

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze ambientali: tutela e gestione delle risorse naturali

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 05/B1

Settore Scientifico disciplinare: BIO05

**Identificazione di possibili unità di stock di
Anguilla anguilla mediante analisi
microchimica e morfometrica degli otoliti**

Presentata da

dott. Marco Stagioni

Coordinatore Dottorato

Prof. Enrico Dinelli

Relatore:

Prof. Fausto Tinti

Esame finale anno 2015

Indice

1	Introduzione	1
1.1	La scienza della pesca e la nozione di stock	1
1.1.1	Popolazione	1
1.1.2	Stock	3
1.2	Otoliti	3
1.2.1	Localizzazione e funzione	4
1.2.2	Composizione	4
1.2.3	Morfologia	6
1.2.4	Fattori biologici che influenzano la morfologia degli otoliti	7
1.2.5	Effetti della conservazione sulla morfologia degli otoliti	9
1.2.6	Microchimica	10
1.2.7	Morfometria	11
1.2.8	Microstruttura	12
1.3	<i>Anguilla anguilla</i>	13
1.3.1	Ciclo biologico	13
1.3.2	Tipologie di sfruttamento	15
1.3.3	Interazioni tra pesca e allevamento	16
1.3.4	Stato dello stock	17
1.3.5	Impatti sullo stock	19
1.3.6	Interazioni a livello globale	22
1.3.7	Azioni in campo	23
1.4	Piano di gestione nazionale e piani regionali	25
2	Scopo della tesi	27
3	Materiali e metodi	29
3.1	Campionamento	29
3.1.1	Albegna (Albe)	30
3.1.2	Bonello (Bone)	30
3.1.3	Chioggia (Chio)	30
3.1.4	Comacchio (Coma)	30
3.1.5	Fano (Fano)	31
3.1.6	Orbetello (Orbe)	31
3.1.7	Spagna (Spag)	31
3.1.8	Succi (Succ)	31
3.1.9	Noghera (Nogh)	32
3.2	Biometria	37

3.3	Estrazione scaglie	37
3.4	Estrazione e pulizia otoliti	38
3.5	Acquisizione immagini digitali	39
3.6	Inclusione e lavorazione otoliti	40
3.7	Etching	42
3.8	SEM	42
3.9	LA-ICP-MS	42
3.10	Morfometria	44
3.11	Analisi dati	45
4	Risultati	47
4.1	Biometria	47
4.2	Estrazione e pulizia otoliti	52
4.3	Inclusione e lavorazione otoliti	52
4.4	Etching	56
4.5	Lettura età	56
4.6	SEM	63
4.7	LA-ICP-MS	66
4.8	Morfometria	78
5	Discussione	85
	Bibliografia	91

Elenco delle figure

1.1	Schema della localizzazione dell'orecchio interno di un pesce osseo e delle tre coppie di otoliti (modificato da Campana, 2004)	5
1.2	Posizione degli otoliti e delle membrane nell'orecchio interno: Ast, asterisco; Lag, lagena; Lap, lapillo; Sac, sacco; Sag, sagitta; Semi, canali semicircolari del labirinto, Utr, utricolo (modificato da Campana, 2004)	5
1.3	Fotografia in luce riflessa delle tre coppie di otoliti di un adulto di <i>Morone americana</i> : l'otolite sinistro è a sinistra di ogni coppia (da Campana, 2004)	6
1.4	Immagine al SEM di una sagitta di <i>Melanogrammus aeglefinus</i> e relativa terminologia morfologica (da Campana, 2004)	8
1.5	Immagine al SEM di un asterisco (a sinistra) e di un lapillo (a destra) di <i>Gadus morhua</i> (da Campana, 2004)	8
1.6	(a) – Sequenza ontogenetica che mostra il cambiamento in forma e dimensione di sagitte di <i>Melanogrammus aeglefinus</i> dalla larva di 36 giorni (in alto) all'adulto di 7 anni di età (in basso). Le immagini sono state scalate per esigenze tipografiche, fare riferimento alla barra di scale. FL, lunghezza alla forca (da Campana, 2004), (b) – relazione tra lunghezza pesce e lunghezza sagitta di <i>Merluccius bilinearis</i> (da Campana, 2004)	9
1.7	(a) – Morfologia di sagitte di <i>Merluccius bilinearis</i> rinvenuti in contenuti stomacali di foca che mostrano la graduale dissoluzione (da Campana, 2004), (b) – otolite fossile di <i>Lopholatilus chamaeleonticeps</i> del pliocene perfettamente conservato.	10
1.8	(a) – Ciclo biologico di <i>Anguilla anguilla</i> : eggs – uova, leptocephalus – leptocefalo, glass eel – ceca, elver – ragano, yellow eel – anguilla gialla, silver eel – anguilla argentina, spawning eel – anguilla in riproduzione, freshwater – acqua dolce, ocean – oceano. (b) – Area di riproduzione e limite di distribuzione delle larve di anguilla europea (linee continue) e dimensioni in millimetri [Schmidt, 1922]	15
1.9	Stima del reclutamento medio basato su 12 serie storiche e scalato alla media degli anni 1960-1979 su scala logaritmica [ICES, 2014]	19
1.10	Numero ceche (milioni) a scopo di ripopolamento in Europa [ICES, 2014].	20
1.11	Numero ragani (milioni) a scopo di ripopolamento in Europa [ICES, 2014].	20

