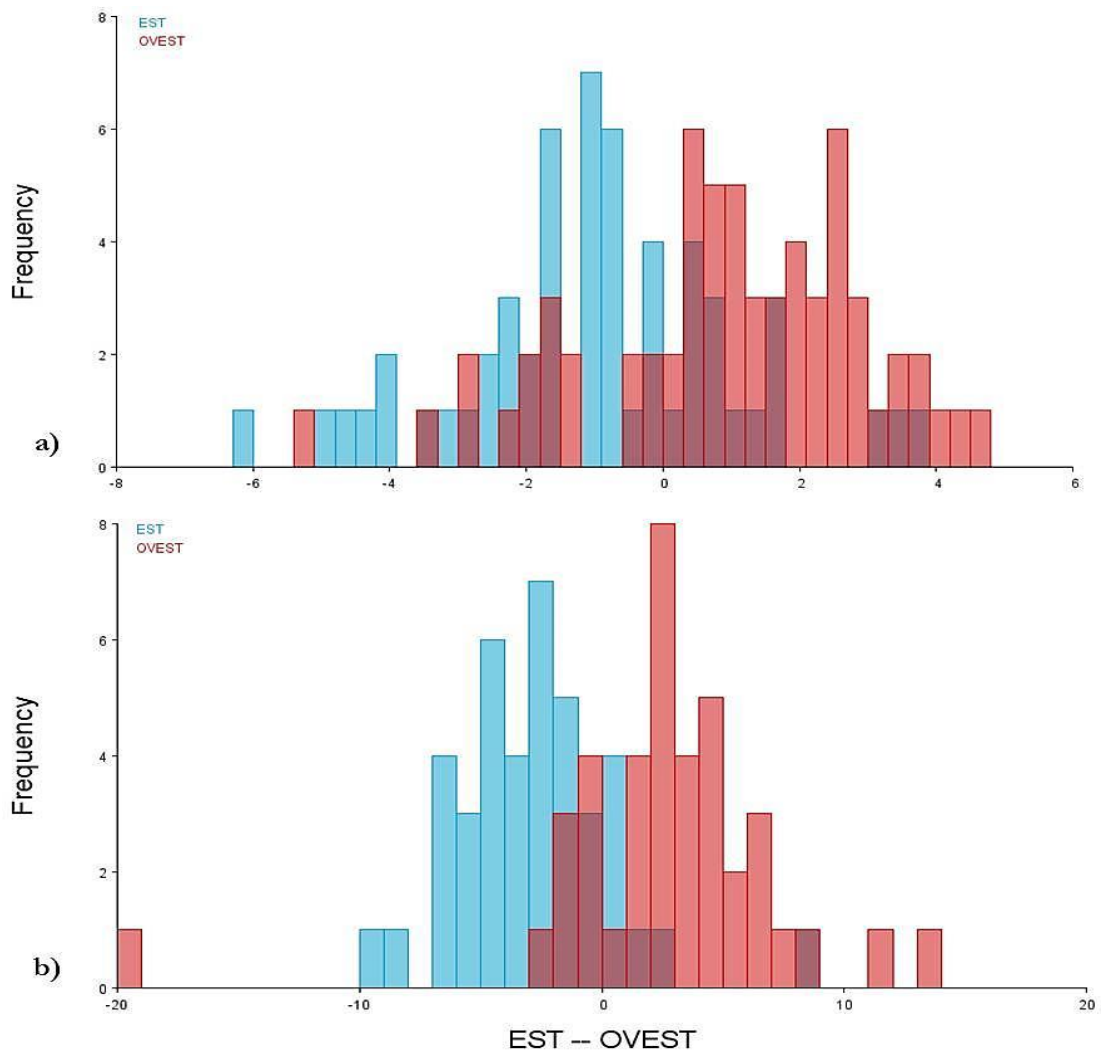


Fig. 5.17 – Istogramma che riporta i *discriminant scores* ottenuti dalla *leave-one-out cross-validation* per le femmine (a) ed i maschi (b) di *M. merluccius*.

Nelle Tabb. 5.3 e 5.4 sono invece riportate le tavole di classificazione tra i due gruppi considerati (per le femmine ed i maschi, rispettivamente), e le corrispondenti percentuali di corretta classificazione. Queste sono risultate piuttosto buone e per le femmine superano l'80% per entrambe le aree (tenendo in considerazione il database completo). Utilizzando i dati ottenuti dalla *cross-validation*, invece il valore è inferiore (71-75%). Nei maschi le percentuali sono risultate maggiori, con valori pari o superiori al 90% nel caso del database completo, mentre se si considera il risultato della *cross-validation* si ottiene un valore che varia dal 77 all'82 %. Per la stima dell'accuratezza del modello predittivo è tuttavia preferibile riferirsi alla seconda stima (Tab. 5.3b).

Tab. 5.3 – Tavole di classificazione (*classification/misclassification tables*) tra i gruppi (costa est e costa ovest della Sardegna) per le femmine ottenute considerando (a) il database completo, oppure (b) i risultati della *cross-validation*.

Gruppi	Assegnati a:		Totale	% Classificazione
	EST	OVEST		
EST	46	10	56	82,1 %
OVEST	12	52	64	81,2 %

Gruppi	Assegnati a:		Totale	% Classificazione
	EST	OVEST		
EST	40	16	56	71,4 %
OVEST	16	48	64	75 %

Tab. 5.4 - Tavole di classificazione (*classification/misclassification tables*) tra i gruppi (costa est e costa ovest della Sardegna) per i maschi ottenute considerando (a) il database completo, oppure (b) i risultati della *cross-validation*.

Gruppi	Assegnati a:		Totale	% Classificazione
	EST	OVEST		
EST	38	3	41	92,6 %
OVEST	4	36	40	90 %

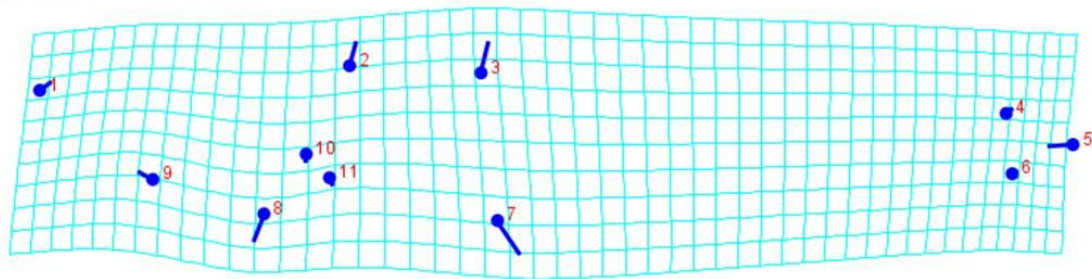
Gruppi	Assegnati a:		Totale	% Classificazione
	EST	OVEST		
EST	34	7	41	82,9 %
OVEST	9	31	40	77,5 %

Infine, attraverso la griglia di trasformazione riportata in Fig. 5.18, è possibile valutare la variazione di forma che è stata rilevata tra i campioni della costa orientale e quelli della costa occidentale. L'immagine mostra come tendenzialmente i campioni della costa ovest siano caratterizzati da un corpo più largo nella parte mediana, e questa differenza sia più accentuata nell'area addominale. L'espansione maggiore dell'area addominale è più evidente nel caso delle femmine, al contrario i maschi mostrano uno spostamento verso l'alto dei *landmarks* corrispondenti alla bocca (n° 1 e 9), meno marcato nelle femmine.

Inoltre, dalla varianza in corrispondenza del *landmark* n°5 presente per entrambi i sessi è possibile ipotizzare la presenza di un peduncolo caudale più breve nella costa occidentale rispetto a quella orientale. Nessuna differenza sarebbe invece riscontrabile al livello delle pinne pettorali.

E' necessario tuttavia considerare che il fattore di scala nell'immagine è stato incrementato per permettere una migliore visualizzazione delle variazioni di forma, le quali risultano in realtà molto contenute.

a) EST -- OVEST



b) EST -- OVEST

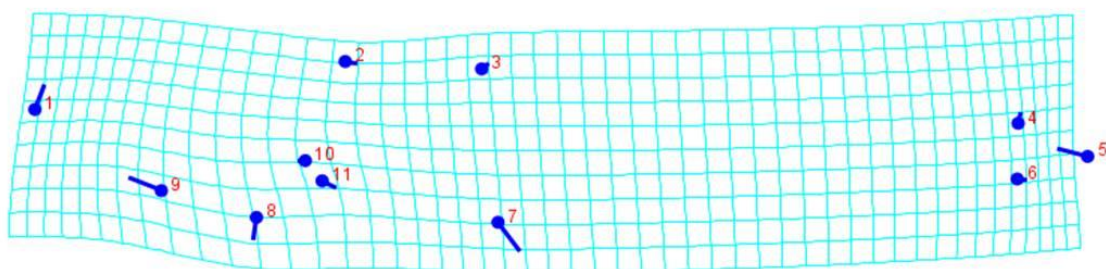


Fig. 5.18 – Schema rappresentante la variazione di forma tra le due aree analizzate nel caso delle femmine (a) e dei maschi (b) di *M. merluccius*. I punti corrispondono al primo gruppo (*costa est*) mentre la linea mostra l'ampiezza e la direzione della variazione di forma nel secondo gruppo (*costa ovest*). Il fattore di scala è stato impostato su 5 per una migliore visualizzazione.

## 5.4 Discussione

I risultati ottenuti attraverso le analisi di morfometria geometrica presentate in questo capitolo hanno permesso di acquisire diverse informazioni riguardo ai pattern di variabilità presenti nella morfologia della specie nei mari sardi.

In primo luogo, è stata evidenziata la presenza di una relazione allometrica significativa, sebbene di piccola entità, tra la taglia degli individui e la loro forma.

Un'altra informazione ricavata nel corso di queste analisi è il fatto che vi sia un certo grado di dimorfismo sessuale nella specie *M. merluccius*, almeno per quanto riguarda la zona di studio, ossia i mari circostanti la Sardegna.

Prendendo invece in considerazione l'obiettivo principale di questo studio, cioè l'analisi della variabilità della forma degli individui tra le due coste, una valutazione visiva preliminare è stata ottenuta attraverso la PCA, ed ha mostrato un pattern in grande misura sovrapposto per i campioni delle due coste, indicando una certa omogeneità di forma. Una differenziazione leggermente più marcata è stata riscontrata durante il confronto tra i maschi delle due coste, ma anche in questo caso i punti sono risultati sovrapposti in larga misura.

Tuttavia, il test più approfondito effettuato attraverso la DFA ha rilevato in realtà una differenza significativa, seppure non particolarmente elevata, tra la forma degli individui delle due coste. I valori di distanza rilevati tra le aree (*Procrustes distance*: 0,0113 per le femmine e 0,0116 per i maschi) risultano vicini, seppure minori, ad alcuni di quelli rilevati da Sequeira *et al.* (2011) nell'ambito di uno studio sulla variabilità della specie *Helicolenus dactylopterus* nell'Oceano Atlantico (Tab. 5.5).

Tab. 5.5 – *Procrustes distances* tra le forme medie di *H. dactyloperus* dalle diverse aree studiate. Ciascuna differenza è risultata statisticamente significativa ( $P\text{-value} < 0.01$ ), da Sequeira *et al.* (2011).

Area	Azores	Galicia	Madeira
<b>Galicia</b>	0.0181	-	-
<b>Madeira</b>	0.0322	0.0391	-
<b>Peniche</b>	0.0203	0.0197	0.0328

Una certa differenza tra le due aree viene evidenziata anche dalle tavole di classificazione, che mostrano una buona percentuale di corretta riclassificazione al campione di origine per entrambe le aree, che possono essere quindi discriminate facilmente. Anche attraverso queste analisi, i maschi sembrano differenziarsi maggiormente tra le due coste rispetto alle femmine.

Alcune delle differenze riscontrate tra le due aree nell'ambito di questo studio potrebbero essere connesse a diverse funzioni biologiche, ad esempio è noto che variazioni nella posizione della bocca e della forma della testa sono associate con l'ecologia trofica (Costa e Cataudella, 2007), oppure che le differenze nell'ampiezza dell'addome possono riflettere diversi investimenti energetici, differente nutrizione oppure condizione di spawning (Armstrong e Cadrin, 2001).

Le differenze morfologiche tuttavia, se non supportate da risultati ottenuti da diverse metodiche, potrebbero non essere sufficienti per affermare l'esistenza di una separazione tra stocks. Piccole variazioni di forma possono infatti essere dovute alla variabilità ambientale, senza tuttavia implicare una differenziazione nei parametri biologici della popolazione (accrescimento, fecondità ecc.) che hanno rilevanza per l'applicazione dei modelli di dinamica di popolazione (Tudela, 1999).

Come già citato, una conclusione simile è stata tratta, ad esempio, da Levi *et al.* (2004) proprio relativamente alla specie *M. merluccius*. Gli autori hanno infatti considerato che le differenze morfometriche riscontrate tra gli individui nelle due aree fossero dovute esclusivamente alle differenti influenze ambientali subite dagli individui nelle prime fasi di vita, ma che lo spostamento tra le aree degli adulti determinasse comunque una certa omogeneità della popolazione.

La presenza di una differenziazione tra la morfometria di questa specie nelle due aree potrebbe essere comunque un'indicazione della propensione di questa specie a rimanere tendenzialmente all'interno degli areali d'origine, ma non risulta sufficiente per affermare una netta separazione tra le aree studiate.

Questi risultati costituiscono inoltre una base di partenza per eventuali analisi future, considerata la scarsa applicazione delle tecniche della morfometria moderna per lo studio delle popolazioni di nasello. Ad esempio, effettuando analisi mirate sulla porzione più giovane della popolazione (difficilmente campionabile attraverso la rete a strascico) si potrebbe ottenere un'indicazione più precisa sull'entità della variabilità geografica dovuta alla variabilità ambientale nelle prime fasi di vita.

Un altro interessante spunto sarebbe l'associazione delle analisi di morfometria geometrica a quelle della forma degli otoliti, già testata con successo da Torres *et al.* (2000) per la discriminazione degli stock di questa specie. Ampliando l'areale di studio all'area centro-occidentale del bacino del Mediterraneo, sarebbe inoltre possibile confrontare la variabilità riscontrata nei mari sardi nel presente lavoro con quella di aree più distanti, per evidenziare qualora la morfologia della specie si differenzi in questo caso in maniera più marcata.

# 6. Parassitologia

---

## 6.1 Introduzione

L'ultima metodica che è stata utilizzata nell'ambito di questo studio per investigare la variabilità presente nelle popolazioni di nasello delle acque sarde è quella della parassitologia.

Il principio che sta alla base dell'uso dei parassiti come marche biologiche negli studi sulle popolazioni ittiche è il fatto che i pesci possono venire parassitati solo quando si trovano all'interno dell'area endemica di quella particolare specie parassita. Per area endemica si intende quella regione geografica nella quale le condizioni sono adatte alla trasmissione del parassita, includendo anche i fattori biotici, come la presenza di altri ospiti essenziali per il completamento del ciclo vitale del parassita, ed i fattori abiotici, come la temperatura e la salinità (Cadrin *et al.*, 2013).

Le procedure che utilizzano marche artificiali per l'identificazione degli stock, comportano la manipolazione intensa di pesce con concomitante stress e pericolo per la sopravvivenza dei pesci oggetto di studio. I marcatori biologici possono invece fornire una migliore alternativa all'utilizzo delle marche artificiali per studi di popolazione di specie sensibili, o difficili da liberare come quelle pescate in acque profonde. Campionamenti di routine ed esami parassitologici sono più economici rispetto alla sperimentazione di marche specializzate, e l'uso di parassiti che non hanno effetti patologici rilevabili assicura che l'approccio biologico sia più affidabile e meno suscettibile di errori.

Tutti i parassiti sfruttano l'ospite per la loro crescita, sopravvivenza e riproduzione. Il ciclo di vita del genere *Anisakis*, uno dei taxon di parassiti utilizzati nel nostro studio come marcatori biologici, comprende non solo l'ospite definitivo, ma anche tutta una serie di ospiti intermedi/paratenici che sono di vitale importanza per la sopravvivenza del parassita e per il compiersi del suo ciclo biologico. Conseguenza di ciò è che tutti gli ospiti devono trovarsi congiuntamente in una comunità trofica di struttura stabile. La maggior parte dei parassiti sono specifici di una specie ospite o di un gruppo di ospiti strettamente correlati e lo stesso vale per le loro fasi larvali. Ad esempio, i diversi stadi larvali di *Anisakis* corrispondono a specie diverse di ospiti intermedi e definitivi. Ogni ospite è specifico per il

completamento del ciclo di vita del parassita, infatti, se infetta l'ospite "sbagliato" il parassita muore o comunque non si ha un ulteriore sviluppo del suo stadio. Contemporaneamente il parassita può causare seri problemi all'ospite accidentale.

I parassiti sono utilizzati dal 1940 come indicatori biologici, tag, o marcatori in grado di fornire informazioni sui diversi aspetti della biologia delle specie parassitate, compresa la caratterizzazione degli stock, il monitoraggio delle migrazioni, il comportamento alimentare e la sistematica e filogenesi dei pesci ospitanti.

I parassiti marini sono sempre più spesso utilizzati anche negli studi sugli ecosistemi marini come indicatori biologici di stabilità delle catene trofiche, dello stato di salute dell'ambiente, di cambiamenti climatici.

Per valutare lo stato degli stock di diverse specie di animali marini attualmente sfruttate in commercio vengono utilizzati micro e macroparassiti che, nell'ambito di un approccio multidisciplinare, possono contribuire a dare valide risposte che vengono integrate da quelle ottenute ad esempio attraverso i marcatori genetici o analisi morfometriche.

Per essere considerati un efficiente marca biologica, un parassita nematode deve rispettare alcuni criteri fondamentali (Sinderman 1961, 1983; Kabata 1963; MacKenzie 1983,1987; Leaman e Kabata 1987):

1. Il parassita deve avere diversi livelli di infezione nell'ospite soggetto in diverse parti dell'area di studio. Gli studi sui tag biologici si basano di solito sulla prevalenza e/o intensità media di infezione tra i campioni.

2. Il parassita deve avere una durata di vita, o restare in forma identificabile nell'ospite, abbastanza a lungo per coprire i tempi di indagine.

3. Il parassita deve essere facilmente e rapidamente individuabile.

4. Il parassita non dovrebbe avere effetti patologici marcati sull'ospite.

Tuttavia vi sono alcune limitazioni nell'uso di parassiti come marche biologiche delle popolazioni ittiche (Sinderman 1961; Leaman e Kabata 1987):

1. Ciò che rende i parassiti utili per l'identificazione degli stock è la composizione della popolazione del parassita, che a sua volta, è una variabile dinamica che cambia



stagionalmente. Pertanto è importante conoscere se le differenze nella distribuzione del parassita sono in linea tutto l'anno.

2. L'intensità di infezione può cambiare in base alla latitudine, così come il numero ed il tipo di parassiti, a causa delle influenze della temperatura o di altri fattori fisici sulla fauna parassitaria.

3. La distribuzione del parassita può riflettere le variazioni nella distribuzione o abbondanza di ospiti intermedi, piuttosto che degli ospiti in fase di studio.

4. Possono esistere a lungo termine fluttuazioni dell'abbondanza parassita che non vengono rilevati in studi a breve termine. (Mosquera *et al.*, 2003).

Generalmente, le larve di nematodi Anisakidi ed in particolare il genere *Anisakis* soddisfano tutti questi criteri.