1.12	Produzione da acquacoltura di anguille nei Paesi europei, periodo 1950-2005 (dati FAO, 2006)	21
1.13	Catture di anguilla nei Paesi europei, 1950-2004 (dati FAO, 2004)	21
1.14	Catture di anguilla in acque lagunari mediterranee, 1950-2004 (dati FAO, 2004)	21
1.15	Catture di anguilla in Italia in ambienti lagunari e nelle acque interne (dati FAO, 2004)	22
3.1	Siti di campionamento di <i>Anguilla anguilla</i>	32
3.2	Dettaglio caratteristiche ambientali dei siti di campionamento: (a) – Albegna (Albe), (b) – Bonello (Bone).	33
3.3	Dettaglio caratteristiche ambientali dei siti di campionamento: (a) – Chioggia (Chio), (b) – Comacchio (Coma).	34
3.4	Dettaglio caratteristiche ambientali dei siti di campionamento: (a) – Fano (Fano), (b) – Orbetello (Orbe).	35
3.5	Dettaglio caratteristiche ambientali dei siti di campionamento: (a) – Succi (Succ), (b) – Noghera (Nogh).	36
3.6	Stima dell'età: (a) mediante lettura discontinuità su otoliti e (b) su scaglie.	37
3.7	(a) Grattaggio delle scaglie dalla regione cefalica. (b) Scaglie montate su vetrino e osservate al microscopio ottico in luce trasmessa	38
3.8	(a) Estrazione degli otoliti dalla scatola cranica. (b) Stoccaggio degli otoliti estratti in microtubi opportunamente etichettati.	39
3.9	Immagini digitali di una coppia di sagitte acquisita attraverso stereo microscopio	40
3.10	Montaggio degli otoliti in goccia di resina epossidica su vetrino	41
3.11	Montaggio degli otoliti su stub per indagini elettroniche al microscopio a scansione: (a) – prima e (b) – dopo metallizzazione con oro.	43
3.12	Campione di otolite levigato e sottoposto ad analisi di ablazione laser, notare i 4 spot nella regione centrale (35 μm) e lungo il transetto dalla regione centrale al bordo (50 μm)	44
3.13	Esempio di processamento immagini automatico per individuazione contorno	45
4.1	Relazione lunghezza peso degli esemplari giovanili e adulti.	48
4.2	Relazione lunghezza peso degli esemplari giovanili e adulti separati per sito di campionamento.	50
4.3	Relazione lunghezza peso degli esemplari giovanili e adulti separati per sito di campionamento linearizzata mediante applicazione del logaritmo alle variabili.	51
4.4	Boxplot della distribuzione delle lunghezze totali degli esemplari campionati: (a) – adulti, (b) – ceche e ragani.	51
4.5	Relazione lunghezza peso di ceche e ragani	53
4.6	Relazione lunghezza peso di ceche e ragani separati per sito di campionamento	54

4.7	Relazione lunghezza peso di ceche e ragani separati per sito di campionamento linearizzata mediante applicazione del logaritmo alle variabili	55
4.8	Esempio di campioni con etching da HCl: (a) – ceca di rimonta naturale, (b) – ceca d'importazione.	57
4.9	Immagini al microscopio ottico di otoliti di ceca sottoposti ad etching con EDTA (in alto a destra) e HCL (in basso a destra). Notare il diverso colore della zona nucleare.	57
4.10	Esempio di scaglie osservate in uno stesso individuo: (a) una singola discontinuità, (b) e (c) 4 discontinuità ma con forma diversa, (d) 5 discontinuità (valore massimo per questo individuo).	59
4.11	Distribuzione del numero di scaglie con lettura massima sul totale di quelle lette.	60
4.12	Relazione età lunghezza totale degli individui.	61
4.13	Immagini di otoliti di ceca di importazione spagnola sottoposti ad etching con EDTA: A - immagine al microscopio ottico, B - panoramica al SEM, C - dettaglio al SEM della regione nucleare: notare la zona scura ricca in proteine, l'evidente discontinuità corrispondente al FFC ("first feeding check") e gli incrementi giornalieri regolari, D - zona esterna al nucleo con evidenti discontinuità di accrescimento giornalieri, E - zona diffusa senza anelli di accrescimento, F - discontinuità dovute all'ingresso in acque a salinità e temperatura diversa (normalmente più dolci e fredde).	64
4.14	Immagine al SEM della regione nucleare di otolite di ceca con evidenti discontinuità giornaliere.	65
4.15	Boxplot della distribuzione delle concentrazioni degli elementi in tracce ottenuti dall'analisi chimica degli otoliti raggruppati per spot: <i>a</i> - zona nucleare, <i>b – c – d</i> zona perinucleare.	67
4.16	Ordinamento PCA delle concentrazioni elementari degli spot <i>b – c – d</i> (zona perinucleare).	68
4.17	Ordinamento PCA delle concentrazioni elementari dello spot <i>a</i> (zona nucleare) e <i>m</i> (media degli spot perinucleari <i>b – c – d</i>).	68
4.18	Ordinamento PCA delle concentrazioni elementari dello spot <i>a</i> (zona nucleare), <i>m</i> (media degli spot perinucleari <i>b – c – d</i>), <i>p1</i> (fine della fase migratoria), <i>p2</i> (metamorfosi ceca-ragano), <i>p</i> (zona continentale).	69
4.19	Boxplot della distribuzione delle concentrazioni degli elementi in tracce ottenuti dall'analisi chimica degli otoliti raggruppati per spot: <i>a</i> - zona nucleare, <i>m</i> zona perinucleare (media di <i>b – c – d</i>), <i>p1</i> limite della zona "oceanica" o "migratoria", <i>p2</i> zona della "metamorfosi" ceca-ragano, <i>p</i> zona continentale.	70
4.20	Ordinamento PCA delle concentrazioni elementari dello spot <i>a</i> (zona nucleare), nei campioni di otoliti di individui nati nel 2010.	71
4.21	Ordinamento PCA delle concentrazioni elementari dello spot <i>m</i> (zona perinucleare), nei campioni di otoliti di individui nati nel 2010.	71
4.22	Profili di concentrazione di ⁷ Li lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)	72

4.23	Profili di concentrazione di ^{11}B lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)	73
4.24	Profili di concentrazione di ^{23}Na lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)	73
4.25	Profili di concentrazione di ^{25}Mg lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)	74
4.26	Profili di concentrazione di ^{55}Mn lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)	74
4.27	Profili di concentrazione di ^{59}Co lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)	75
4.28	Profili di concentrazione di ^{63}Cu lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)	75
4.29	Profili di concentrazione di ^{88}Sr lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)	76
4.30	Profili di concentrazione di ^{138}Ba lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)	76
4.31	Profili di concentrazione di ^{208}Pb lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)	77
4.32	Profili di concentrazione di Sr/Ba lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)	77
4.33	Boxplot della distribuzione dei valori dei principali parametri ottenuti dall'analisi morfometrica classica sul contorno degli otoliti.	78
4.34	Relazione tra lunghezza degli individui e Feret degli otoliti per sito di campionamento.	79
4.35	Contorni acquisiti dalle immagini degli otoliti: (a) contorni centrati sui baricentri, (b) contorni centrati e scalati alla stessa dimensione media.	80
4.36	Stima del numero ottimale delle armoniche: (a) per via grafica, (b) mediante potenza cumulata dei coefficienti armonici: esprime la bontà di adattamento della forma riparametrizzata rispetto all'originale.	80
4.37	Scostamento sui singoli punti del contorno (120 scelti casualmente lungo il contorno – in ordinata) tra forma ricostruita e originale, N–numero di armoniche.	81
4.38	Contorni ricostruiti con EFA e 20 armoniche: (a) contorni centrati sui baricentri, (b) contorni centrati e scalati alla stessa dimensione media.	81
4.39	Contorni medi (EFA) per sito: a sinistra i contorni originali riparametrizzati e a destra quelli scalati (invarianti per taglia).	82
4.40	Contorni medi (EFA) per età. A sinistra i contorni originali riparametrizzati e a destra quelli scalati (invarianti per taglia).	82
4.41	Ordinamento PCA dei contorni degli otoliti mediante analisi EFA raggruppati per sito: (a) – contorni centrati, (b) – contorni scalati.	83
4.42	Ordinamento PCA dei contorni degli otoliti mediante analisi EFA raggruppati per età: (a) – contorni centrati, (b) – contorni scalati.	84
4.43	Ordinamento PCA dei contorni degli otoliti mediante analisi EFA raggruppati per sesso: (a) – contorni centrati, (b) – contorni scalati.	84

Elenco delle tabelle

3.1	Tabella sinottica della consistenza, tipologia e modalità di cattura degli esemplari catturati nei vari siti di campionamento	29
4.1	Tabella sinottica della distribuzione per sesso nelle località di campionamento.	47
4.2	Tabella sinottica della distribuzione di taglia per località di campionamento degli esemplari giovanili e adulti. LT - lunghezza totale in mm, dev. std. - deviazione standard.	49
4.3	Tabella sinottica della distribuzione di peso per località di campionamento degli esemplari giovanili e adulti. Peso - peso in g, dev. std. - deviazione standard.	49
4.4	Tabella sinottica della distribuzione di taglia per località di campionamento di ceche e ragani. LT - lunghezza totale in mm, dev. std. - deviazione standard.	52
4.5	Tabella sinottica della distribuzione di peso per località di campionamento di ceche e ragani. Peso - peso in g, dev. std. - deviazione standard.	52
4.6	Coefficienti della regressione lineare lunghezza-peso: b - pendenza della retta di regressione, b_{inf} - limite inferiore al 95% di confidenza, b_{sup} - limite superiore al 95% di confidenza, R^2 - coefficiente di determinazione.	56
4.7	Composizione per età degli esemplari campionati per sito: lettura di scaglie.	58
4.8	Composizione per età degli esemplari campionati per sito: lettura di otoliti.	58
4.9	Stima dell'anno di nascita: calcolato mediante differenza tra la data di cattura e la lettura dell'età con otoliti. Il tempo di migrazione è stato omesso e considerato costante.	62