Per questo motivo, e poiché sono tra le specie parassite più comuni e diffuse nei teleostei, sono probabilmente i più utilizzati per studi di identificazione degli stock (Chenoweth *et al.*, 1986; Mattiucci *et al.*, 2004, 2008; MacKenzie *et al.*, 2008, 2013; Sequeira *et al.*, 2010).

I nematodi *Anisakis* sono stati infatti utilizzati per la caratterizzazione di stock di specie ittiche, sia demersali che pelagiche, molto importanti dal punto di vista commerciale. L'identificazione con marcatori genetici ha permesso di individuare la presenza di diverse specie biologiche di *Anisakis* che mostrano frequenze relative significativamente diverse in campioni ittici mediterranei ed atlantici raccolti in località comprese nei loro areali. La distribuzione di diverse specie di *Anisakis* in popolazioni di pesci di diversa origine geografica, dimostra come questi parassiti possano essere utili "biological tags" delle migrazioni e della vagilità dei loro ospiti.

La concordanza tra i dati sulle specie di *Anisakis* identificate e quelli genetici (valori di differenziamento genetico, flusso genico, etc) e biologici, ottenuti sulle stesse specie ospiti, ha per esempio indicato l'esistenza di stock distinti in alcune specie, tra le quali *T. trachurus* (Mattiucci *et al.*, 2008; McKenzie *et al.*, 2008), *M. merluccius* (Mattiucci *et al.*, 2004; Valero *et al.*, 2006), *Xiphias gladius* (Mattiucci *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2010) nonché ospiti cefalopodi (Pascual e Hochberg, 1996; Catalano *et al.*, 2013).

Il nematodi della famiglia Anisakidae appartengono all'ordine Ascaridida, superfamiglia Ascaridoidea. Essa comprende, tra gli altri, i generi: *Anisakis*, Dujardin 1845; *Hysterothylacium*, Ward & Magath 1917; *Pseudoterranova*, Mosgovoy 1950; e *Contracaecum* Railliet & Henry, 1912. Tutti questi parassiti hanno cicli biologici che coinvolgono come ospiti definitivi pesci teleostei e/o animali a sangue caldo come mammiferi marini e uccelli ittiofagi.

Gli Anisakidae presentano tutte le caratteristiche tipiche dei nematodi : il corpo è cilindrico e vermiforme, a sezione circolare, che ben si differenzia da quello dei platelminti (vermi piatti). Quelli del genere *Anisakis* hanno dimensioni medio-grandi: le forme più frequentemente osservabili sono le larve al 3° stadio di sviluppo, che hanno cromia biancastra o rosata, sono lunghe 1-2 cm e sono visibili ad occhio nudo nella cavità viscerale dei pesci, dove spesso si presentano raggomitolate su se stesse.

La sistematica e la filogenesi degli Anisakidi, come quella di tutti gli Ascarididi, si sono fondate per molto tempo esclusivamente su caratteristiche morfologiche o dei cicli biologici dei distinti gruppi. Analisi molecolari recenti, in particolare quelle combinate su DNA mitocondriale (mtDNA) e DNA ribosomale (rDNA), sembrerebbero indicare l'esistenza di due famiglie ad origine monofiletica, Anisakidae e Raphidascarididae (Murrell & Fried, 2007). Tuttavia, gli studi molecolari più recenti che si concentrano al livello di specie prendono come punto di riferimento la classificazione su base morfologica di Hartwich (1974) che si riferisce soprattutto alla struttura del sistema secretore-escretore (Tab. 6.1):

Tab. 6.1 – Inquadramento sistematico della Famiglia Anisakidae e delle sue tre sottofamiglie secondo Hartwich (1974).

<b>Phylum</b>	Nematoda
<b>Classe</b>	Secernentea
<b>Ordine</b>	Ascaridida
<b>Famiglia</b>	Anisakidae
• <b>Sottofamiglia</b>	Anisakinae
<b>Genere</b>	<i>Anisakis</i> , <i>Contracaecum</i> , <i>Pseudoterranova</i>
• <b>Sottofamiglia</b>	Raphidascaridinae
<b>Genere</b>	<i>Hysterothylacium</i> , <i>Raphidascaris</i>
• <b>Sottofamiglia</b>	Goezinae
<b>Genere</b>	<i>Goezia</i>

### 6.1.1 Classificazione tassonomica del genere *Anisakis* su base morfologica

Nel caso degli anisakidi l'identificazione morfologica a livello di specie degli esemplari allo stadio larvale è un compito estremamente difficile. Infatti le caratteristiche tassonomiche principali come l'apparato boccale, le spicole (nei maschi), il numero e la posizione delle papille post-anali (nei maschi) si rilevano esclusivamente nello stadio adulto. Le larve hanno a loro volta strutture che non sono presenti nello stadio adulto. Quelle al 3° stadio, che possono essere genericamente identificate con la descrizione morfologica effettuata da Grabda (1976) possiedono ad esempio un dente perforatore posto anteriormente sul labbro ventrale, una struttura acuminata (*mucron*) terminale nella coda ed altre caratteristiche che scompaiono con la metamorfosi (Mattiucci, 2010).

Queste larve solitamente si trovano nella cavità addominale dei pesci ospiti avvolte a spirale, incistate nella membrana peritoneale o sotto quest'ultima (Fig. 6.1). Molto spesso si trovano lungo l'intestino dell'ospite, sulle gonadi o sul fegato (Fig. 6.2) In alcuni casi non sono incistate ma sono libere con la loro estremità anteriore nei muscoli ventrali e quella

posteriore sporgente nella cavità corporea del pesce (Fig. 6.3). Inoltre possono essere interamente circondate dal tessuto muscolare.



Fig. 6.1 – Larve di *Anisakis* di Tipo I incistate nella membrana peritoneale di un esemplare di *M. merluccius*.

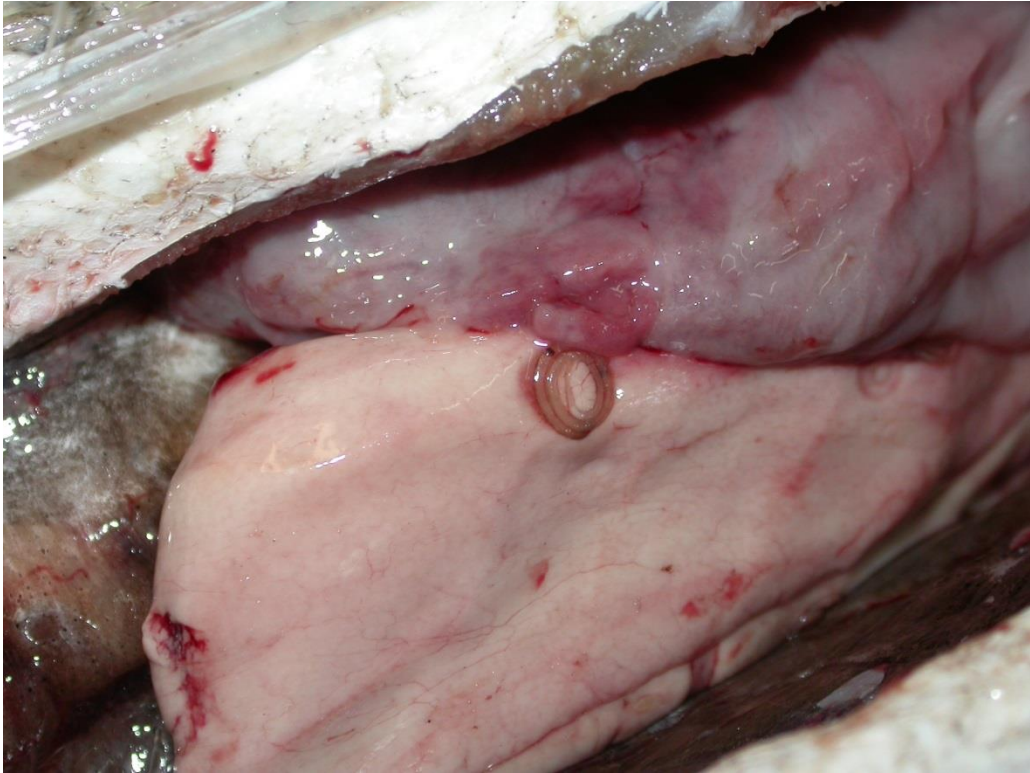


Fig. 6.2 – Larva di *Anisakis* (Tipo I) aderente alla superficie del fegato di un esemplare di *M. merluccius*.



Fig. 6.3 – Larva di *Anisakis* (Tipo I) incistata parzialmente nella muscolatura ventrale dell'ospite (*M. merluccius*).

Circa 2 mm dietro la “testa” larvale è presente il ventricolo, che allo stereomicroscopio appare come una macchia bianca chiaramente visibile. La lunghezza delle larve varia tra 19-28 mm, la parte centrale del corpo è larga 0,3-0,5 mm. La cuticola è plicata e mostra una delicata striatura trasversale. Un dente perforante è posto dorsalmente in cima alla testa nella quale possiamo distinguere 3 labbra poco sviluppate, una dorsale e due ventro-laterali (Fig. 6.4). Tra le labbra ventro-laterali, quelle più piccole, leggermente al di sotto del dente, è visibile un poro escretore dal quale sbocca un canale escretore che ha origine da una singola cellula ghiandolare escrettrice.

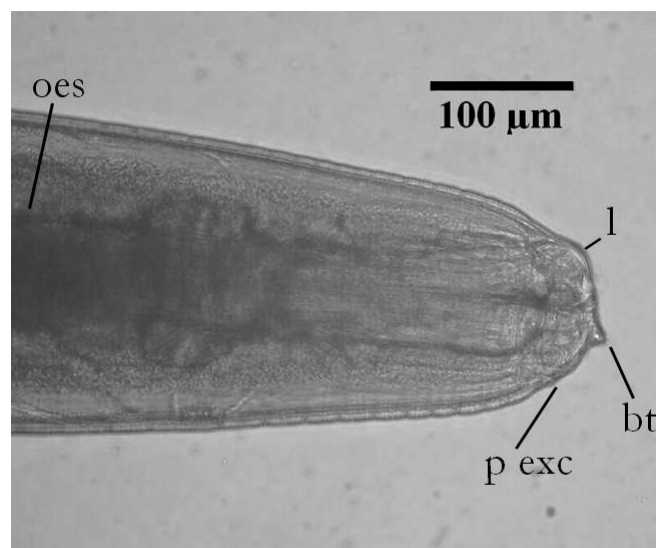


Fig. 6.4 – Porzione anteriore (cefalica) di una larva del genere *Anisakis*. (bt) dente perforatore, (l) labbra, (oes) esofago, (p exc) poro escretore.

L'esofago è un grosso canale costituito da pareti muscolari disposte a raggiera e cellule ghiandolari, con grandi nuclei, che sono connesse tra di loro. Il lume dell'esofago è triraggiato e rivestito da uno spesso strato cuticolare. Al di sotto, a livello della parte ghiandolare è presente il ventricolo, con lume sempre triraggiato, che è unito obliquamente con l'intestino. L'intero tratto digestivo ha in questa fase uno stretto lume fessurato.

Il retto costituisce un breve canale obliquo all'ano, con uno spesso strato cuticolare. Tre grosse cellule piriformi, le ghiandole rettali, sono raggruppate intorno al retto. La coda è corta, conica o con una punta arrotondata e fornita di un processo spiniforme detto *mucron*.

Il sistema nervoso è intraepiteliale. L'esofago è circondato da un anello nervoso, o ganglio periesofageo.

Le larve del genere *Anisakis* sono prive di caratteri morfologici distintivi per la loro identificazione a livello specifico ma risultano distinguibili in due tipi principali, secondo la classificazione proposta da Berland (1961) e basata su caratteri morfologici osservabili al microscopio ottico (Fig. 6.5):

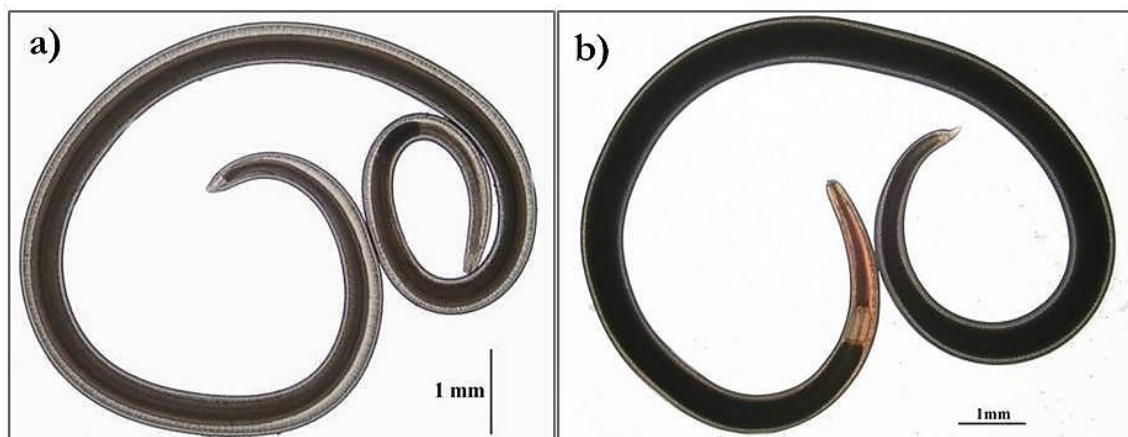


Fig. 6.5 – Microfotografie di due larve al terzo stadio di *Anisakis* Type I (a) e Type II (b).

- **Larve di 3° stadio di Tipo I:** in esse la porzione muscolare dell'esofago è seguita da una porzione ghiandolare (ventricolo) più lunga rispetto al Tipo II (Fig. 6.6), e dalla presenza della particolare appendice caudale acuminata chiamata *mucron*.

- **Larve di 3° stadio di Tipo II:** rispetto a quelle di Tipo I mostrano un ventricolo più corto (Fig. 6.7), quasi quadrangolare, mentre si nota la mancanza del *mucron* nell'estremità caudale della larva, che si presenta di forma conica.



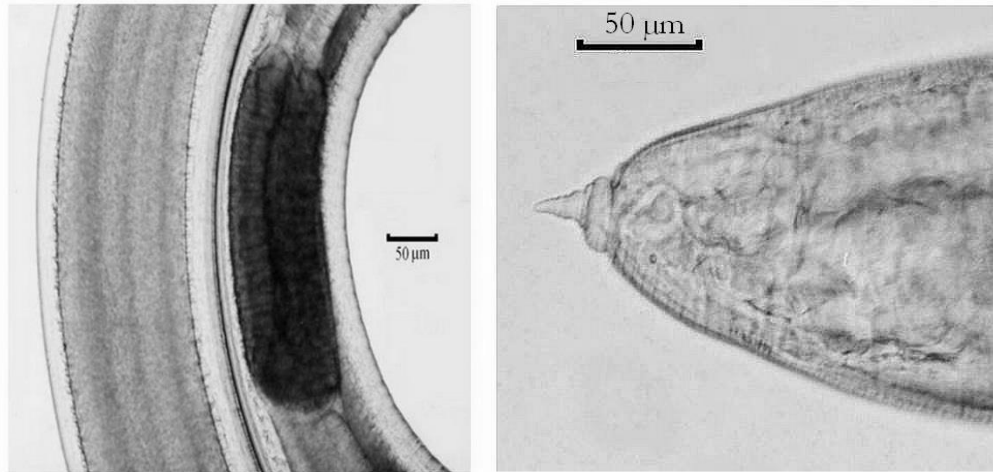


Fig. 6.6 - Ventricolo e porzione caudale con *mucron* di *Anisakis* sp. Type I

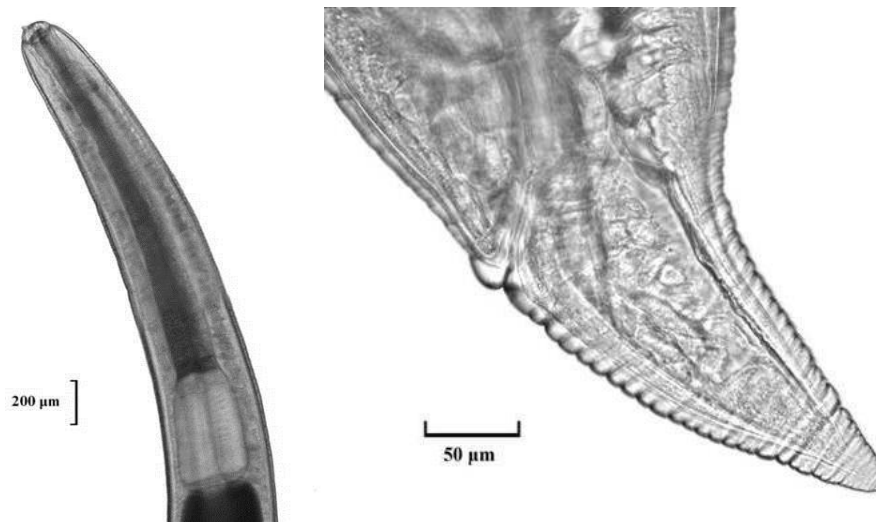


Fig. 6.7 - Ventricolo e porzione caudale conica di *Anisakis* sp. Type II

Allo scopo di identificare le larve di *Anisakis* a livello di specie sono state sviluppate tecniche basate sull'utilizzo di marcatori genetici forniti dall'elettroforesi multi locus (Multilocus Allozyme Electrophoresis, MAE) e sull'analisi delle sequenze del gene della *cox-2* del DNA mitocondriale. Diversi studi hanno dimostrato che alle larve Type I (sensu Berland, 1961) corrispondono sei specie gemelle (sibling species) del complesso *A. simplex* e che alle larve Type II corrispondono tre specie del gruppo *A. physeteris* (Tab. 6.2)



Tab. 6.2 – Corrispondenza tra morfotipi larvali di *Anisakis* e complessi di specie gemelle identificate mediante morfologia e/o marcatori genetici

Morfotipo	Specie identificate	Riferimento
<b>Type I (<i>A. simplex</i> complex)</b>	<i>A. simplex</i> s.s.	(Rudolphi, 1809)
	<i>A. pegreffii</i>	Campana-Rouget & Biocca, 1955
	<i>A. berlandi</i>	Mattiucci <i>et al.</i> , 2014
	<i>A. typica</i>	Diesing, 1860
	<i>A. ziphidarum</i>	Paggi <i>et al.</i> , 1988
	<i>A. nascettii</i>	Mattiucci <i>et al.</i> , 2009
<b>Type II (<i>A. physeteris</i> complex)</b>	<i>A. physeteris</i>	(Baylis, 1923)
	<i>A. brevispiculata</i>	Dollfus, 1966
	<i>A. paggiae</i>	Mattiucci <i>et al.</i> , 2005

La specie maggiormente presente nel Mar Mediterraneo, sia nei bacini occidentali che in quelli orientali è *A. pegreffii*, tale abbondanza può essere spiegata dalla presenza, in queste acque, di delfini come il *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821), uno dei suoi principali ospiti definitivi. La diffusione *A. pegreffii* si estende attraverso l'Oceano Atlantico fino alla Penisola Antartica, fino alle acque giapponesi e cinesi (Fig. 6.8). (Kuhn *et al.*, 2011).

Riguardo allo stesso morfotipo larvale, la specie *A. simplex* (s.s.) è stata riscontrata quasi esclusivamente nel settore occidentale del Mediterraneo in alcuni pesci pelagici, come ad esempio *Scomber scombrus* L., *Thunnus thynnus* L. e *T. trachurus*. (Mattiucci *et al.*, 2008; Nascetti *et al.*, 1986) Essa è presente principalmente nell'emisfero settentrionale, nell'Atlantico Occidentale e in quello Orientale e Oceano Pacifico (Kuhn *et al.*, 2011).

Riguardo al morfotipo larvale II, la specie maggiormente presente in Mediterraneo è *A. physeteris*, il cui ospite definitivo è il capodoglio *Physeter macrocephalus* L.. Le larve di *A. physeteris* sono inoltre tipiche di ospiti paratenici epipelagici del Mediterraneo e dell'Oceano Atlantico.

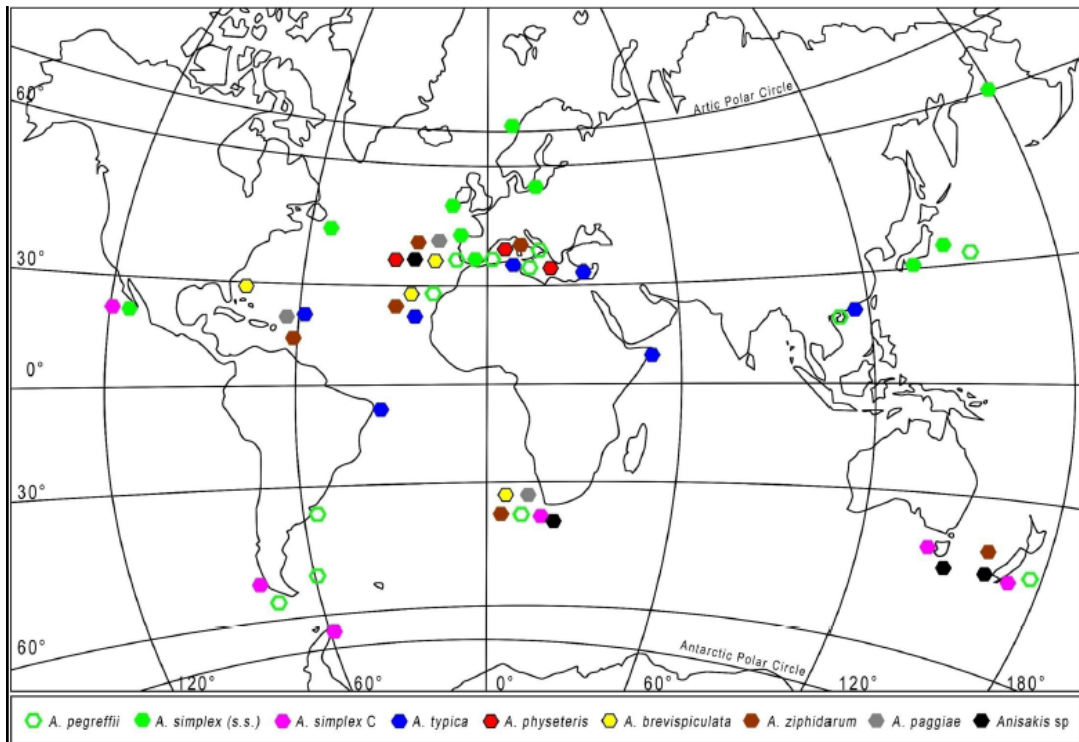


Fig. 6.8 - Distribuzione geografica di *Anisakis* spp. geneticamente individuate (Mattiucci, 2010). Nota: *A. simplex* C = *A. berlandi* (Mattiucci *et al.*, 2014)

### 6.1.2 Morfologia delle larve del genere *Hysterothylacium*

Le larve di *Hysterothylacium* sono di colore biancastro, nella maggior parte dei casi sono più piccole di quelle di *Anisakis* e di aspetto proporzionalmente più filiforme, inoltre generalmente non sono disposte a spirale sugli organi parassitati. Il poro escretore è posto al livello dell'anello nervoso. Invece che un ventricolo semplice, in questo genere è presente un cieco intestinale opposto ad un appendice ventricolare. L'estremità anteriore presenta tre labbra nessuna delle quali dotata di dente perforatore, mentre in esse sono visibili delle papille globulari (Fig. 6.9). La porzione caudale è sub-conica e nelle larve al terzo stadio porta una minuta spina, mentre in quelle al quarto stadio le spine sono numerose e determinano una configurazione "a cactus" (Køie, 1993; Moravec, 1994).

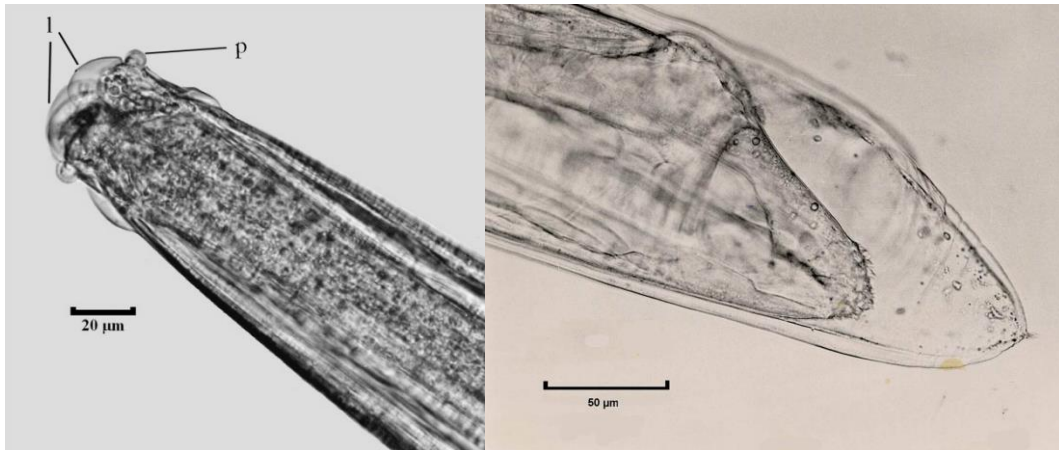


Fig. 6.9 – Estremità anteriore (sn) e posteriore (dx) di una larva del genere *Hysterothylacium* in muta dallo stadio L3 a quello L4. Si noti la vecchia cuticola in distacco che rende visibile la terminazione a “cactus” della nuova. (p) papille; (l) labbra.

### 6.1.3 Ciclo Biologico

Gli Anisakidi appartenenti al genere *Anisakis* hanno come ospite definitivi i cetacei (balene e delfini), mentre quelli appartenenti al genere *Hysterothylacium* si ritrovano in teleostei predatori.

Il ciclo biologico del genere *Anisakis* (Grabda, 1976; Audicana e Kennedy, 2008) (Fig. 6.10) si compie a partire da uova disperse in acqua con le feci degli ospiti definitivi, per poi proseguire con l'alternarsi di 4 stadi larvali fino ad arrivare alla forma adulta. La localizzazione naturale del parassita adulto è il tratto gastrointestinale di mammiferi marini o uccelli. Le uova embrionano in ambiente acquatico. La prima muta avviene nell'uovo nel quale evolve una larva al 2° stadio che ha capacità infestante.

Le larve L2 possono rimanere nell'uovo oppure liberarsi nell'acqua, dove vengono ingerite dal primo ospite intermedio che è rappresentato dai crostacei planctonici (Eufausiacei) nei quali il parassita evolve sino al terzo stadio (L3). Questo stesso stadio, attraverso la predazione del crostaceo, si trasmette senza mutare ulteriormente a un pesce teleosteo o un cefalopode, che costituiscono l'ospite paratenico o di trasporto di *Anisakis*. La larva permane in questo stadio attraverso diverse predazioni nello stesso livello trofico, fino a che l'ospite paratenico è preda di un delfino o di un capodoglio, ove subisce le ultime due mute, e dopo lo stadio L4 raggiunge lo stadio adulto.

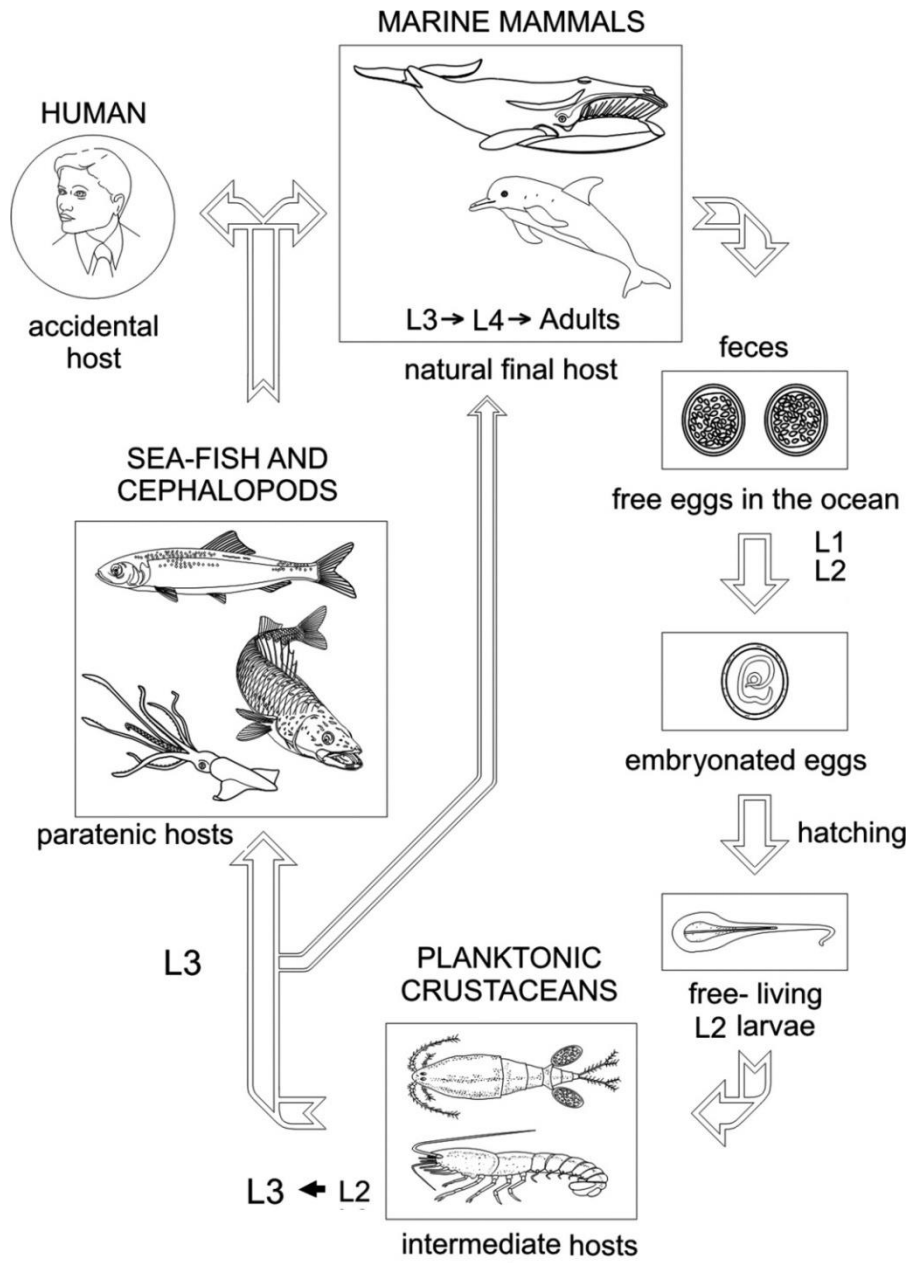


Fig. 6.10 – Ciclo biologico di *Anisakis* spp. (Audicana e Kennedy, 2008)

Il ciclo di *Hysterothylacium* spp. (Fig. 6.11) si svolge in maniera simile, ma in un numero variabile di due-quattro ospiti per il fatto che le larve L3 si possono trasformare prima in L4 e poi in adulti nel tratto intestinale dell'ospite definitivo, oppure soltanto in L4 nella cavità viscerale del teleosteo che funge da secondo ospite intermedio, oppure trasferirsi come L3 attraverso un ulteriore ospite paratenico (Køie, 1993; Gonzalez, 1998).

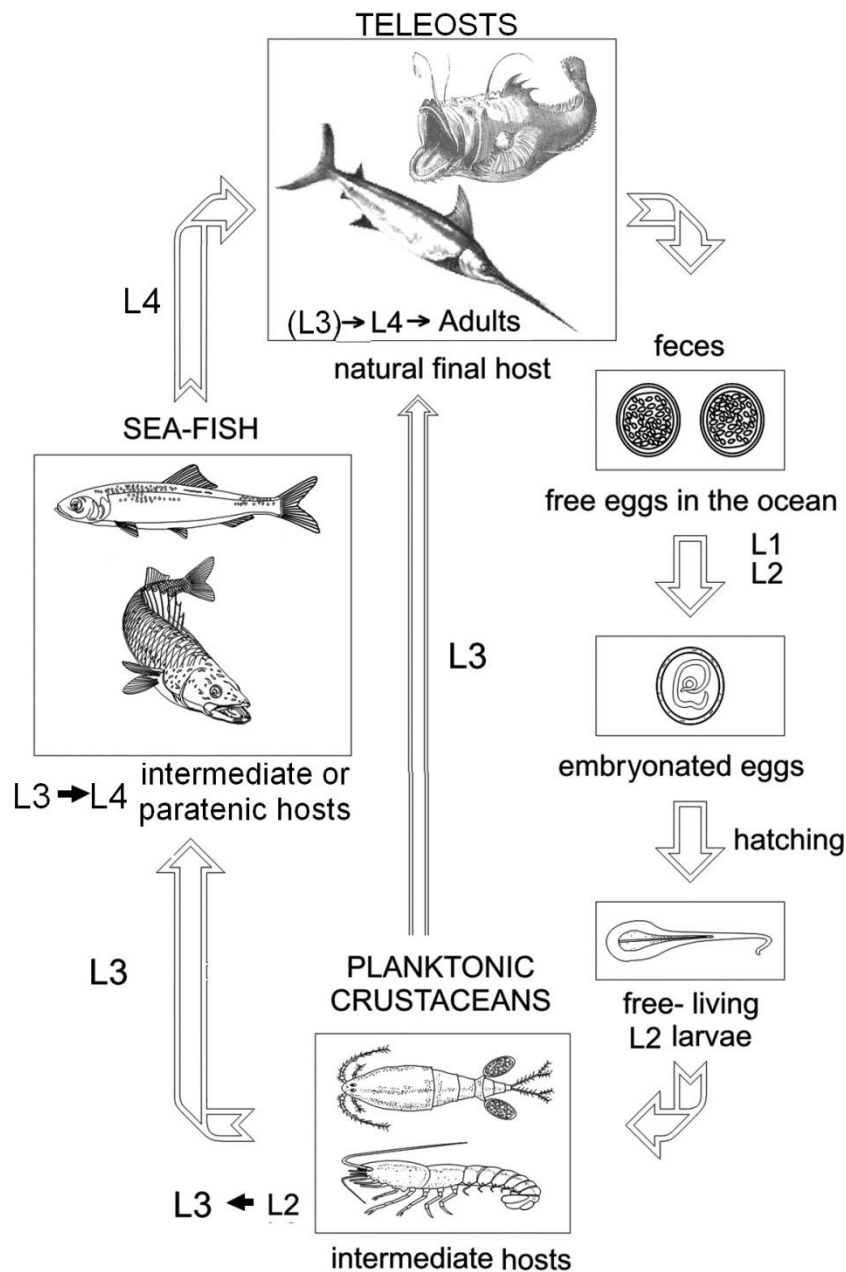


Fig. 6.4 – Ciclo biologico di *Hysterothylacium* spp. (Audicana e Kennedy, 2008, modificato)

### 6.1.4 La funzione di marca biologica

L'uso dei parassiti come marche biologiche è una tecnica molto comune in letteratura per ottenere informazioni sulla struttura degli stock in maniera rapida ed economica (Chenoweth *et al.*, 1986), e risulta molto efficiente soprattutto nel caso di specie caratterizzate da un alto flusso genico, nelle quali l'approccio genetico potrebbe non avere un potere risolutivo sufficiente (Cimmaruta *et al.*, 2007).

Per quanto riguarda *M. merluccius*, la necessità di approfondire le conoscenze sui limiti degli stock di questa specie ha portato l'Unione Europea a promuovere un programma di ricerca (Genhake, "Genetic diversity and parasitic infections of European hake, *Merluccius merluccius*, as descriptors of fishing impact on Mediterranean and Atlantic stocks") che utilizzasse un approccio multiplo (genetica, parassiti e parametri biologici). L'utilizzo dei nematodi del genere *Anisakis* come marche biologiche ha confermato, come già evidenziato da altri autori, che due stock differenti di questa specie occupano le acque Mediterranee ed Atlantiche (Mattiucci *et al.*, 2004). Gli autori, attraverso l'analisi molecolare, sono stati in grado di identificare i parassiti riscontrati sino al livello di specie. I risultati ottenuti suggeriscono inoltre una ulteriore strutturazione sia delle popolazioni Atlantiche (una popolazione settentrionale ed una circostante la costa atlantica del Marocco) che di quelle Mediterranee (Mattiucci *et al.*, 2004). In questo bacino, una chiara differenza è stata riscontrata tra le acque del Mediterraneo orientale (Fig. 6.11), dove la maggior parte degli esemplari risulta parassitata dalla specie *A. typica* (Tipo I), e quelle del Mediterraneo occidentale (Isole Baleari, Alicante e Malaga), nei cui esemplari la specie con prevalenza maggiore è *A. physeteris* (Tipo II). Nell'area centrale del bacino, ed in particolare nei mari italiani, la specie parassita più comune è invece *A. pegreffii* (appartenente anch'esso al Tipo I) (Mattiucci *et al.*, 2004).

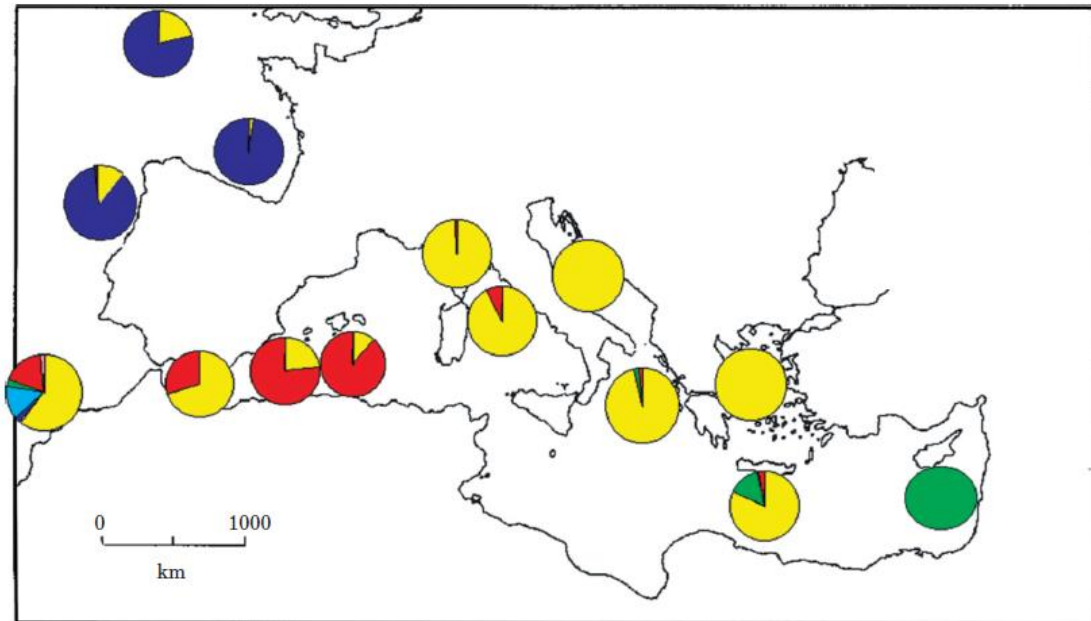


Fig. 6.11 – Pattern di distribuzione delle specie di *Anisakis* identificate geneticamente nei campioni di *M. merluccius* prelevati dalle località campionate (■, *A. simplex s.s.*; ■, *A. pegreffii*; ■, *A. typica*; ■, *A. ziphidarum*; ■, *A. physteris*; ■, *A. brevispiculata*; ■, *Anisakis sp.*) da Mattiucci *et al.*, 2004.