Sommario

L'anguilla europea, è una specie eurialina catadroma con un complesso ciclo biologico: l'area di riproduzione, unica, si trova molto distante da quella di distribuzione. La specie necessita di una gestione dello stock a fini conservazionistici. Il problema è europeo: lo stock è unico, distribuito in Europa e nell'Africa settentrionale, si riproduce in Atlantico ed è panmittico. C'è preoccupazione per il declino del reclutamento e delle catture di adulti. Lo scopo del progetto è di individuare possibili unità di stock nella penisola italiana. La ricerca è basata sullo studio degli otoliti mediante analisi morfometrica e microchimica. I contorni degli otoliti sono sottoposti ad analisi ellittica di Fourier per individuare eventuali gruppi. Gli otoliti sono stati levigati per effettuare: letture d'età, indagini microstrutturali al SEM delle fasi larvali, analisi microchimiche LA-ICP-MS del nucleo, studiarne l'origine e valutare l'ambiente di sviluppo. Le indagini morfometriche mostrano evidenti pattern ontogenetici, ma non legati o correlati alla località, sesso o anno di nascita. Le indagini microstrutturali hanno evidenziato l'alto contenuto organico nucleare, un pattern comune di crescita ed eventi chiave delle fasi larvali, con una media di 212 anelli giornalieri. La microchimica rivela che le larve si sviluppano in acque salate fino alla metamorfosi, poi migrano verso acque più dolci. Le analisi su campioni nati nello stesso anno, evidenziano due gruppi: individui di rimonta naturale e individui di ripopolamento. I profili nucleo bordo evidenziano la permanenza a salinità intermedie degli adulti. L'attività di ricerca si è dimostrata proficua dal punto di vista tecnico con la messa a punto di protocolli innovativi e con forti ricadute sulla riduzione dei tempi e costi d'analisi. Il debole segnale di possibili unità di stock andrà verificato in futuro mediante analisi più dettagliate discriminando meglio la storia di ogni singolo individuo.

Abstract

The European eel is euryhaline catadromous with a complex life cycle: spawning area, unique, is far from that of distribution. The species needs a stock management and its conservation. The problem is European: the stock is unique, distributed in Europe and North Africa, spawning in Atlantic Sea and is panmictic. There is concern about the decline of recruitment and catches of adults. The purpose of the project is to identify possible units of stock in the Italian peninsula. The research is based on the study of otoliths by morphometric and microchemical analyses. The otoliths contours are analyzed by elliptic Fourier function to discover any groups. Otoliths were polished to make: ageing, SEM microstructural investigations of larval stages, LA-ICP-MS microchemical analysis of the core to study the origin and along a transect core to edge to evaluate the development environment. Morphometric investigations show obvious ontogenetic pattern, but no location, gender or year of birth correlation. The microstructural investigations showed high organic content in the core, a common pattern of growth and key events of the larval stages, with an average of 212 daily rings. The microchemical reveals that the larvae develop into salt water until metamorphosis, then migrate to waters less salty. Analyses of samples born in the same year, showed two groups: wild and restocked. The profiles confirm that the adult stay in brackishwater. The development of innovative protocols and improved technics have guaranteed a strong reduction of time and cost of analysis. The weak signal of possible stock units will be further tested through more detailed analysis discriminating about the life history of each individual.

Capitolo 1

Introduzione

1.1 La scienza della pesca e la nozione di stock

La scienza della pesca o alieutica è quella disciplina che studia in modo omni-comprendivo i diversi aspetti bioecologici, biodinamici, popolazionistici, tecnologici ed economico-sociali che riguardano l'attività di cattura, le catture stesse, gli strumenti utilizzati e la filiera economico-sociale connessa. In particolare la biologia della pesca studia non solo gli aspetti tassonomici, ecologici e biologici delle specie oggetto di cattura o di prelievo ma anche i cambiamenti demografici che si verificano all'interno degli stock ittici come effetto delle catture stesse. Ci si avvale perciò degli strumenti teorico pratici della dinamica di popolazione [Ricker, 1981]. Per fare questo però è necessario la conoscenza descrittiva e funzionale delle principali attrezzature da pesca (selettività, taglia di prima cattura, ecc.) e gli aspetti di regolamentazione della pesca stessa.

1.1.1 Popolazione

Il concetto di popolazione è un concetto chiave in ecologia, in biologia evolutiva e della conservazione: come conseguenza della vastità e complessità dei temi trattati da queste discipline, nel tempo sono state formulate numerose definizioni di popolazione. Una possibile schematizzazione delle principali definizioni è stata sintetizzata da [Waples e Gaggiotti, 2006] ed è riportata di seguito.