L'area dei mari circostanti la Sardegna, anche in questo caso, sembrerebbe dunque trovarsi in corrispondenza di una sorta di confine tra due zone del bacino del Mediterraneo che mostrano evidenti differenze per quanto riguarda la presenza delle diverse specie di anisakidi in *M. merluccius*.

Nell'ambito di questo lavoro di tesi è stata quindi analizzata in dettaglio proprio quest'area, per chiarire, attraverso le informazioni fornite dai parassiti, qualora questa possa considerarsi omogenea o vi siano differenze significative tra le sotto-zone investigate, in particolare tra le coste occidentale ed orientale. I risultati forniti dalle analisi presentate in questo capitolo, integrati da quelli esposti nei capitoli precedenti, potranno costituire una base sulla quale valutare l'adeguatezza delle attuali unità gestionali, ed eventualmente evidenziarne possibili variazioni.

## 6.2 Materiali e metodi

Un totale di 447 esemplari di *M. merluccius* sono stati selezionati durante lo svolgimento della campagna MED.I.T.S. nell'anno 2014 e destinati ad un esame più approfondito per il rilevamento dei macroparassiti. I campioni selezionati sono stati prelevati da ciascuna delle 7 sotto-Zone della GSA 11 (Fig. 6.12) e da ciascuno strato batimetrico; prima dell'analisi parassitologica sono inoltre state rilevate in laboratorio la lunghezza totale (LT), il peso totale (PT) ed il sesso di ciascun individuo.

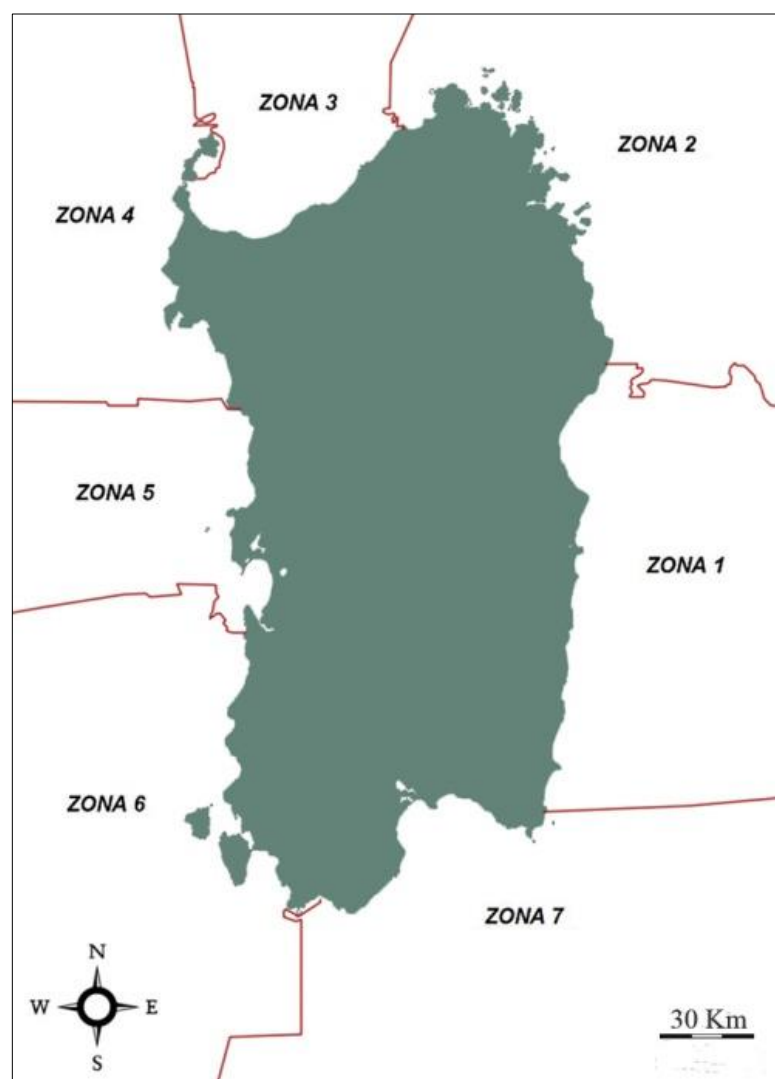


Fig. 6.12 – L'Area di studio (GSA 11) e le diverse zone in cui è suddivisa.



E' stato inoltre attribuito ad ogni esemplare uno stadio corrispondente al grado di maturazione delle gonadi, secondo il protocollo MED.I.T.S. (stadi: 0U, indeterminato; 1, immaturo; 2A, in sviluppo; 2B, in recupero; 2C, in maturazione; 3, maturo; 4A, spento; 4B, a riposo). Nella tabella 6.3 sono riportate le numerosità dei campioni ( $n$ ) per ciascuna macro-area e ciascuna zona, sia per quanto riguarda il campione totale, che per il campione di adulti (esclusi gli stadi 0U ed 1).

Tab. 6.3 – Numero di esemplari ( $n$ ) di *M. merluccius* esaminati per il rilevamento di parassiti nelle varie zone della GSA 11 campionate.

Costa	Zona	n° stazioni	$n$ totale	LT media $\pm$ d.s. (totale)	$n$ adulti	LT media $\pm$ d.s. (adulti)
Est	Zona 1	5	60	22.1 $\pm$ 10.1	28	31.8 $\pm$ 5.3
	Zona 2	8	51	24.5 $\pm$ 9.6	25	32.8 $\pm$ 6.1
Nord	Zona 3	7	63	22.2 $\pm$ 9.1	29	30.1 $\pm$ 7.4
Ovest	Zona 4	6	62	23.2 $\pm$ 8.4	46	26.3 $\pm$ 7.2
	Zona 5	2	25	20.8 $\pm$ 5.8	15	24.4 $\pm$ 4.4
	Zona 6	11	138	24.1 $\pm$ 11.9	81	30.7 $\pm$ 11.3
Sud	Zona 7	8	48	24.3 $\pm$ 10.8	30	29.8 $\pm$ 10.1
	<b>Totale</b>	<b>47</b>	<b>447</b>	<b>23.3 <math>\pm</math> 10.1</b>	<b>254</b>	<b>29.7 <math>\pm</math> 9</b>

Per la ricerca dei nematodi parassiti si è proceduto alla dissezione dei pesci con l'aiuto di una lampada ad ingrandimento o dello stereomicroscopio, in base alle dimensioni dell'ospite. Dopo avere estratto tutti i visceri dalla cavità addominale, si sono ricercate le forme larvali sulla superficie dei singoli organi, in particolar modo dello stomaco, del fegato e delle gonadi, e nello spessore della parete del tratto digerente. Inoltre sono state esaminate la stessa cavità viscerale e la muscolatura addominale. Per individuare i nematodi adulti del genere *Ichthyiofilaria* sp. è stato osservato l'interno della vescica natatoria.

I parassiti estratti sono stati risciacquati in soluzione fisiologica per facilitarne l'osservazione al microscopio. Di seguito sono stati identificati, contati e conservati in provette con etanolo 70°, sulla cui etichetta sono stati indicati il codice dell'ospite e la specie o il tipo di parassita.

La valutazione dei livelli di infestazione è stata calcolata mediante i parametri di seguito riportati:

- *Prevalenza* (P), espressa usualmente in percentuale, è data dal rapporto tra numero totale di ospiti parassitati e numero totale di ospiti esaminati;
- *Abbondanza* (A), espressa come il rapporto tra il numero totale di esemplari di una specie parassita ritrovati nel campione della specie ospite e il numero totale di ospiti esaminati.
- *Intensità media* (Im) che esprime il rapporto tra il numero totale di esemplari di una specie parassita ritrovata nel campione della specie ospite e il numero di ospiti parassitati da quella specie. (Bush *et al.*, 1997)

Quale criterio di positività si è considerato sufficiente il ritrovamento di una sola larva.

Poiché è stata rilevata nel caso di *M. merluccius*, come in numerose altre specie, la presenza di una correlazione tra il numero di parassiti e la taglia degli individui ospiti (Cipriani *et al.*, 2015) è stata analizzata questa eventualità anche nell'ambito di questo studio attraverso l'applicazione del test di correlazione  $\rho$  di Spearman per ciascuna specie parassita con abbondanza sufficiente. Dal campione totale di individui esaminati sono stati dunque esclusi gli individui giovanili (stadi maturativi 0U e 1) mentre i restanti sono stati mantenuti per le analisi successive.

Le eventuali differenze nei livelli della parassitosi di queste specie nei due sessi sono state invece investigate attraverso il test del chi-quadrato ( $\chi^2$ ) (per la Prevalenza) e tramite il Fisher's exact test (per l'Intensità media).

Per ottenere una prima valutazione della variabilità e delle eventuali differenze tra la costa occidentale e quella orientale della Sardegna è stato scelto di analizzare i valori di Im di ciascuna specie di parassiti con numerosità sufficiente. Il livello di parassitosi viene infatti considerato un fattore in grado di discriminare tra diverse popolazioni di ospiti (Mattiucci *et al.*, 2004; Cipriani *et al.*, 2015). Poiché i valori di Im sono caratterizzati da una distribuzione non-normale, il confronto tra le aree è stato effettuato applicando il test non-parametrico di Kruskal-Wallis, attraverso il software STATGRAPHICS Centurion XVI (Vers. 16.1.11).

Successivamente, i dati relativi alle numerosità di ciascuna specie di parassiti nelle varie aree sono stati analizzati in maniera complessiva applicando il Non-metric Multidimensional Scaling (MDS), dopo aver subito una trasformazione logaritmica ( $\log(x+1)$ ) per la loro non-normalità. L'MDS è una tecnica di analisi statistica che viene

comunemente usata per ottenere una visione grafica delle differenze o somiglianze tra i vari elementi (gruppi) in un insieme di dati, considerando diverse variabili. Ha come base di partenza una matrice quadrata, contenente la “similarità” di ogni elemento di riga con ogni elemento di colonna. I risultati vengono rappresentati in versione grafica dove i punti vicini tra loro corrispondono a campioni molto simili nella composizione della comunità di parassiti, mentre punti molto distanti indicano campioni con valori molto differenti delle variabili considerate.

Per ottenere una valutazione statistica del pattern di variabilità evidenziato tramite l'MDS è stato applicato sugli stessi dati un test ANOSIM (Analysis of Similarity), utilizzando come variabile sia le singole zone, che le macro-aree (coste).

Infine, per approfondire in dettaglio il grado di variabilità evidenziato dall'MDS è stato applicato un test SIMPER (SIMilarity PERcentages), un'analisi che suddivide la similarità (o dissimilarità) riscontrata tra i gruppi (aree) nei singoli contributi di ciascuna variabile (in questo caso le specie di parassiti). Questo metodo permette dunque di identificare le specie più importanti nella costituzione del pattern di similarità evidenziato. In particolare, utilizza come misura di similarità quella di Bray-Curtis e compara a turno i campioni di due gruppi. Entrambe queste analisi sono state svolte utilizzando il software Primer v.6.1.6 (Clarke e Gorley, 2006).

## 6.3 Risultati

L'analisi parassitologica ha portato all'identificazione di 2714 parassiti appartenenti a 4 differenti taxa: *Anisakis* Tipo I ( $n = 2395$ ), *Anisakis* Tipo II ( $n = 31$ ), *Hysterothylacium* spp. ( $n = 276$ ) e *Ichthyofilaria* sp. (Nematoda, Philometridae) ( $n = 12$ ).

Solo in un esemplare catturato nella Zona 6 è stata riscontrata una parassitosi di intensità particolarmente elevata di *Anisakis* di Tipo I ( $n^{\circ}$  di parassiti stimati = 750) (Fig. 6.13). Poiché l'infezione in questo individuo è di tipo patologico, evidente anche dal grado di alterazione delle gonadi, e dunque differisce dal normale rapporto parassita-ospite esistente tra queste specie, l'individuo è stato escluso dal calcolo dei livelli di parassitosi e dalle analisi seguenti.



Fig. 6.13 – Dettaglio della cavità viscerale e delle gonadi di un esemplare femmina di *M. merluccius* affetto da una parassitosi acuta di *Anisakis* di Tipo I, catturato nella Zona 6 durante la campagna MED.I.T.S. del 2014.

Il test di Spearman (applicato per le specie parassite più comuni: *Anisakis* Tipo I, *Anisakis* Tipo II ed *Hysterothylacium* spp.) ha evidenziato in tutti i casi una correlazione positiva tra la taglia dell'ospite e l'abbondanza di parassiti riscontrati ( $P$ -value < 0,001). Per questo motivo è stato scelto di eliminare dal campione gli individui giovanili (stadi

maturativi 0U e 1, secondo il protocollo MED.I.T.S.) ed utilizzare i restanti nelle successive analisi.

In aggiunta, I test del  $\chi^2$  ed il Fisher's exact test, effettuati rispettivamente sulla Prevalenza e sull'Intensità media nei due sessi, non hanno riscontrato differenze statisticamente significative ( $P\text{-value} > 0,05$ ), per questo motivo gli individui di entrambi i sessi catturati all'interno di una stessa area sono stati raggruppati per le analisi seguenti.

Da un'analisi approfondita si è potuto notare come *Ichthyofilaria sp.*, riscontrata per la prima volta in ospiti della specie *M. merluccius*, è stata rilevata esclusivamente in campioni provenienti dalle coste nord-occidentali dell'isola (Zona 3 e 4). Tutti gli altri parassiti sono invece risultati presenti nell'intero areale analizzato, ad eccezione di *Hysterothylacium spp.*, del quale non sono stati rilevati campioni nella Zona 5 (Sardegna centro-occidentale). In Fig. 6.14 è riportata l'abbondanza relativa delle specie di parassiti rilevate nelle diverse aree investigate. Come si evince dai grafici a torta, in ciascuna Zona il parassita più abbondante è risultato essere *Anisakis* di Tipo I, mentre in quasi tutte le zone la seconda specie per abbondanza è *Hysterothylacium spp.*

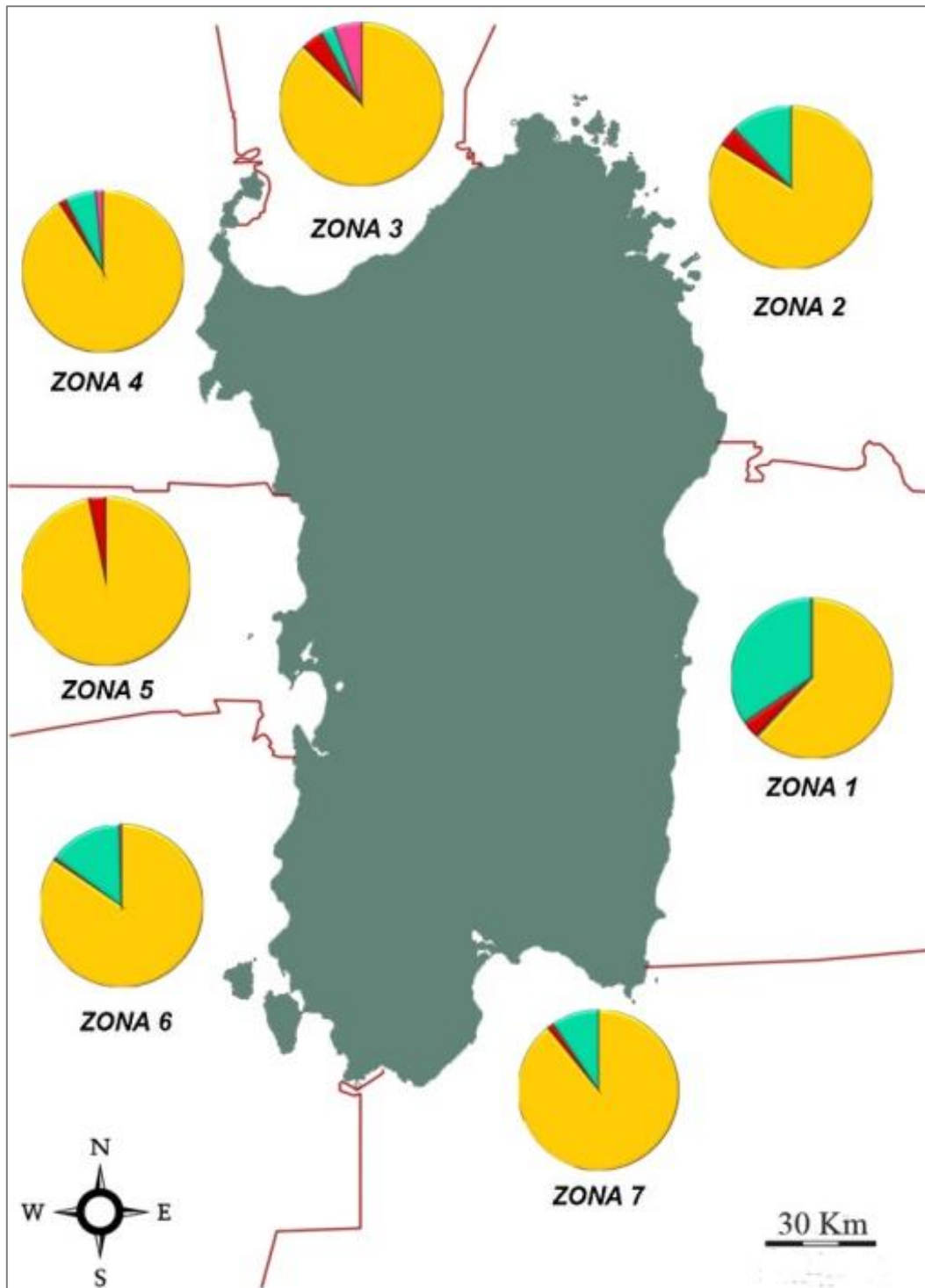


Fig. 6.14 – Pattern di distribuzione delle specie di nematodi parassiti rilevate durante l'analisi degli esemplari di *M. merluccius* provenienti dalle 7 zone campionate (■, *Anisakis* spp. Tipo I; ■, *Anisakis* spp. Tipo II; ■, *Hysterothylacium* spp.; ■, *Ichthyofilaria* sp.).

I livelli di parassitosi (Prevalenza, Intensità media ed Abbondanza media) delle tre specie più abbondanti (*Anisakis* Tipo I, Tipo II ed *Hysterothylacium spp.*) sono stati calcolati sia per le 7 Zone in cui l'area di studio è suddivisa, che per le macro-aree principali (Costa orientale, settentrionale, occidentale e meridionale della Sardegna) e sono presentati in Tab. 6.4.

Tab. 6.4 – Prevalenza (P%), Intensità media (Im) ed Abbondanza media (Am) delle infezioni riscontrate in *M. merluccius* delle 3 specie di parassiti analizzate, indicate per Zona (a) e macro-area (b).

a)									
Area	<i>Anisakis</i> Tipo I			<i>Anisakis</i> Tipo II			<i>Hysterothylacium spp.</i>		
	P %	Im	Am	P%	Im	Am	P%	Im	Am
Zona 1	61.7 %	3.7	2.28	6.7 %	2	0.13	26.7 %	4.75	1.27
Zona 2	39.2 %	3.1	1.22	5.9 %	1	0.06	9.8 %	1.8	0.18
Zona 3	38.1 %	4.04	1.54	6.3 %	1.25	0.08	4.8 %	1	0.05
Zona 4	41.9 %	5	2.1	3.2 %	1	0.03	9.7 %	1.5	0.15
Zona 5	44 %	2.73	1.2	4 %	1	0.04	-	-	-
Zona 6	48.2 %	9.48	4.57	2.9 %	1	0.03	19 %	4.12	0.78
Zona 7	77.1 %	14.89	11.48	6.3 %	2.67	0.17	39.6 %	3.11	1.23

b)									
Costa	<i>Anisakis</i> Tipo I			<i>Anisakis</i> Tipo II			<i>Hysterothylacium spp.</i>		
	P %	Im	Am	P%	Im	Am	P%	Im	Am
Est	51.4 %	3.7	1.9	6.3 %	1.57	0.1	19.8 %	4.41	0.87
Nord	38.1 %	4.04	1.54	6.3 %	1.25	0.08	4.8 %	1	0.05
Ovest	46 %	7.63	3.51	3.1 %	1	0.03	14.2 %	3.63	0.52
Sud	77.1 %	14.89	11.48	6.3 %	2.67	0.17	39.6 %	3.11	1.23

Il test di Kruskal-Wallis, applicato per ottenere un primo confronto dei livelli di Im di ciascun parassita nelle coste orientale (Zone 1 e 2) ed occidentale (Zone 4, 5 e 6) della Sardegna, non ha mostrato differenze statisticamente significative per nessuna delle specie oggetto di analisi ( $P\text{-value} > 0,05$ ).

Il confronto tra le diverse aree campionate è stato tuttavia approfondito attraverso l'MDS. L'analisi è stata applicata alle numerosità delle varie specie di parassiti considerando in un primo momento le singole Zone in cui è suddiviso l'areale di studio.

Per quanto riguarda l'analisi della 4 coste (Figg. 6.15 e 6.16) è risultata evidente una forte sovrapposizione tra i campioni di ciascuna delle aree studiate. I campioni corrispondenti alla costa meridionale hanno mostrato una minore ampiezza della variabilità, tuttavia risultano anch'essi sovrapposti alle restanti aree.

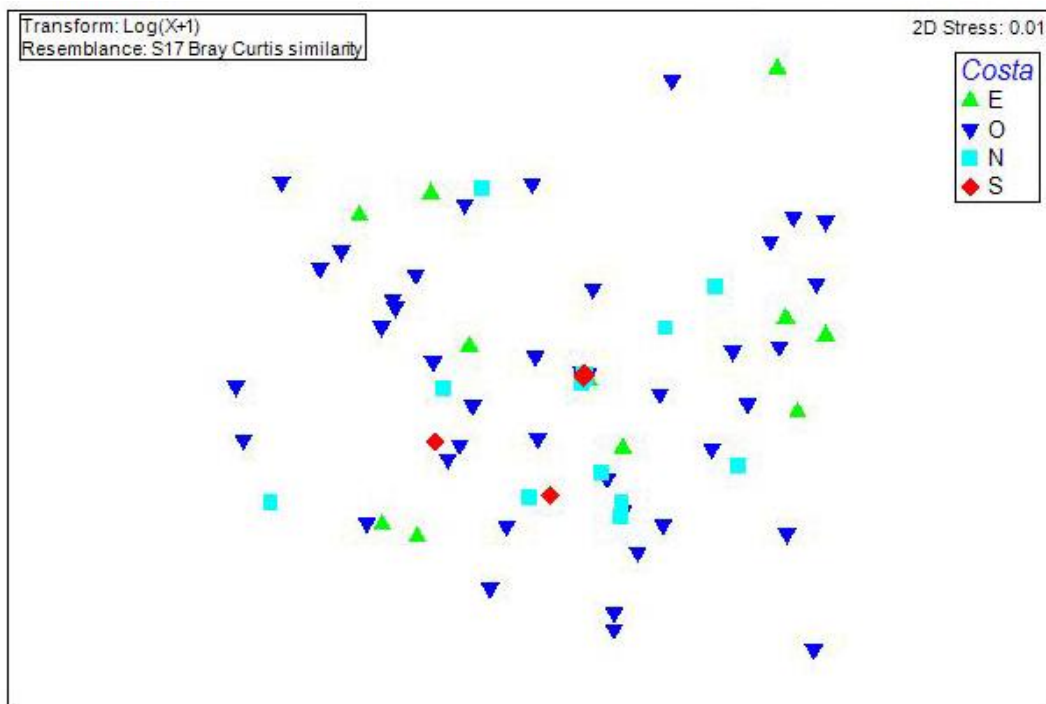


Fig. 6.15 – Rappresentazione grafica (2D) dell'MDS applicata ai dati relativi ai macroparassiti rilevati sulla specie *M. merluccius* nelle coste dei mari sardi (E, costa orientale; O, costa occidentale; N, costa settentrionale; S, costa meridionale).



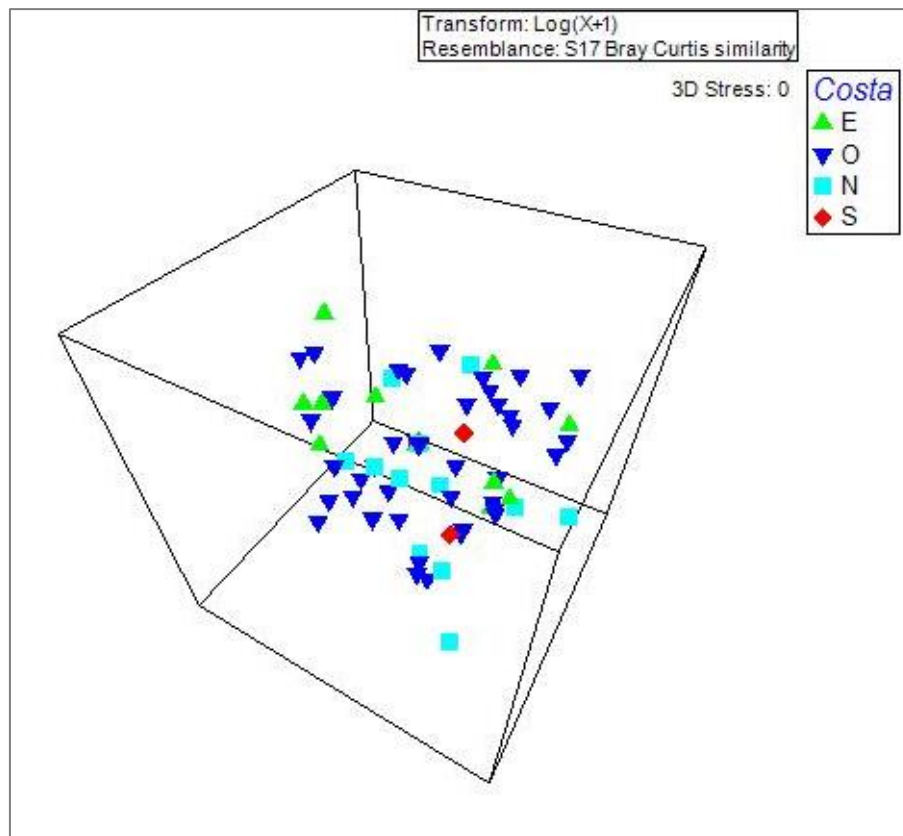


Fig. 6.16 - Rappresentazione grafica (3D) dell'MDS applicata ai dati relativi ai macroparassiti rilevati sulla specie *M. merluccius* nelle coste dei mari sardi (E, costa orientale; O, costa occidentale; N, costa settentrionale; S, costa meridionale).

L'analisi è stata ripetuta anche considerando le singole sotto-zone in cui è suddiviso l'areale di studio (Figg. 6.17 e 6.18), per indagare la presenza di eventuali differenze tra altre aree dei mari sardi, piuttosto che tra le coste occidentale ed orientale. Come per l'analisi precedente, tuttavia, la sovrapposizione tra le zone è molto evidente. Nei grafici seguenti è possibile rilevare come la Zona 1 (Sardegna sud-orientale) risulti meno variabile rispetto alle altre aree, così come la costa meridionale (Zona 7), come già evidenziato precedentemente. In entrambi i casi non è comunque possibile riconoscere una separazione.

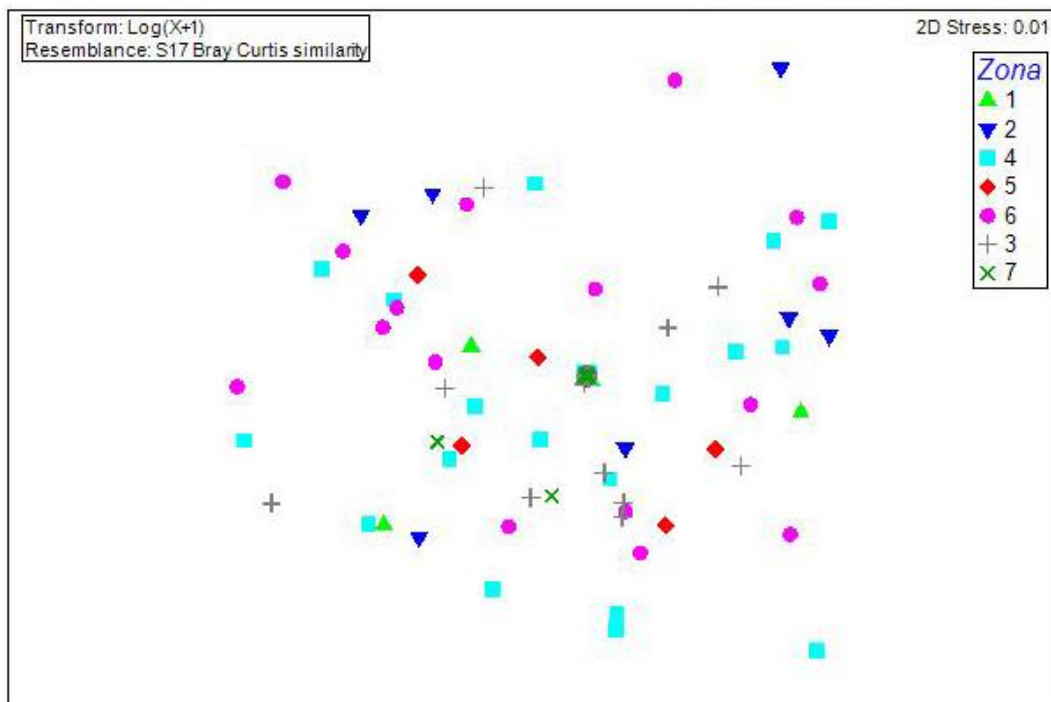


Fig. 6.17 - Rappresentazione grafica (2D) dell'MDS applicata ai dati relativi ai macroparassiti rilevati sulla specie *M. merluccius* nelle 7 Zone esaminate.

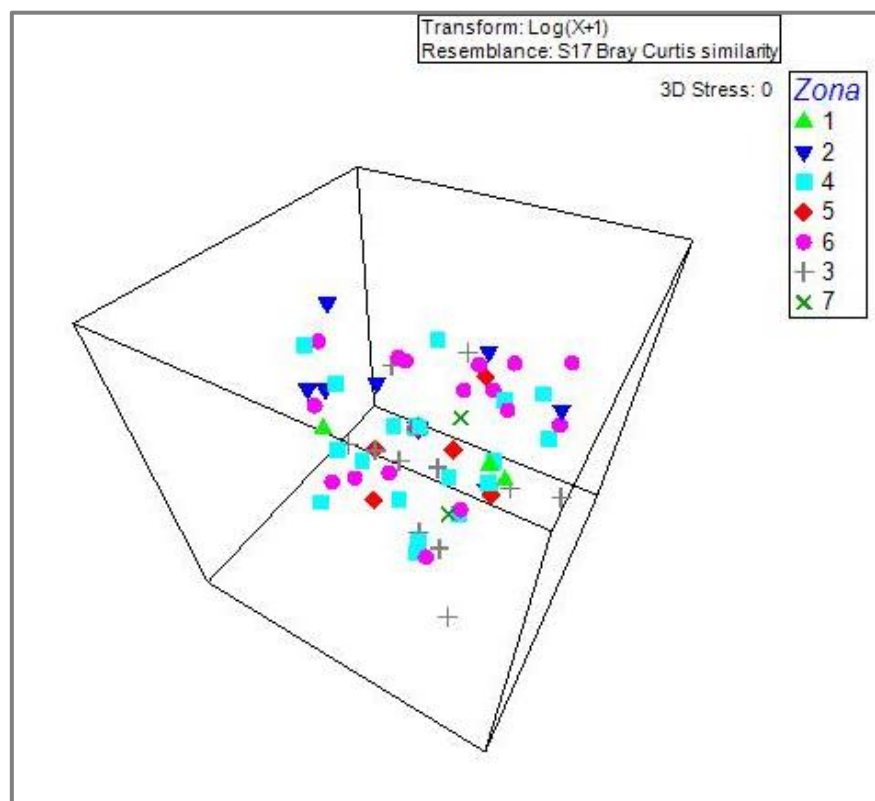


Fig. 6.18 - Rappresentazione grafica (3D) dell'MDS applicata ai dati relativi ai macroparassiti rilevati sulla specie *M. merluccius* nelle 7 Zone esaminate.

Il test ANOSIM ha fornito una valutazione in linea con i risultati presentati in maniera grafica dall'MDS, non ha infatti evidenziato differenze statisticamente significative né tra le zone né tra le coste considerate ( $P$ -value globale  $> 0,05$ ), risultato che è presentato anche sotto forma di istogramma (Fig. 6.19 a,b).

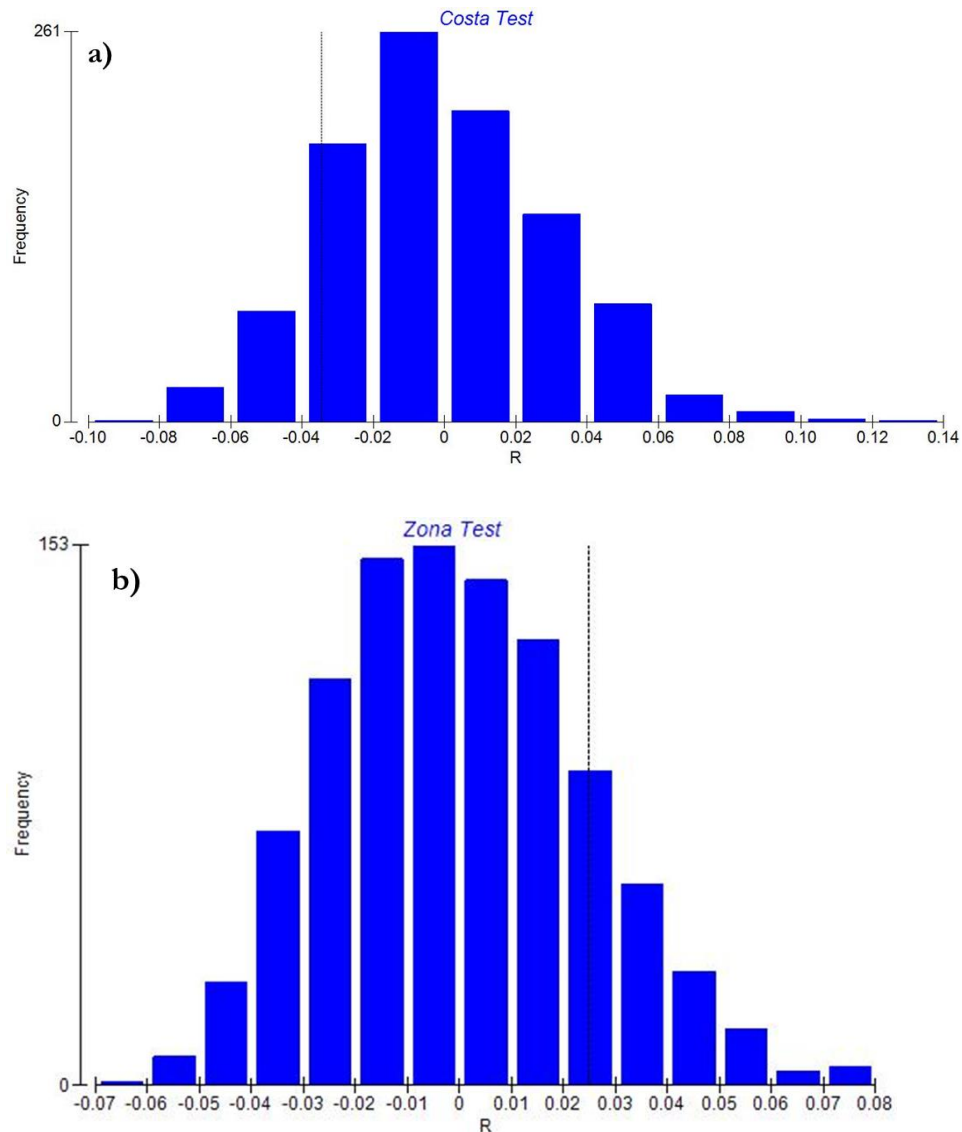


Fig. 6.19 – Risultati del test ANOSIM sotto forma di istogramma per l'analisi della similarità tra le coste (a) e tra le sette zone (b). Come si può osservare dalla sovrapposizione del valore di R (linea tratteggiata) con i valori ottenuti dalle permutazioni, non è evidenziata alcuna differenza significativa.

Infine, gli stessi dati su cui è stata svolta l'analisi MDS sono stati testati attraverso il test SIMPER, che fornisce, considerando diverse variabili, una stima sia della similarità all'interno dei gruppi indicati, che della dissimilarità tra ciascuna coppia degli stessi gruppi. Entrambe queste stime sono accompagnate dalla percentuale del contributo di ciascuna variabile (nel nostro caso le specie di parassiti) al grado di similarità/dissimilarità riscontrato. Considerando inizialmente l'analisi delle coste, possiamo notare come il grado di similarità all'interno di ciascun gruppo è risultato relativamente basso (Tab. 6.5), con la costa meridionale che presenta il valore maggiore (51,04 %).

Tab. 6.5 – Valori di Similarità (%) all'interno di ciascun gruppo considerato (Coste) e Contributo (%) di ciascuna specie parassita alla stima.

	Est	Ovest	Nord	Sud
<b>Similarità (%)</b>	39.7	31.9	28.82	51.04
<b>Specie</b>	<b>Contrib. (%)</b>			
<i>Anisakis</i> Tipo I	88.68	93.9	99.51	81.93
<i>Hysterothylacium</i> spp.	10.29	5.85	0.24	17.91
<i>Anisakis</i> Tipo II	1.02	0.13	0	0.16
<i>Ichthyofilaria</i> sp.	0	0.13	0.25	0

Il contributo più alto all'ottenimento di questa stima è dato quasi in tutti i casi dai parassiti *Anisakis* di tipo I, seguiti da *Hysterothylacium* spp. L'unica differenza si trova nella costa Nord, dove la quasi totalità della stima dipende esclusivamente dalla prima specie.