Definizione di popolazione

Paradigma ecologico

- Un gruppo di organismi della stessa specie che occupano un determinato spazio in un certo tempo
- Un gruppo di individui della stessa specie che vivono insieme in un'area sufficiente alle loro esigenze riproduttive, di sopravvivenza e migrazione
- Un gruppo di organismi che occupano una specifica area geografica o bioma

- Un insieme di individui che vivono in una parte di un habitat ed interagiscono con gli organismi della parte restante
- Un gruppo di individui sufficientemente isolati in cui l'immigrazione non modifica sostanzialmente la dinamica di popolazione o il rischio di estinzione nell'arco di 100 anni

Paradigma evolutivo

- Una comunità di individui di specie che si riproducono sessualmente e in cui avviene l'accoppiamento
- La maggior parte dell'ambiente in cui si svolge la selezione
- Un gruppo di individui che si incrociano stabilmente nel tempo e nello spazio
- Un gruppo di organismi conspecifici che occupano una regione geografica più o meno definita e mostrano continuità nella riproduzione di generazione in generazione
- Un gruppo di individui della stessa specie che vivono sufficientemente vicini da garantire il possibile accoppiamento tra qualunque appartenente al gruppo stesso

Paradigma statistico

- Un aggregato sul quale può essere fatta inferenza mediante campionamento
- La totalità delle osservazioni individuali su cui può essere fatta inferenza statistica, all'interno di una specifica area di campionamento limitata nel tempo e nello spazio

Varianti

- Stock: specie, gruppo o popolazione di pesci che si mantengono e sostengono in un'area definita nel tempo
- Unità demografica: hanno storie demografiche diverse
- Demi: unità evolutive separate
- Gruppi d'interazione: in base alla distanza che un individuo può coprire durante la fase non dispersive della sua vita
- Popolazione naturale: può essere limitata solo da barriere ecologiche o genetiche naturali
- Popolazione locale:
 - individui che hanno una possibilità di interagire ecologicamente e riproduttivamente con altri membri del gruppo
 - alcuni membri possono emigrare o immigrare da altri gruppi locali

1.1.2 Stock

Negli studi di dinamica il concetto di popolazione è alquanto astratto e privo di utilità pratica perchè troppo ampio. Si usa invece il concetto di stock. Lo stock ha un'accezione statistica cioè la quantità di biomassa o numero di individui e una ecologica cioè ad una determinata area definibile ecologicamente [Cadrin et al., 2014]. La pesca cattura determinate quantità di risorse, in una determinata area, che può essere caratterizzata ecologicamente (correnti, natura del fondo, livello trofico, ecc.) e lo stock rappresenta la parte di popolazione sfruttabile oggetto della pesca. Gli elementi di uno stock possono appartenere ad una o più specie e nell'ambito della stessa specie a più gruppi in diverse aree. Si parla quindi di stock multispecifico, quando comprende più specie catturate nella stessa area, come nel caso dei bacini ad elevata biodiversità quali il Mediterraneo. La nozione di popolazione è legata a considerazioni biologiche mentre lo stock allo sfruttamento. La popolazione è un'unità genetica e lo stock (insieme all'area in cui vive) rappresenta l'unità di gestione. Quando lo stock è un sistema isolato dal punto di vista biologico-gestionale esso costituisce un'entità indipendente e si parla di unità di stock o stock unitario. Questo concetto è estremamente importante per l'armonizzazione delle strategie di gestione degli stock condivisi da paesi diversi. Quando dal punto di vista ecologico i confini per delimitare uno stock sono incerti o non definibili, si può usare la genetica come metodo discriminante nell'ambito della popolazione per definire eventuali subunità di stock. Ovviamente due stock geneticamente distanti possono costituire unità biologico-gestionali diverse. Normalmente la distanza genetica è anche una distanza spaziale ma non in tutti i casi. Anche dal punto di vista della conservazione della biodiversità l'identificazione degli stock è molto importante. Molti degli approcci tecnici volti a definire gli stock per la pesca sono validi anche per la conservazione delle specie.

1.2 Otoliti

Gli otoliti sono piccole strutture biomineralizzate che si trovano nella zona cefalica di tutti i pesci, a parte squali, razze e lamprede. Nonostante siano localizzati all'interno della testa vicino al cervello, essi non sono attaccati direttamente al cranio, ma sono contenuti in un sistema tubolare trasparente dell'orecchio interno chiamato canale semicircolare del labirinto. Nei pesci gli otoliti forniscono il senso dell'equilibrio come l'orecchio interno degli umani ed inoltre aiutano anche nella percezione dei suoni [Popper e Lu, 2000]. Per la biologia della pesca gli otoliti sono uno dei più importanti strumenti per comprendere la vita dei pesci e delle popolazioni. Gli anelli di crescita (annuli) come quelli degli alberi registrano l'età e l'accrescimento di un pesce dalla schiusa alla morte [Casselman, 1987]. Gli incrementi giornalieri formati nel primo anno di vita poi forniscono un'incredibile registrazione a livello microscopico della storia degli individui [Campana e Neilson, 1985]. Inoltre analisi chimiche e microelementari consentono la ricostruzione di tutta la vita degli individui: schiusa, traiettorie di migrazione, identità di popolazione, temperatura dell'acqua [Campana, 1999]. Quindi negli otoliti è racchiusa virtualmente tutta la storia di vita di un individuo. Per questo gli otoliti sono studiati nella maggior

parte dei laboratori che si occupano di biologia della pesca e servono per la messa a punto di modelli di analisi strutturati per età indispensabili allo studio della dinamica di popolazione [Fossum et al., 2000; Secor et al., 1995; Summerfelt e G. E. Hall, 1987]. Gli otoliti hanno una forma distintiva che è altamente specie specifica e varia ampiamente tra specie [Maisey, 1987].