Per quanto riguarda invece la dissimilarità media tra i gruppi (Tab. 6.6), quella tra le coste occidentale ed orientale della Sardegna ammonta al 64.7%, ma differenze simili o addirittura maggiori sono state riscontrate tra le altre aree analizzate. In tutti i casi, le differenze riscontrate sono dovute alla coppia di parassiti *Anisakis* Tipo I e *Hysterothylacium* spp., che insieme spiegano più del 91% della dissimilarità di ciascuna coppia.

Tab. 6.6 – Valori di Dissimilarità (%) ottenuti dal confronto di ciascuna coppia di gruppi (Coste).

	Est	Nord	Ovest	Sud
Est	-	68.31	64.73	55.89
Ovest	68.31	-	69.86	65.99
Nord	64.73	69.86	-	61.56
Sud	55.89	65.99	61.56	-

Andando a considerare le singole Zone (Tab. 6.7) i valori di similarità (%) all'interno dei gruppi risultano in alcuni casi leggermente maggiori, ma tuttavia piuttosto bassi. Il valore della Zona 7 (corrispondente alla Costa sud) risulta infatti anche in questo caso il maggiore. I contributo maggiore a questa stima è dato in tutti i casi dall'*Anisakis* di Tipo I, mentre nelle Zone 1 e 7 anche *Hysterothylacium* spp. fornisce un modesto contributo (18.1% e 17.9%, rispettivamente).

Tab. 6.7 - Valori di Similarità (%) all'interno di ciascun gruppo considerato (Zone) e Contributo (%) di ciascuna specie parassita alla stima.

	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 5	Zona 6	Zona 7
Similarità (%)	46.72	34.39	28.82	24.41	32.44	36.81	51.04
Specie	Contrib. (%)						
<i>Anisakis</i> Tipo I	80.94	96.48	99.51	97.28	100	89.91	81.93
<i>Hysterothylacium</i> spp.	18.09	2.7	0.24	2.5	0	9.97	17.91
<i>Anisakis</i> Tipo II	0.97	0.81	0	0.12	0	0.06	0.16
<i>Ichthyofilaria</i> sp.	0	0	0.25	0.1	0	0.06	0

Il confronto tra le Zone (Tab. 6.8) ha mostrato un pattern di dissimilarità abbastanza uniforme, con tutte le Zone che si differenziano tra loro di un valore percentuale simile. In particolare, i valori minori sono stati rilevati tra la Zona 7 e le Zone confinanti 1 e 6, mentre le maggiori differenze sono tra la Zona 4 e le vicine Zone 3 e 5.

Tab. 6.8 - Valori di dissimilarità (%) ottenuti dal confronto di ciascuna coppia di gruppi (Zone).

	Zona 1	Zona 2	Zona 3	Zona 4	Zona 5	Zona 6	Zona 7
Zona 1	-	62.01	67.7	68.68	66.17	59.62	51.3
Zona 2	62.01	-	69.05	70.7	65.43	64.48	61.09
Zona 3	67.7	69.05	-	72.59	68.25	68.71	65.99
Zona 4	68.68	70.7	72.59	-	71.37	70.79	67.76
Zona 5	66.17	65.43	68.25	71.37	-	66.07	64.86
Zona 6	59.62	64.48	68.71	70.79	66.07	-	57.47
Zona 7	51.3	61.09	65.99	67.76	64.86	57.47	-

## 6.4 Discussione

Nell'ambito dell'analisi svolta in questo lavoro, quattro differenti *taxa* di nematodi sono stati identificati come parassiti del nasello. Due di questi appartengono agli altrettanti morfotipi conosciuti del genere *Anisakis* (Tipo I e Tipo II), il terzo appartiene al genere *Hysterothylacium*, mentre l'ultimo rientra nel genere *Ichthyofilaria*.

Quest'ultimo parassita in particolare non è mai stato rilevato in ospiti della specie *M. merluccius*, è risultato piuttosto raro (12 parassiti prelevati da soli otto ospiti, su un totale di 445 campioni) e l'infezione sembra circoscritta all'area a nord-ovest della Sardegna. In precedenza, era stata segnalata in bibliografia la presenza di *Ichthyofilaria argentinensis* nella vescica natatoria di *Merluccius hubbsi* nell'Atlantico occidentale, mentre un'altra specie congenerica, *Ichthyofilaria bergensis*, era stata osservata proprio in acque sarde, in *Molva macrophthalmia* (Rafinesque) (Lotiidae) (Cantatore *et al.*, 2010).

La specie più abbondante è risultata essere *Anisakis* di Tipo I in tutte le aree esaminate, mentre la seconda per abbondanza è *Hysterothylacium* spp., ad eccezione della Zona 3 (Golfo dell'Asinara, in cui prevalgono le altre specie) e la Zona 5 (costa centro-occidentale, nella quale non sono stati rilevati esemplari). E' comunque ipotizzabile che la mancata rilevazione di questo parassita in questa zona possa essere dovuta al fatto che questa sia più ristretta rispetto alle altre e con un minor numero di stazioni di campionamento.

La predominanza del Morfotipo I di *Anisakis* (nel quale rientra la specie *A. pegreffii*) nei mari sardi è un risultato in linea con i quelli presentati da Mattiucci *et al.* (2004), che indicavano la predominanza di questa specie nel Mediterraneo centrale, ed in particolare nei mari italiani, compreso il Tirreno.

Anche la scarsa abbondanza relativa del Morfotipo II di *Anisakis* evidenziata in questo lavoro può fornire utili informazioni se confrontata con l'analisi molecolare svolta da Mattiucci *et al.* (2004). Secondo questo studio, infatti, nella parte più occidentale del bacino del Mediterraneo (e.g. le Isole Baleari), a differenza della Sardegna come rilevato in questo lavoro, vi è una predominanza sostanziale di *Anisakis* di Tipo II (identificati dall'autore come *A. physeteris*). Nonostante quindi la relativa vicinanza della Sardegna al bacino occidentale, le informazioni evidenziate suggeriscono che la popolazione di *M. merluccius* in quest'area non abbia probabilmente contatti con quelle delle aree più ad ovest,

mentre sia più strettamente associata alla popolazione del Mar Tirreno e degli altri mari italiani.

Le analisi effettuate per le diverse zone della Sardegna comunque ci portano a rafforzare il concetto di unicità di stock per l'intero areale sardo.

Le analisi statistiche effettuate non hanno infatti in linea generale evidenziato differenze significative tra le diverse zone dei mari circostanti la Sardegna. L'analisi del livello di infezione nelle diverse aree, che ha paragonato i livelli di Intensità media di ciascuna specie, ha indicato che vi è un'intensità simile di infezione in tutte le zone. Poiché è stato ipotizzato che differenze nei livelli di infezione, in particolare di *Anisakis* spp., possono essere collegate alla diversa provenienza degli ospiti (Cipriani *et al.*, 2014), è ipotizzabile che gli esemplari di *M. merluccius* analizzati appartengano ad un'unica popolazione.

Questa ipotesi è supportata anche dall'analisi dell'MDS, che ha mostrato una elevata sovrapposizione nella distribuzione dei campioni provenienti da aree differenti, rendendo quindi impossibile l'identificazione di alcun gruppo separato.

Risultati in linea con i precedenti sono stati ottenuti anche tramite il test ANOSIM ed il test SIMPER, effettuati sulle abbondanze di ciascuna specie nei campioni delle diverse zone. Quest'ultimo ha fornito alcune informazioni sull'importanza relativa di ciascuna specie parassita nella caratterizzazione delle aree, tuttavia nessuna delle differenze riscontrate tra le zone è risultata statisticamente significativa.



## 7. Conclusioni

---

Il concetto di stock è fondamentale per la scienza della pesca e costituisce l'unità di base alla quale si rivolgono gli studi di dinamica di popolazione delle specie ittiche sfruttate commercialmente e per le quali è necessaria una gestione sostenibile (Abaunza, 2008a).

La gestione corretta di uno stock richiede un'approfondita conoscenza del suo stato ma anche la definizione dei suoi limiti geografici (Begg *et al.*, 1999a; Radhakrishnan *et al.*, 2012). Nell'ambiente marino questa pratica non è tuttavia per niente semplice, infatti i confini tra le popolazioni sono a volte molto confusi a causa della relativa scarsità di barriere geografiche rispetto all'ambiente terrestre, fatto che favorisce il contatto tra gli individui di una stessa specie (Abaunza, 2008a).

La scarsa conoscenza della struttura di uno stock ed una gestione inefficiente della pesca può portare a cambiamenti drammatici nelle popolazioni (Altukhov, 1981; Ricker, 1981; Smith *et al.*, 1991), per questo motivo grande interesse è stato rivolto alle metodiche di identificazione degli stock da parte della comunità scientifica.

L'approccio che recentemente è stato adottato in letteratura, e fortemente raccomandato, per gli studi che mirano alla determinazione della struttura degli stock è quello olistico, che considera cioè diverse metodiche per il raggiungimento di un'informazione più completa (Abaunza, 2008a; Correia *et al.*, 2012; Papetti *et al.*, 2013; Trella *et al.*, 2013; Zischke *et al.*, 2013; Cadrin *et al.*, 2013; Tanner *et al.*, 2014).

L'obiettivo di questo lavoro è stato proprio quello di ottenere una visione più approfondita della struttura dello stock di una specie di elevata importanza commerciale in un'area del Mediterraneo centro-occidentale (i mari circostanti la Sardegna) attraverso un approccio multidisciplinare.

La specie alla quale è stato scelto di rivolgere l'analisi è il nasello, *Merluccius merluccius*, una specie demersale molto importante in Mediterraneo dal punto di vista commerciale, per la quale, nonostante i numerosi studi effettuati, non vi è ancora un accordo della comunità scientifica riguardo alla definizione geografica degli stocks.

Inoltre, la specie risulta essere attualmente, lungo tutto il suo areale di distribuzione, in una condizione di generale sovrasfruttamento (De Pontual *et al.*, 2013; 2014; Korta *et al.*, 2010; Mendoza *et al.*, 2010; STECF, 2013; GFCM, 2014).

In Mediterraneo l'attuale gestione delle popolazioni delle specie ittiche commerciali, tra cui il nasello, è basata su delle unità gestionali corrispondenti ad aree (GSA) relativamente piccole, identificate dalla GFCM soprattutto secondo criteri politici e gestionali (Ragonese *et al.*, 2012; Vittori *et al.*, 2013).

Tuttavia diversi studi hanno ipotizzato una distribuzione differente degli stock ittici in Mediterraneo (Abaunza *et al.*, 2000; Abaunza *et al.*, 2008c; Murta *et al.*, 2008) anche nel caso del nasello (Castillo *et al.*, 2004; Mattiucci *et al.*, 2004; Tanner *et al.*, 2012).

Inoltre, alla luce delle recenti informazioni ottenute nell'ambito del progetto StockMed (Fiorentino *et al.*, 2014), con il presente lavoro si è voluto fornire un contributo, relativo ad una scala spaziale più ristretta, che portasse alla valutazione dell'adeguatezza della attuale suddivisione in unità gestionali o, eventualmente, al suggerimento di possibili modifiche.

Un'analisi preliminare delle strutture di taglia della specie nelle coste occidentale ed orientale della Sardegna ha permesso di evidenziare una certa differenziazione delle popolazioni considerate e questa variabilità è stata analizzata più approfonditamente attraverso l'applicazione di diverse metodiche, indirizzate all'analisi della variabilità fenotipica degli individui.

L'analisi dell'accrescimento, utilizzato come parametro informativo sulla *life history* della popolazione, ha permesso di effettuare un confronto tra le popolazioni di queste due aree, nonostante le difficoltà esistenti nel processo di determinazione dell'età per questa specie (riscontrate soprattutto per gli individui di taglia maggiore) (Morales-Nin *et al.*, 1998; Piñeiro e Sainza, 2003; Mellon-Duval *et al.*, 2010; Pattoura *et al.*, 2014). In complesso, questa metodica non ha permesso di evidenziare differenze significative tra le coste, ad eccezione di una certa variabilità riscontrata per gli individui della classe di età 0. Questo particolare risultato potrebbe tuttavia essere connesso, come già ipotizzato nel caso dello studio delle strutture di taglia, alla presenza di numerose aree di *spawning* nella costa occidentale della Sardegna (AA.VV., 2011; Vittori *et al.*, 2013).

L'analisi è proseguita con l'applicazione dell'approccio morfometrico. Le analisi svolte in questo caso hanno rilevato una differenza statisticamente significativa dalle due aree, seppure di entità ridotta, leggermente più accentuate per gli individui di sesso maschile.

Queste variazioni della morfologia, relativamente contenute, non sono state considerate sufficienti per la determinazione della presenza di due stock separati, ma al contrario possono essere dovute esclusivamente alla variabilità ambientale senza che questo implichi una differenziazione nei parametri biologici della popolazione (Tudela, 1999).

Una conclusione simile è stata tratta anche da Levi *et al.* (2004) nella vicina area del canale di Sicilia, a causa della discordanza tra i risultati morfometrici rispetto a quelli forniti dalle analisi genetiche e dell'accrescimento. In aggiunta, l'autore ha riscontrato una connessione tra le differenze morfometriche evidenziate per gli individui di sesso femminile di nasello e una certa differenza nei tassi di crescita relativa proprio alle femmine.

Il fatto che in questo lavoro i risultati morfometrici non siano stati convalidati da un riscontro nell'analisi dell'accrescimento, ci ha portato ad ipotizzare che la variabilità riscontrata nella forma possa essere dovuta esclusivamente alle diverse influenze ambientali subite soprattutto nelle prime fasi di vita, ma senza che queste causassero modifiche dei parametri biologici delle popolazioni.

I risultati ottenuti attraverso l'analisi parassitologica vanno a concordare, infine, con l'ipotesi di omogeneità dell'area di studio. Il confronto tra le due coste è stato effettuato valutando i parametri di abbondanza relativa, intensità e prevalenza di cinque *taxa* di parassiti nematodi, dei quali due appartenenti al genere *Anisakis*. I risultati ottenuti hanno indicato che il *taxon* con maggiore prevalenza in tutto l'areale studiato è il Morfotipo I di *Anisakis*.

L'analisi in complesso ha permesso di evidenziare una sostanziale omogeneità dell'areale di studio ed inoltre di associare il pattern di infestazione dovuta al genere *Anisakis* con quello evidenziato da Mattiucci *et al.* (2004) nell'area centrale del Mediterraneo. Dal confronto risulta infatti una similarità delle popolazioni dei mari sardi con l'area comprendente il Mar Ligure, il Mar Tirreno, l'Adriatico, fino al Mar Egeo. Inoltre, per la scarsa abbondanza del Morfotipo II di *Anisakis*, rilevata nel presente lavoro, è possibile evidenziare una probabile separazione rispetto all'area più occidentale corrispondente alle Isole Baleari e alla costa di Alicante.

Questa suddivisione è stata in parte supportata anche dal risultato ottenuto dal progetto StockMed (Fiorentino *et al.*, 2014), anche se l'areale identificato in questo caso risulta più ristretto (mari circostanti la Sardegna, Mar Ligure, Mar Tirreno, Stretto di Sicilia e Mar Ionio).

In quest'ottica, dalla valutazione complessiva dei risultati ottenuti attraverso questo lavoro multidisciplinare, è possibile affermare la sostanziale omogeneità della popolazione del nasello nei mari circostanti la Sardegna (GSA 11) portando dunque ad escludere una differenziazione del suo versante occidentale con quello orientale. Il confronto con le informazioni disponibili in letteratura ha inoltre condotto all'ipotesi che lo stock esaminato possa avere in realtà una distribuzione geografica più ampia, comprendente le aree già citate ad est della Sardegna.

Così come il mancato riconoscimento della presenza di stocks multipli all'interno di un areale, anche la valutazione di una piccola porzione di uno stock più ampio come un'unica popolazione chiusa, può infatti portare a risultati fuorvianti e causare conseguenze negative per il sostentamento della specie in esame (Begg *et al.*, 1999a). Queste conclusioni implicano innanzitutto l'esigenza di proseguire con una gestione unica dello stock di *M. merluccius* presente in Sardegna (considerando in maniera complessiva le GSA 11.1 ed 11.2), ma soprattutto la necessità di considerare un eventuale ampliamento dei limiti delle unità gestionali ad altre aree, associando quindi diverse GSA nella valutazione della popolazione in esame.

## 8. Bibliografia

---

- AA.VV. (2011) – Lo stato della pesca e dell’acquacoltura nei mari italiani. A cura di Cataudella S. e Spagnolo M. *Ministero delle politiche agricole alimentari e forestali*.
- Abaunza P. *et al.*, (2000) – HOMSIR: An international project on horse mackerel stock identification research in the ICES area and in the Mediterranean Sea. Working Document for the ICES Working Group of the Assessment of Mackerel, Horse Mackerel, Sardine and Anchovy. Copenhagen, 14-23 September 2000.
- Abaunza P., Mattiucci S., Nascetti G., Magoulas A., Cimmaruta R., Bullini L. (2001) – Morphometric and meristic variation in European hake, *Merluccius merluccius*, from the Northeast Atlantic and Mediterranean Sea. ICES Document CM, 20, 2001/J:01.
- Abaunza P. (2008a) – Horse mackerel: Identification of stocks. *Fish. Res.* 89 (2): 101-103.
- Abaunza P., Gordo L.S., García Santamaría M.T., Iversen S.A., Murta A.G., Gallo E. (2008b) – Life history parameters as basis for the initial recognition of stock management units in horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Fish. Res.* **89**: 167-180.
- Abaunza P., Murta A.G., Campbell N., Cimmaruta R., Comesaña A.S., Dahle G., García Santamaría M.T., Gordo L.S., *et al.* (2008c) - Stock identity of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean Sea: Integrating the results from different stock identification approaches. *Fish. Res.*, **89**: 196-209.
- Adams D.C., Rohlf F.J., Slice D.E. (2004) – Geometric morphometrics: ten years of progress following the ‘revolution’. *Ital. J. Zool.*, **71**: 5-16.
- Aldebert, Y. and L. Recasens. – 1995. Estimation de la croissance de merlu dans le olfe de Lion par l’analyse des frequences de tailles. *Rapp. Comm. int. Mer Medit.*, 34: 236.
- Alemany F. e Oliver P. (1995) - Growth of female European hake in the Balearic Sea: a proposal of new growth model with higher growth rates. *Rapport de la Commission Internationale de la Mer Mediterranee*, **34**: 236.
- Altukhov, Y.P. (1981) – The stock concept from the viewpoint of population genetics. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**: 1523-1538.
- Armstrong M. P., Cadrin, S. X. (2001) - Morphometric variation among spawning groups of the Gulf of Maine-Georges Bank herring complex. Herring,

- expectations for a new millennium. *Alaska Sea Grant College Program Report*, 575-590.
- Arneri E., Morales-Nin B. (2000) – Aspects of early life history of European hake from the central Adriatic. *J. Fish Biol.* **56**: 1368-1380.
- Audicana M.T., Kennedy M.W. (2008) - *Anisakis simplex*: from obscure infectious worm to inducer of immune hypersensitivity. *Clin. Microbiol. Rev.*, **21**: 360-379.
- Bhattacharya C.G. (1967) - A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components. *Biometrics*, **23**: 115-135.
- Beamish, R.J., Fournier, D.A., (1981). A method for comparing the precision of a set of age determinations. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 982-983.
- Begg G. A., Friedland K.D., Pearce J.B. (1999a) – Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview. *Fish. Res.* **43**: 1-8.
- Begg G. A., Hare J.A., Sheehan D.D. (1999b) – The role of life history parameters as indicators of stock structure. *Fish. Res.* **43**: 141-163.
- Begg G.A. e Waldman J.R. (1999) – An holistic approach to fish stock identification. *Fish. Res.* **43**: 35-44.
- Begg G.A. (2005) – Life history parameters. In: Cadrin S.X., Friedland K.D., Waldman J.R. (Eds.), *Stock Identification Methods. Applications in Fishery Science*. Elsevier, Academic Press, Amsterdam, pp. 119-150.
- Belcari P., Ligas A., Viva C. (2006) – Age determination and growth of juveniles of the European hake, *Merluccius merluccius* (L., 1758), in the northern Tyrrhenian Sea (NW Mediterranean). *Fish. Res.* **78**: 211-217.
- Benítez H.A. (2013) - Sexual Dimorphism Using Geometric Morphometric Approach. In: *Sexual Dimorphism*, Moriyama H. (Ed), InTech.
- Berland, B. (1961) - Nematodes from some Norwegian marine fishes. *Sarsia*, **2**: 1-50.
- Bertrand J.A., De Sola L.G., Papaconstantinou C., Relini G., Souplet A. (2002) – The general specifications of the MEDITS surveys. *Sci. Mar.* **66** (2, Suppl.): 9-17.
- Booke H.E. (1981) – The conundrum of the stock concept – are nature and nurture definable in fishery science? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**: 1479-1480.
- Bookstein F.L., Chernoff B., Elder R., Humphries J., Smith G., Strauss R. (1985) – Morphometrics in Evolutionary Biology. Academy of Natural Sciences of Philadelphia.
- Bookstein F.L. (1991) - Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology. Cambridge: Cambridge University Press.