1.2.1 Localizzazione e funzione

L'orecchio interno è il principale organo vestibolare nei pesci e in altri vertebrati, deputato al bilanciamento, all'orientamento tridimensionale nello spazio [Popper e Lu, 2000] e alla percezione dei suoni. È situato vicino al cervello in una sede, spesso dedicata (invaginazione) del neurocranio [Popper e Lu, 2000] (Fig: 1.1 a fronte). L'organo è composto da una serie di canali semicircolari intercomunicanti riempiti da un fluido traslucido (endolinfa). L'intera struttura sembra delicata, ma è sorprendentemente resistente. L'architettura dell'orecchio interno varia con la specie, ma la struttura generale presenta delle caratteristiche comuni: tre coppie di camere ognuna delle quali contiene un otolite (Fig: 1.1 nella pagina successiva e Fig: 1.2 a fronte). Dato che gli otoliti sono gli unici corpi solidi all'interno dell'endolinfa, gli otoliti eccitano le camere all'interno delle quali sono contenuti in base alla posizione, inclinazione e accelerazione dell'individuo. L'otolite interagisce con la camera mediante un epitelio sensoriale (macula) attraverso la membrana otolitica [Popper e Platt, 1993]. Questo epitelio sensoriale è il diretto responsabile del rilevamento della posizione e del suono. Tutti gli otoliti sembrano condividere la funzione vestibolare e di rilevamento dei suoni nonostante il rapporto tra le due funzioni possa variare con l'otolite. In generale i lapilli sembrano essere associati più alla posizione e le sagitte al suono. Le tre coppie di otoliti tendono ad avere taglia e forma rappresentativi della camera nella quale sono contenuti (Fig: 1.2 nella pagina successiva). Ogni sacculo contiene una sagitta, che è spesso l'otolite più grande in quasi tutti i pesci ossei. Sacculo e sagitta di ogni lato sono generalmente nella parte ventrale e posteriore del cervello. In posizione leggermente posteriore rispetto al sacculo si trova la lagena che contiene l'asterisco. In posizione considerevolmente anteriore si trova invece l'utricolo che contiene il lapillo. Quest'ultimi sono generalmente i più piccoli tra gli otoliti Fig: 1.3 a pagina 6).

1.2.2 Composizione

Gli otoliti in confronto alle altre strutture biologiche mineralizzate sono molto pure e sono composte principalmente da carbonato di calcio CaCO_3 in una matrice organica. La maggior parte degli otoliti contengono più del 95% in peso di CaCO_3 , 3–5% di matrice organica e meno dell'1% di elementi in tracce. Gli elementi in tracce e gli isotopi stabili sono oggetto di numerosi studi e consentono la ricostruzione della storia ambientale di sviluppo, migrazione e identità di popolazione dei pesci [Campana, 1999]. Il CaCO_3 può cristallizzare in una delle tre forme polimorfiche: calcite, aragonite e vaterite. Comunque la maggior parte delle sagitte e lapilli sono composte da aragonite che ha un'apparenza bianco-lattea [Campana, 1999; Carlstrom, 1963; Oliveira et al., 1996]. Al contrario l'otoconia dei mammiferi è composta da calcite. Curiosamente il polimorfismo del CaCO_3 è collegato ai

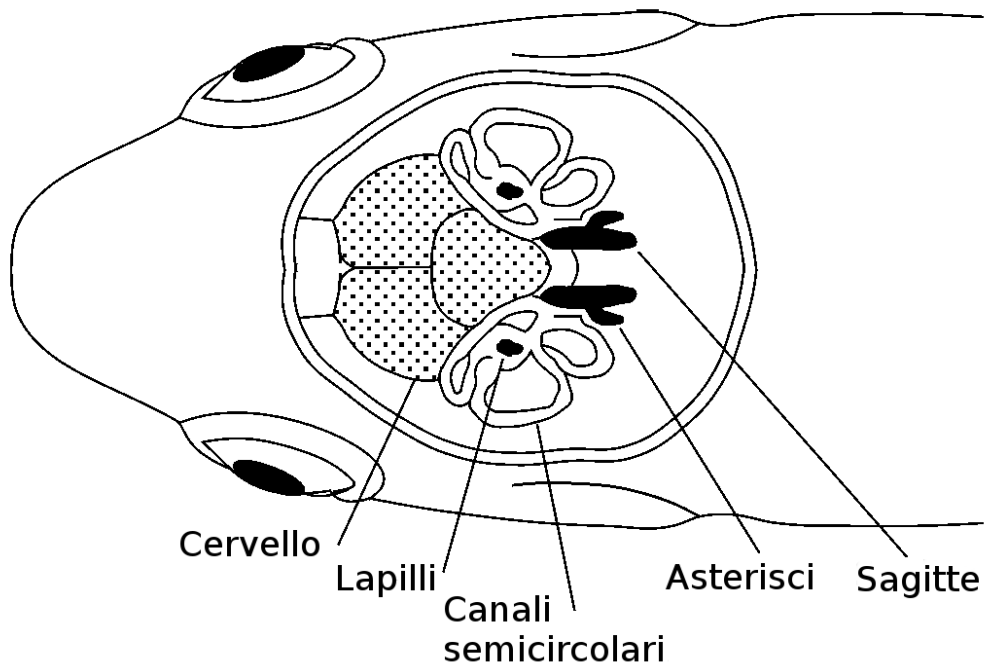


Figura 1.1: Schema della localizzazione dell'orecchio interno di un pesce osseo e delle tre coppie di otoliti (modificato da [Campana, 2004](#))

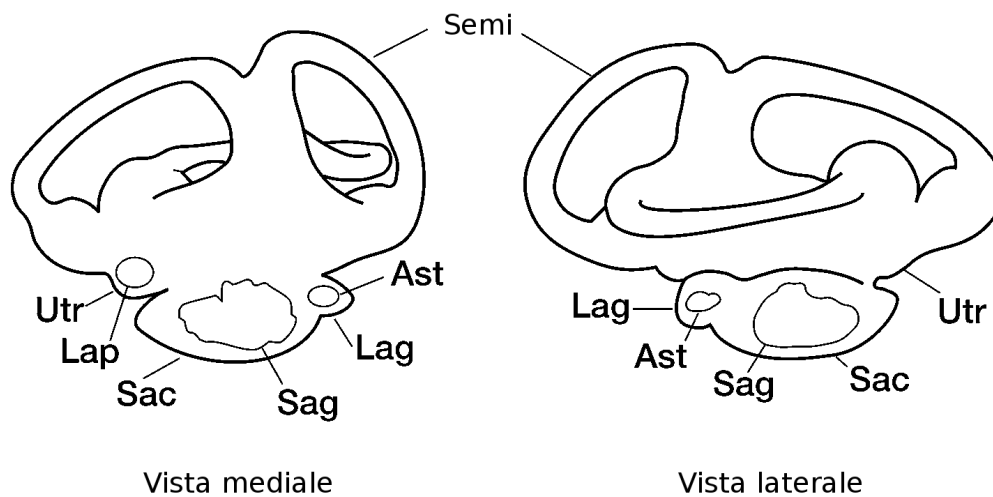


Figura 1.2: Posizione degli otoliti e delle membrane nell'orecchio interno: Ast, asterisco; Lag, lagena; Lap, lapillo; Sac, sacculo; Sag, sagitta; Semi, canali semicircolari del labirinto, Utr, utricolo (modificato da [Campana, 2004](#))

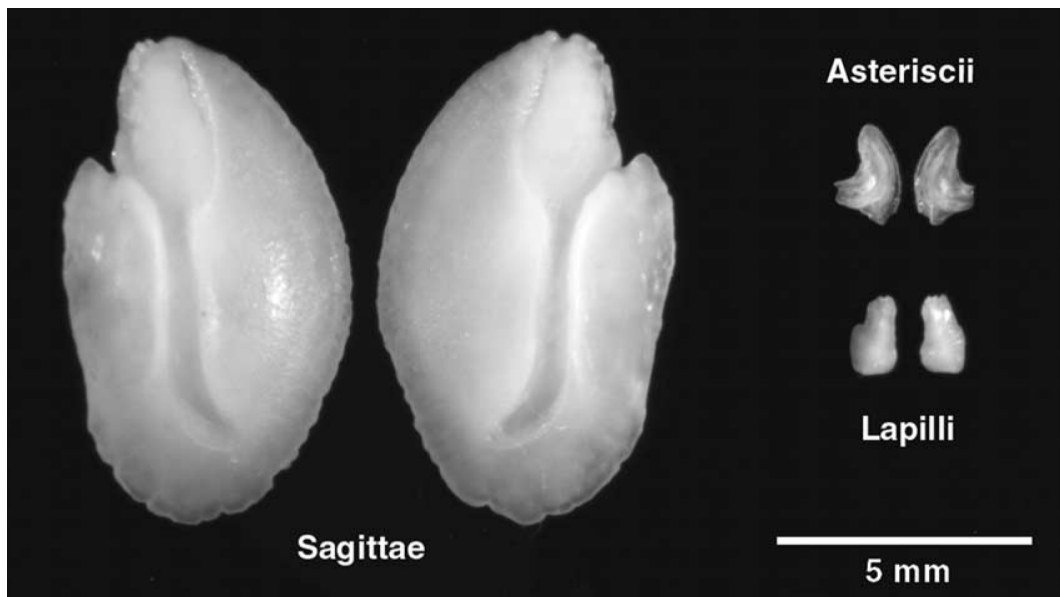


Figura 1.3: Fotografia in luce riflessa delle tre coppie di otoliti di un adulto di *Morone americana*: l'otolite sinistro è a sinistra di ogni coppia (da [Campana, 2004](#))