- Bush A.O., Lafferty K.D., Lotz J.M., Shostak, A.W. (1997) - Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis *et al.* revisited. *J. Parasitol.*, **83**: 575-583.
- Cadrin S.X., Friedland K.D. (1999) – The utility of image processing techniques for morphometric analysis and stock identification. *Fish. Res.*, **43**: 129-139.
- Cadrin S.X. (2000) – Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, **10**: 91-112.
- Cadrin, S.X. Friedland K.D., Waldman J.R. (2005). *Stock Identification Methods. Applications in Fishery Science*. Elsevier Academic Press, London, UK. 719pp.
- Cadrin S.X. (2013) – Morphometric Landmarks. In: Cadrin S. X., Kerr L.A., Mariani S. (Eds.), *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science (Second Edition)*. Elsevier Academic Press, London, UK. pp. 109-128.
- Cadrin S.X., Kerr L.A., Mariani S. (2013) – Stock identification methods: an overview. In: Cadrin S. X., Kerr L.A., Mariani S. (Eds.) *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science (Second Edition)*. Elsevier Academic Press, London, UK. pp. 1-5.
- Campana S.E., Casselman J.M. (1993) – Stock discrimination using otolith shape analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **50**: 1062-1083.
- Campana S.E. (2001) – Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods. *J. Fish Biol.*, **59**: 197-242.
- Cantatore D.M.P., Merella P., Timi J.T. (2010) - Males of *Ichthyofilaria argentinensis* Incorvaia, 1999 and *I. bergensis* (Wülker, 1930) (Dracunculoidea: Guyanemidae): new morphological aspects and emendation of the generic diagnosis. *Folia Parasitol.*, **57**: 289-294.
- Cardinale M. *et al.* (2011) – Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries. Report of the SGMED-10-03 Working Group on the Mediterranean Part II. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Castillo A.G.F., Martinez J.L., Garcia-Vazquez E. (2004) – Fine spatial structure of Atlantic hake (*Merluccius merluccius*) stocks revealed by variation at microsatellite loci. *Mar. Biotechnol.*, **6**: 299-306.
- Catalano S.R., Whittington I.D., Donnellan S.C., Gillanders B.M. (2013) - Parasites as biological tags to assess host population structure: Guidelines, recent genetic advances and comments on a holistic approach. *International J. Parasitol.*, **3**: 220-226.
- Cau A., Sabatini A., Murenu M., Follesa M.C., Cuccu D. (1994) - Considerazioni sullo stato di sfruttamento delle risorse demersali (Mari di Sardegna). Atti seminario sulla regolazione dello sforzo di pesca. *Biol. Mar.Medit* **1** (2): 67-76.

- Cau *et al.* (2014a) – Programma nazionale Italiano per la raccolta di dati alieutici nei Mari Sardi, anno 2013. Campagne di ricerca in mare Sezione G MEDITS – Rapporto tecnico intermedio – Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia – Università di Cagliari, via T.Fiorelli,1 – 0916 Cagliari, Italia, pp.22.
- Cau *et al.* (2014b) - Programma nazionale Italiano per la raccolta di dati alieutici, anno 2013. Campionamento biologico delle catture. Sezioni C ed E. Rapporto finale, Dipartimento di Scienze della Vita e dell’Ambiente, Università di Cagliari, Cagliari, Italia: 388 pp.
- Chang, W.Y.B., (1982). A statistical method for evaluating the reproducibility of age determination. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **39**: 1208-1210.
- Chenoweth J.F., McGladdery S.E., Sindermann C.J., Sawyer T.K., Bier J.W. (1986) – An investigation into the usefulness of parasites as tags for herring (*Clupea harengus*) stocks in the western North Atlantic, with emphasis on use of the larval nematode *Anisakis simplex*. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, **7**: 25-33.
- Cimmaruta R., Bondanelli P., Nascetti G. (2005) – Genetic structure and environmental heterogeneity in the European hake (*Merluccius merluccius*). *Mol. Ecol.*, **14**: 2577-2591.
- Cimmaruta R., Mattiucci S., Nascetti G. (2007) – Integrating genetic and parasitological approaches in the frame of multidisciplinary fish stock analysis. *Parassitologia*, **49**: 119-123.
- Cipriani P., Smaldone G., Acerra V., D’Angelo L., Anastasio A., Bellisario B., Palma G., Nascetti G., Mattiucci S. (2015) – Genetic identification and distribution of the parasitic larvae of *Anisakis pegreffii* and *Anisakis simplex* (s.s.) in European hake *Merluccius merluccius* from the Tyrrhenian Sea and Spanish Atlantic coast: Implications for food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, **198**: 1-8.
- Clarke, K. R. & Gorley, R. N. (2006) - PRIMER v6: User Manual/Tutorial. Plymouth: PRIMER-E (Internet). Disponibile all’indirizzo: <http://www.primer-e.com>
- Colloca F., Gentiloni P., Belluscio A., Carpentieri P., Ardizzone G.D. (2003) – Analysis and validation of annual increments in otoliths of European hake (*Merluccius merluccius*) in the central Mediterranean Sea. *Arch. Fish. Mar. Res.*, **50** (2): 175-192.
- Correia A.T., Ramos A.A., Barros F., Silva G., Hamer P., Morais P., Cunha R.L., Castilho R. (2012) - Population structure and connectivity of the European conger eel (*Conger conger*) across the north-eastern Atlantic and western Mediterranean: integrating molecular and otolith elemental approaches. *Mar. Biol.*, **159**: 1509–1525.



- Costa C., Cataudella S. (2007) - Relationship between shape and trophic ecology of selected species of Sparids of the Caprolace coastal lagoon (Central Tyrrhenian sea). *Environ. Biol. Fish.* **78**: 115-123.
- Courbin N., Fablet R., Mellon C., de Pontual H. (2007) - Are hake otolith macrostructures randomly deposited? Insights from an unsupervised statistical and quantitative approach applied to Mediterranean hake otoliths. *ICES J. Mar. Sci.*, **64** (6): 1191-1201.
- de Pontual H., Panfili J., Wright P.J., Troadec H. (2002) - General introduction. In: Manual of fish sclerochronology. Panfili J., de Pontual H., Troadec H. & Wright P. J. (Eds.), IFREMER-IRD coedition, Brest, France, pp. 19-22.
- de Pontual H., Groison A.L., Pineiro C., Bertignac M. (2006) - Evidence of underestimation of European hake growth in the Bay of Biscay, and its relationship with bias in the agreed method of age estimation. *ICES J. Mar. Sci.*, **63**: 1674–1681.
- de Pontual H., Jolivet A., Garren F., Bertignac M. (2013) – New insights on European hake biology and population dynamics from a sustained tagging effort in the Bay of Biscay. *ICES J. Mar. Sci.* **70** (7): 1416-1428.
- Eltink A.T.G.W. (2000) – Age reading comparisons. (MS Excel workbook version 1.0 October 2000)(Internet). Disponibile all'indirizzo: <http://www.efan.no>
- Fariña A.C., Duarte R., Landa J., Quincoces I., Sánchez J.A. (2004) – Multiple stock identification approaches of anglerfish (*Lophius piscatorius* and *L. budegassa*) in western and southern European waters. ICES Document CM, 2004/EE:25, 26 pp.
- Ferraton F., Harmelin-Vivien M., Mellon-Duval C., Souplet A. (2007) – Spatio-temporal variation in diet may affect condition and abundance of juvenile European hake in the Gulf of Lions (NW Mediterranean). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Vol. 337: 197-208.
- Fiorentino F., E. Massutì, F. Tinti, S. Somarakis, G. Garofalo, T. Russo, M.T. Facchini, P. Carbonara *et al.* (2014) - Stock units: Identification of distinct biological units (stock units) for different fish and shellfish species and among different GFCM-GSA. STOCKMED Deliverable 03: FINAL REPORT. September 2014, 215 p.
- Flamigni C. (1984) – Preliminary utilization of trawl survey data for hake (*Merluccius merluccius* L.) population dynamics in the Adriatic Sea. *Fao Fish. Rep.*, **290**: 109-115.
- García A., Mattiucci S., Damiano S., Santos M., Nascetti G. (2010) - Metazoan parasites of swordfish, *Xiphias gladius* (Pisces: Xiphiidae) from the Atlantic

- Ocean: implications for host stock identification. *ICES J. Mar. Sci.*, doi:10.1093/icesjms/ fsq147
- García-Rodríguez M. e Esteban A. (1996) - On the growth of the Mediterranean hake (*Merluccius merluccius* L.) from the Santa Pola bay (S.E. Spain). In Gutshop '96 Feeding Ecology and Nutrition in Fish Symposium Proceedings. International Congress on the Biology of Fishes, San Francisco, 14–18 July 1996, pp. 65–69. Ed. by D. MacKinley, and K. Shearer. Physiology Section American Fisheries Society, San Francisco State University.
- García-Rodríguez M. e Esteban A. (1998) - Biometric relationships and growth of hake (*Merluccius merluccius* L.) from the Alicante Gulf. *Rapport de la Commission Internationale de la Mer Mediterranee*, **35**: 434–435.
- García-Rodríguez M. e Esteban A. (2002) - How fast does hake grow? A study on the Mediterranean hake (*Merluccius merluccius* L.) comparing whole otoliths readings and length frequency distributions data. *Sci. Mar.*, **66** (2):145-156.
- Gayanilo, F. C. Jr., Sparre, P., Pauly, D., (2005). FAO-ICLARM Stock Assessment Tools II (FiSAT II). Revised version. User's guide. FAO Computerized Information Series (Fisheries), No. 8. FAO, Rome, 168 pp.
- General Fisheries Commission for the Mediterranean (GFCM) (2009) – Establishment of Geographical Sub-Areas in the GFCM area amending the resolution GFCM/31/2007/2. RES-GFCM/33/2009/2.
- General Fisheries Commission for the Mediterranean (GFCM) (2011) - Scientific Advisory Committee (SAC). 12<sup>th</sup> Session, Subcommittee on Stock Assessment (SCSA). Marseille, France, 7-11 February, 2011.
- General Fisheries Commission for the Mediterranean (GFCM) (2012) - Scientific Advisory Committee (SAC). 13<sup>th</sup> Session, Subcommittee on Stock Assessment (SCSA). Sofia, Bulgaria, 20-24 February, 2012.
- General Fisheries Commission for the Mediterranean (GFCM) (2013) - Scientific Advisory Committee (SAC). 14<sup>th</sup> Session, Subcommittee on Stock Assessment (SCSA). Rome, Italy, 18-20 February, 2013.
- General Fisheries Commission for the Mediterranean (GFCM) (2014) - Scientific Advisory Committee (SAC). 15<sup>th</sup> Session, Subcommittee on Stock Assessment (SCSA). Bar, Montenegro, 3-4 February, 2014.
- González L. (1998) - The life cycle of *Hysterothylacium aduncum* (Nematoda: Anisakidae) in Chilean marine farms. *Aquaculture*, **162**: 173-186.
- Grabda J. (1976) - Studies on the life cycle and morphogenesis of *Anisakis simplex* (Rudolphi, 1809) (Nematoda, Anisakidae) cultured in vitro. *Acta Ichthyol. Piscat.*, **6**: 119-141.

- Gulland J.A., Rosenberg A.A. (1992) – A review of length-based approaches to assessing fish stocks. FAO Fisheries Technical Paper. No. 323. Rome, FAO. 100 pp.
- Gunz P., Mitteroecker P. (2013) – Semilandmarks: a method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix*, **24** (1): 103-109.
- Hartwich G. (1974) – Keys to the genera of the Ascaridoidea. *CIH Keys to the nematode parasites of vertebrates*, **2**: 1-15.
- Hatfield E.M.C. *et al.* (2005) – WESTHER: A multidisciplinary approach to the identification of herring (*Clupea harengus* L.) stock components west of the British Isles using biological tags and genetic markers. ICES Document CM 2005/K:01, 18 pp.
- ICES (2004) – Report of the Study Group on Stock Identity and Management Units of Redfishes (SGSIMUR). 31<sup>st</sup> August – 3<sup>rd</sup> September, 2004, Bergen, Norway. ICES CM 2005/ACFM:10.
- ICES (2010) – Report of the Workshop on Age estimation of European hake (WKAEH), 9-13 November 2009, Vigo, Spain. ICES CM 2009/ACOM: 42. 68 pp.
- ICES (2011) – Report of the Working Group on the Assessment of Southern Shelf stocks of Hake, Monk and Megrim (WGHMM). ICES CM 2011/ACOM:11.625 pp.
- ICES (2012) – Report of the Working Group on the Assessment of Southern Shelf stocks of Hake, Monk and Megrim (WGHMM). ICES CM 2012/ACOM:11. 617 pp.
- ICES (2013a) – Report of the Stock Identification Methods Working Group (SIMWG), 12-14 August 2013, Hamburg, Germany. ICES CM 2013/SSGSUE: 03. 24 pp.
- ICES (2013b) – Report of the Workshop on Age Validation Studies of Gadoids (WKAVSG). 6-10 May 2013, IMEDEA, Mallorca.
- Ihssen P.E., Booke H.E., Casselman J.M., McGlade J.M, Payne N.R., Utter F.M. (1981) – Stock identification: materials and methods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**: 1838 -1855.
- Jungers W.L., Falsetti A.B., Wall C.E. (1995) – Shape, relative size, and size-adjustments in Morphometrics. *Yearb. Phys. Anthropol.*, **38**: 137-161.
- Kabata Z. (1963) - Parasites as biological tags. *Spec. Pub. Int. Comm. North Atlantic Fish.*, **4**: 31-37.

- Karlou-Riga C. (2000) – Otolith morphology and age and growth of *Trachurus mediterraneus* (Steindachner) in the Eastern Mediterranean. *Fish. Res.*, **46**: 69-82.
- Kendall D.G. (1977) – The diffusion of shape. *Adv. Appl. Probab.*, **9** (3): 428-430.
- Klingenberg C.P. (2008). MorphoJ software documentation (Internet). Faculty of Life Sciences, University of Manchester, United Kingdom. Disponibile all'indirizzo: [http://www.flywings.org.uk/MorphoJ\\_page.htm](http://www.flywings.org.uk/MorphoJ_page.htm).
- Klingenberg C.P. (2011) – MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.*, **11**: 353-357.
- Køie M. (1993) - Aspects of the life cycle and morphology of *Hysterothylacium aduncum* (Rudolphi, 1802) (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Can. J. Zool.*, **71**: 1289-1296.
- Korta M., Domínguez-Petit R., Murua H., Saborido-Rey F. (2010a) – Regional variability in reproductive traits of European hake *Merluccius merluccius* L. populations. *Fish. Res.* **104**: 64-72.
- Korta M., Murua H., Kurita Y., Kjesbu O. S. (2010b) – How are the oocytes recruited in an indeterminate fish? Applications of stereological techniques along with advanced packing density theory on European hake (*Merluccius merluccius* L.). *Fish. Res.* **104**: 56-63.
- Kuhn T., García-Márquez J., Klimpel S. (2011) - Adaptive Radiation within Marine Anisakid Nematodes: A Zoogeographical Modeling of Cosmopolitan, Zoonotic Parasites. *PLoS ONE* **6**(12): e28642. doi:10.1371/journal.pone.0028642
- Lachenbruch P.A. (1967) – An almost unbiased method of obtaining confidence intervals for the probability of misclassification in Discriminant analysis. *Biometrics*, **23** (4): 639-645.
- Lagler K.F., Bardach J.E., Miller R.R. (1962) - Ichthyology. John Wiley & Sons.
- Langlois T., Meeuwig J., Fitzpatrick B. (2011) - Lengths frequency distribution of fishes: Comparing sampling methods and assessing effects of marine protected areas (Industry internship) (Internet). Disponibile all'indirizzo: <http://www.ivec.org/programs/eresearch/research-projects/length-frequency-distributions-fishes-comparing-sampling-method>.
- Law R. (2000) – Fishing, selection, and phenotypic evolution. *ICES J. Mar. Sci.*, **57**: 659-668.
- Leaman B.M. e Kabata Z. (1987) - *Neobrachiella robusta* (Wilson, 1912) (Copepoda: Lerneapodidae) as tag for identification of stocks in his host, *Sebastes alutus* (Gilbert, 1890) (Pisces: Teleostei). *Can J. Zool.*, **65**: 2579-2582.

- Levi D., Andreoli M.G., Arneri E., Giannetti G., Rizzo P. (1994) – Otolith reading as a tool for stock identification. *Fish. Res.*, **20**: 97-107.
- Levi D., Patti B., Rizzo P., Lo Brutto S., Parrinello N., Arculeo M. (2004) - Genetic and morphometric variations of Mediterranean hake, *Merluccius merluccius*, in the Strait of Sicily (central Mediterranean): Implications for stock assessment of shared resources. *Ital. J. Zool.*, **71**: 165-170.
- Ligas A., Pierattini C., Viva C., Bertolini D., Belcari P. (2011) – Age estimation and growth of European hake, *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758), in the northern Tyrrhenian Sea. *Atti Soc. tosc. Sci. nat., Mem., Serie B*, **118**: 9-14.
- Lloris D., Matallanas J. & Oliver P. (2005) - Hakes of the world (Family *Merlucciidae*). An annotated and illustrated catalogue of hake species known to date. *FAO Species Catalogue for Fishery Purposes*. No4. Rome, FAO. 57 pp.
- Lo Brutto S., Arculeo M., Parrinello N. (2004) – Congruence in genetic markers used to describe Mediterranean and Atlantic populations of European hake (*Merluccius merluccius* L. 1758). *J. Appl. Ichtyol.* **20**: 81-86.
- MacKenzie K. (1983) - The selection of parasites for use as biological tags in population studies of bluefin tuna. In: Proceedings of the 1982 SCRS Officers Meeting “General Statistics and Methods of Population Analysis”. *Col. Vol. Sci. Pap. ICC AT*, **18**: 834-838.
- MacKenzie K. (1987) - Parasites as indicators of host populations. *Int. J. Parasitol.*, **17**: 345–352.
- MacKenzie K., Campbell N., Mattiucci S., Ramos P., Pinto A.L., Abaunza P. (2008) – Parasites as biological tags for stock identification of Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* L. *Fish. Res.*, **89**: 136-145.
- MacKenzie K., Abaunza P. (2013) – Parasites as biological tags. In: Cadrin S. X., Kerr L.A., Mariani S. (Eds.), *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science (Second Edition)*. Elsevier Academic Press, pp. 185-203.
- Marcus L.F., Corti M., Loy A., Naylor G.J.P., Slice D.E. (eds) (1996) – Advances in Morphometrics. NATO ASI Series A: Life Sciences vol. 284. Plenum: New York..
- Mariani S., Hutchinson W.F., Hatfield E.M.C., Ruzzante D.E., Simmonds E.J., Dahlgren T.G., Andre C., Brigham J., Torstensen E., Carvalho G.R. (2005) – North Sea herring population structure as revealed by microsatellite analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **303**: 245-257.
- Mattiucci S., Abaunza P., Ramadori L., Nascetti G. (2004) - Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. *J. Fish Biol.*, **65**: 495-510.

- Mattiucci S., Farina V., Campbell N., MacKenzie K., Ramos P., Pinto A.L., Abaunza P., Nascetti G. (2008) - *Anisakis* spp. Larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fish. Res.*, **89**: 146-151.
- Mattiucci S. (2010) - *Anisakis* spp ed anisakiasi: dalla genetica molecolare per l'identificazione della specie alla diagnosi nell'uomo. Atti del convegno: "Anisakiasi, prevenire è necessario", Bologna, 09 Giugno 2010.
- Mattiucci S., Cipriani P., Webb S.C., Paoletti M., Marcer F., Bellisario B., Gibson D.I., Nascetti G. (2014) - Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae) *J. Parasitol.*, **100**: 199-214.
- Maynou F., Leonart J., Cartes J.E. (2003) – Seasonal and spatial variability of hake (*Merluccius merluccius* L.) recruitment in the NW Mediterranean Sea. *Fish. Res.*, **60**: 65-78.
- McBride R.S. (2013) – The continuing role of life history parameters to identify stock structure. In: Cadrin S. X., Kerr L.A., Mariani S. (Eds.), *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science (Second Edition)*. Elsevier Academic Press, pp. 77-107.
- McDonald, J.H. 2014. Handbook of Biological Statistics, 3rd ed. Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland (Internet). Disponibile all'indirizzo: <http://www.biostathandbook.com/onewayanova.html#welch>
- MedSudMed (2005) – Report of the Workshop on standardization of fish age determination based on otolith samples in the MedSudMed Project area. GCP/RER/010/ITA/MSM-TD-09. *MedSudMed Technical Documents*, No. 9: 46 pp.
- Mellon-Duval C., De Pontual H., Métral L., Quemener L. (2010) – Growth of European hake (*Merluccius merluccius*) in Gulf of Lions based on conventional tagging. *ICES J. Mar. Sci.* **67**, 62-70.
- Mendoza M., García T., Baro J. (2010) – Using classification trees to study the effects of fisheries management plans on the yield of *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) in the Alboran Sea (Western Mediterranean). *Fish. Res.* **102**: 191-198.
- Morales-Nin B., Aldebert Y. (1997) - Growth of juvenile *Merluccius merluccius* in the Gulf of Lions (NW Mediterranean) based on otolith microstructure and length- frequency analysis. *Fish. Res.* **30**: 77-85.
- Morales-Nin B., Pérez-Mayol S., Palmer M., Geffen A.J. (2014) – Coping with connectivity between populations of *Merluccius merluccius*: An elusive topic. *J. Marine Syst.*, **138**: 211-219.

- Moravec F. (1994) - Parasitic Nematodes of Freshwater Fishes of Europe. Academia and Kluwer Academic Publishers, Prague and Dordrecht, Boston, London, 473 pp.
- Mosimann J.E. (1970) - Size Allometry: Size and Shape Variables with Characterizations of the Lognormal and Generalized Gamma Distributions. *J. Am. Statist. Assoc.*, **65**: 930-945.
- Mosquera J., de Castro M., G6mez-Gesteira M. (2003) - Parasites as Biological Tags of Fish Populations: Advantages and Limitations. *Comm. Theor. Biol.*, **8**: 69-91.
- Murrell K.D. e Fried B. (2007) - Food-borne parasitic zoonoses: Fish and plant-borne parasites. Vol. 11 Springer, New York.
- Murta A.G., Pinto A.L., Abaunza P. (2008) – Stock identification of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) through the analysis of body shape. *Fish. Res.*, **89**: 152-158.
- Murua H., Motos L. (2006) – Reproductive strategy and spawning activity of the European hake *Merluccius merluccius* (L.) in the Bay of Biscay. *J. Fish Biol.* **69**: 1288-1303.
- Nascetti G., Paggi L., Orecchia P., Smith J.W., Mattiucci S., Bullini L. (1986) - Electrophoretic studies on the *Anisakis simplex* complex (Ascaridida: Anisakidae) from the Mediterranean and North East Atlantic. *Int. J. Parasitol.*, **16**: 633-640.
- Oliver P., Alvarez F., Morales-Nin B. (1991) – Report on the age-reading workshop on Mediterranean hake and sardine. Palma de Mallorca, Spain, 10-15 April 1989.
- Oliver P., Massuti E. (1995) – Biology and fisheries of western Mediterranean hake (*Merluccius merluccius*). Hake: Biology, Fisheries, Markets. Ed. J. Ahleite, T. Pitcher. *Fish and Fisheries Science*, 15. Chapman e Hall, London.
- Otxotorena U., Díez G., López de Abechucó E., Santurtún M., Lucio P. (2010) - Estimation of age and growth of juvenile hakes (*Merluccius merluccius* Linnaeus, 1758) of the Bay of Biscay and Great Sole by means of the analysis of macro and microstructure of the otoliths. *Fish. Res.*, **106**: 337-343.
- Panfili J., de Pontual H., Troadec H., Wright P.J. (2002) - Manual of fish sclerochronology. IFREMER-IRD coedition, Brest, France, 464 pp.
- Papetti C., Di Franco A., Zane L., Guidetti P., De Simone V., Spizzotin M., Zorica B., Čikeš Keč V., Mazzoldi C. (2013) - Single population and common natal origin for Adriatic *Scomber scombrus* stocks: evidence from an integrated approach. *ICES J. Mar. Sci.*, **70**: 387–398.
- Pascual S. e Hochberg F.G. (1996) - Marine Parasites as Biological Tags of Cephalopod Host. *Parasitol. Today*, **12**: 324-327

- Pattoura P., Lefkaditou E., Megalofonou P. (2014) – Age estimation of juvenile European hake *Merluccius merluccius* based on otolith microstructure analysis: a slow or fast growth pattern? *J. Fish Biol.* (in press).
- Pawson M.G., Jennings S. (1996) – A critique of methods for stock identification in marine capture fisheries. *Fish. Res.* **25**: 203-217.
- Philips A.E. (2014) - Age composition of the European hake *Merluccius merluccius*, Linnaeus, 1758 from the Egyptian Mediterranean waters off Alexandria. *Egypt. J. Aquat. Res.*, **40**: 163-169.
- Piñeiro C. (2000) – Report on 1<sup>st</sup> international workshop on hake otolith age reading, Vigo, Spain, June 23 – 27, 1997. EFAN Report 6-2000.
- Piñeiro C. *et al.* (2000) – Report of 2<sup>nd</sup> international workshop on hake otolith age reading. Vigo, Spain, 15-19 February, 1999. EFAN Report 7-2000.
- Piñeiro C. e Sainza M. (2003) – Age estimation, growth and maturity of the European hake (*Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758)) from Iberian Atlantic waters. *ICES J. Mar. Sci.*, **60** (5): 1086-1102.
- Piñeiro C. *et al.* (2004) – Report of the 3<sup>rd</sup> workshop on European hake age reading. Instituto Espanol de Oceanografia, Vigo, 18-22 October 2004.
- Piñeiro C., Rey J., Marín M., de Pontual H., Goñi R. (2007) - Tag and recapture of European hake (*Merluccius merluccius* L.) off the northwest Iberian Peninsula: first results support fast growth hypothesis. *Fish. Res.*, **88**: 150–154.
- Primerano E. (2012) – Valutazione del ruolo di differenti habitat nelle prime fasi del ciclo vitale del nasello, *Merluccius merluccius* (Linneo, 1758) nel Mar Ligure e nel Mar Tirreno centro-settentrionale. *Tesi di laurea Magistrale*.
- Radhakrishnan K.V., Yuxuan Li, Jayalakshmy K.V., Ming Liu, Murphy B.R. (2012) – Application of otolith shape analysis in identifying different ecotypes of *Coilia ectenes* in the Yangtze Basin, China. *Fish. Res.*, **125-126**: 156-160.
- Ragonese S., Vitale S., Mazzola S., Pagliarino E., Bianchini M.L. (2012) – Behavior of some growth performance indexes for exploited Mediterranean hake. *Acta Adriat.*, **53** (1): 105-122.
- Rätz, ed. (2004) - Population structure, reproductive strategies and demography of redfish (Genus *Sebastes*) in the Irminger Sea and adjacent waters (ICES V, XII and XIV, NAFO 1). REDFISH QLK5-CT1999-01222 Final Report.
- REDFISH (2000) – REDFISH EU Project (Internet). Disponibile all'indirizzo: <http://www.redfish.de>
- Rizzo P., Gancitano S., Badalucco C., Fiorentino F. (2005) - Age estimation from “hard structures” of exploited marine organisms in the experience of CNR



- Centre of Mazara del Vallo: the procedures adopted and the maximum ages estimated. *MedSudMed Technical Documents* n°9: 10 pp.
- Roldán M.I., García-Marín J.L., Utter F.M., Pla C. (1998) – Population genetic structure of European hake, *Merluccius merluccius*. *Heredity*, **81**: 327-334.
- Rohlf F.J. (1990) – Rotational fit (Procrustes) methods. In: *Proceedings of the Michigan Morphometrics Workshop* (Rohlf F.J. and Bookstein F.L., eds). University of Michigan, Museum of Zoology, pp. 227-236.
- Rohlf F.J., Marcus L.F. (1993) – A revolution in morphometrics. *Trends Ecol. Evol.*, **8** (4): 129-132.
- Rohlf F.J. (2013) - tpsDig version 2.17, Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook, New York. 2013.
- Ricker W.E. (1981) – Changes in the average size and average age of Pacific salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **38**: 1636-1656.
- Sabatini A., Locci I., Deiana A.M., Follesa M.C., Gastoni A., Pendugiu A.A., Pesci P., Cau A. (2013) - Temporal trends in biodiversity of the middle-slope assemblages in Sardinian seas (Central-Western Mediterranean). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **93** (7): 1739-1752.
- Saborido-Rey F., Garabana D., Stransky C., Melnikov S., Shibanov V. (2004) - Review of the population structure and ecology of *S. mentella* in the Irminger Sea and adjacent waters. *Rev. Fish Biol. Fish.* **14**: 455–479.
- Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF) (2011a) - Assessment of Mediterranean Sea stocks, part I (STECF 11-08). 2011. Publications Office of the European Union, Luxembourg, EUR 24902 EN, JRC 66052, 252 pp.
- Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF) (2011b) - Assessment of Mediterranean Sea stocks, part II (STECF 11-14). 2011. Publications Office of the European Union, Luxembourg, EUR 25053 EN, JRC 67797, 252 pp.
- Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF) (2012a) - Assessment of Mediterranean Sea stocks, part II (STECF 13-05). 2013. Publications Office of the European Union, Luxembourg, EUR 25309 EN, JRC 81592, 618 pp.
- Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF) (2012b) - Assessment of Mediterranean Sea stocks, part III (STECF 12-03). 2013. Publications Office of the European Union, Luxembourg, EUR 25309 EN, JRC 70907, 407 pp.

- Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (STECF) (2013) - Assessment of Mediterranean Sea stocks, part I (STECF 13-22). 2013. Publications Office of the European Union, Luxembourg, EUR 26329 EN, JRC 86087, 400 pp.
- Sequeira V., Gordo L.S., Neves A., Paiva R.B., Cabral H.N., Marques J.F. (2010) – Macroparasites as biological tags for stock identification of the bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) in Portuguese waters. *Fish. Res.*, **106**: 321-328.
- Sequeira V., Rodríguez-Mendoza R., Neves A., Paiva R., Saborido-Rey F., Gordo L.S. (2011) – Using body geometric morphometrics to identify bluemouth, *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) populations in the Northeastern Atlantic. *Hydrobiologia*, **669**: 133-141.
- Sequeira V., Neves A., Paiva R.B., de Lima J.P., Vieira A.R. (2012) – Life history parameters as possible discriminators of bluemouth *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) populations in Portuguese waters. *Fish. Res.* **125-126**: 69-76.
- Shaklee J.B., Currens K.P. (2003) – Genetic stock identification and risk assessment. In: Hallerman, E.M. (Ed.), *Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists*. *American Fisheries Society*, Bethesda, pp. 291-328.
- Sinderman C.J. (1961) - Parasites tags for marine fish. *J. Wildl. Manage.*, **25**: 41-47
- Sinderman C.J. (1983) - Parasites as natural tags for marine fish. *NAFO Sci. Council Stud.*, **6**: 63-71.
- Smith P.J., Francis R.I.C.C., McVeagh M. (1991) – Loss of genetic diversity due to fishing pressure. *Fish. Res.* **10**: 309-316.
- Stransky C. (2008) – Otolith shape analysis as a tool for stock separation of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean. *Fish. Res.*, **89**: 159-166.
- Stransky C. (2013) – Morphometric outlines. In: Cadrin S. X., Kerr L.A., Mariani S. (Eds.), *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science (Second Edition)*. Elsevier Academic Press, London, UK. pp. 129-140.
- Strauss R.E., Bookstein F.L. (1982) – The Truss: Body Form Reconstructions in Morphometrics. *Syst. Biol.*, **31** (2): 113-135.
- Swain D.P., Hutchings J.A., Foote C. (2005) - Environmental and genetic influences on stock identification characters. In: Cadrin S.X., Friedland K.D., Waldman J.R. (Eds.), *Stock Identification Methods. Applications in Fishery Science*. Elsevier, Academic press, Amsterdam, pp. 45-85.
- Tanner S.E., Pérez M., Presa P., Thorrold S.R., Cabral H.N. (2014) – Integrating microsatellite DNA markers and otolith geochemistry to assess population

- structure of European hake (*Merluccius merluccius*). *Estuar. Coast. Shelf S.*, **142**: 68-75.
- Trella K.M., Podolska M., Nedreaas K., Janusz J. (2013) – Discrimination of the redfish (*Sebastes mentella*) stock components in the Irminger Sea and adjacent waters based on meristics, morphometry and biological characteristics. *J. Appl. Ichthyol.*, **29**: 341–351.
- Tudela S. (1999) - Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Fish. Res.*, **42**: 229-243.
- Turan C. (2004) - Stock identification of Mediterranean horse mackerel (*Trachurus mediterraneus*) using morphometric and meristic characters. *ICES J. Mar. Sci.*, **61**: 774-781.
- Valero A., del Mar López-Cuello M., Beitez R., Adroher F.J. (2006) - *Anisakis* spp. in European hake, *Merluccius merluccius* (L.) from the Atlantic off north-west Africa and the Mediterranean off southern Spain. *Acta Parasitol.*, **51**: 209-212.
- Von Bertalanffy, L. (1938) - A quantitative theory of organic growth (inquires of growth laws II). *Human Biology* **10**: 181–183.
- Vittori S., Altea P., Agus B., Atzori G., Cau Al., Pesci P. (2013) – Differences in length structures of *Merluccius merluccius* in Sardinian Seas: an evidence for the existence of different stocks? *Biol. Mar. Mediterr.* **20** (1): 208-209.
- Vittori S., Bellodi A., Agus B., Consolo A., Soldovilla G., Follesa M.C., Pesci P. (2014) - Age estimation and back-calculation of fish length of the European hake, *Merluccius merluccius* (Linnaeus, 1758) in Sardinian waters. ICES/CIEM 5th International Otolith Symposium, Mallorca (Spain) 20-24 October 2014. Book of Abstracts: 230-231.
- Ward R.D. (2000) – Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia*, **420**: 191-201.
- WESTHER (2003) – EU-Project WESTHER (Internet). Disponibile all'indirizzo: <http://www.clupea.net/westher>
- Whitehead P.J., Bauchot M.L., Hureau J.C., Nielsen S., Tortonese E. (eds), 1986 - Fishes of the North-Eastern Atlantic and Mediterranean. *UNESCO*, Vol. II-III, pp. 963.
- Würtz M. (2012) – Mediterranean Submarine Canyons: Ecology and Governance. Glang Switzerland and Malaga, Spain: IUCN, 216 pp.
- Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. (2004) – Geometric morphometrics for biologists: A primer. Elsevier Academic Press, San Diego, USA. 443 pp.

Zischke M. T., Griffiths S.P., Tibbetts I.R., Lester R.J.G. (2013) - Stock identification of wahoo (*Acanthocybium solandri*) in the Pacific and Indian Oceans using morphometrics and parasites. *ICES J. Mar. Sci.*, **70**: 164–172.

## *Ringraziamenti*

Desidero ringraziare innanzitutto il Prof. Angelo Cau e la Prof.ssa Cristina Follesa per avermi dato la possibilità di svolgere questo percorso di Dottorato. I tanti consigli ricevuti e le responsabilità affidatemi con fiducia mi hanno permesso di apprendere tanto.

Un ringraziamento va alla Dott.ssa Paola Pesci, per avermi guidata nella realizzazione di questo lavoro e per i preziosi consigli che mi ha dato nel corso di questi anni.

Grazie al Dott. Antonello Mulas, per essere sempre stato disponibile a fornire aiuto e consigli, e al Dott. Jacopo Culurgioni, per il suo preziosissimo contributo allo svolgimento dell'analisi parassitologica, insieme a tutto il personale della sezione di Biologia animale del Dipartimento di Scienze della Vita e dell'Ambiente.

Non posso non dedicare un pensiero speciale ai miei compagni di avventura: i Dottori Blondine Agus, Giulia Atzori (compagna di studi, di stanza e di ansia!), Simone Buttu, Alessandro Cau e Martina Marongiu, che mi hanno accompagnata in questo percorso, a volte molto difficile, sin dalla Laurea Specialistica. Abbiamo potuto condividere le preoccupazioni e i momenti di ansia, ma soprattutto siamo riusciti a ridere e divertirci tanto nonostante il lavoro impegnativo, non succede spesso di poter lavorare circondati da amici!

Un saluto va alla mia coinquilina e amica Anita, sempre disponibile ad aiutarmi e a sopportarmi nei momenti di stress.

Un grazie davvero grande va ovviamente al mio ragazzo e collega Andrea, per il grande aiuto che mi ha dato nel portare avanti questo lavoro e soprattutto per essere stato sempre al mio fianco quando avevo bisogno di qualcuno su cui contare. Grazie per essere riuscito a sopportarmi e addirittura aiutarmi nel periodo più stressante anche per te.

Infine, vorrei dedicare l'ultimo ringraziamento alla mia famiglia, in particolare ai miei genitori. Siete stati e continuate ad essere i miei punti di riferimento, e tutto quello che ho imparato ed ottenuto finora non sarebbe stato possibile senza di voi. Grazie dell'appoggio incondizionato e del grande esempio che mi date.