differenti otoliti: mentre l'aragonite è ad appannaggio di sagitte e lapilli, la maggior parte degli asteriscii è composta da vaterite e sono perciò di aspetto vetroso e traslucido [[Oliveira et al., 1996](#)]. La vaterite è anche la principale forma polimorfica negli otoliti aberranti o cristallini [[Mugiya, 1972](#)]. La calcite è invece estremamente rara negli otoliti. La natura carbonatica degli otoliti è alla base della loro buona conservazione nel tempo, specialmente quando sono asciutti, ma ambienti anche debolmente acidi portano alla loro dissoluzione parziale o totale.

1.2.3 Morfologia

Le tre coppie di otoliti differiscono marcatamente nella forma e nell'aspetto. Nella maggior parte dei pesci adulti, le sagitte sono la coppia più grande e i lapilli i più piccoli (Fig: 1.3). Al contrario gli asteriscii sono più grandi delle sagitte nei pesci ostariofisi (superordine appartenente alla classe degli Actinopterygii che raggruppa a sé l'ordine dei Cypriniformes). La forma delle sagitte varia con la specie mentre i lapilli sono più uniformi. La variabilità della forma degli asteriscii è intermedia tra i due precedenti. Nella coppia di otoliti il sinistro e il destro sono molto simili ma non identiche immagini speculari l'uno dell'altro. Curiosamente asteriscii sinistro e destro possono differire in modo sostanziale rispetto alle altre coppie di otoliti [[Campana e Casselman, 1993](#)]. L'orientamento e la nomenclatura delle parti anatomiche di una sagitta sono mostrate in (Fig: 1.4 a pagina 8). Rostro, antirostro e postirostro sono caratteristiche trasversali di tutte le sagitte, nonostante taglia ed estensione possano variare sostanzialmente tra specie. Il solco, che rappresenta il punto di inserzione della macula sensoriale, è un'ulteriore caratteristica peculiare delle sagitte. L'ultrastruttura e la morfologia del solco acustico sono molto importanti dal punto di vista tassonomico [[Nolf, 1985](#); [Smale et al., 1995](#)]. Un'intricata morfologia è evidente anche nell'immagine al SEM degli asteriscii (Fig: 1.5 a pagina 8), ma molto

meno in quella dei lapilli. Differenze interspecifiche nella forma di lapilli e asterisci potrebbero essere usate in modo complementare a quelle delle sagitte. Comunque a causa delle ridotte dimensioni di lapilli e asterisci per poter apprezzare le differenze morfologiche è obbligatorio utilizzare immagini ad alta risoluzione (SEM). In tutte le specie la forma e la taglia degli otoliti cambiano sostanzialmente con la crescita. Nelle giovani larve gli otoliti tendono ad essere di forma sferoidale, ovoidale o discoidale. Sagitte e lapilli sono presenti alla schiusa nella maggior parte delle specie mentre gli asterisci compaiono dopo 2–3 settimane. Negli stadi precoci di sviluppo larvale le dimensioni delle tre coppie di otoliti possono essere invertite con i lapilli più grandi delle sagitte [Campana, 1989]. Gli otoliti acquisiscono le loro caratteristiche morfologiche in età giovanile ma possono poi cambiare negli esemplari adulti e particolarmente longevi. Quando si identifica una specie è quindi importante considerare sia la forma che la taglia degli otoliti. Dato che la funzione principale degli otoliti è quella di fornire indicazioni sulla posizione e accelerazione degli individui, la taglia degli otoliti cresce al crescere degli individui stessi (Fig: 1.6 a pagina 9. Quasi sempre quindi assistiamo ad una forte relazione tra la taglia dell'otolite e dell'individuo [Hunt, 1992]. Dalla taglia degli otoliti è quindi possibile stimare quella del pesce a cui appartiene. Questa stima può essere grossolana dato che la regressione taglia otolite–taglia pesce differisce tra popolazioni o gruppi di pesci con differenti tassi di crescita [Campana, 1990].

1.2.4 Fattori biologici che influenzano la morfologia degli otoliti

Ci sono molteplici fattori biologici che influenzano o moderano la forma degli otoliti. Questi fattori agiscono a diverse scale dal livello filogenetico a quello di singoli individui. Alcuni di questi fattori sono ben conosciuti ma molti altri no. Non ci sono principi filogenetici conosciuti che guidano la forma degli otoliti [Maisey, 1987]. Anche se esistono caratteristiche ascrivibili a famiglie o generi è spesso impossibile predire la forma degli otoliti per una data specie. Esistono comunque relazioni funzionali: i grandi nuotatori (piccoli e grandi pelagici) in grado di effettuare notevoli accelerazioni, tendono ad avere piccoli otoliti. Tonni e pesci spada sono buoni esempi di questo concetto tanto che un tonno di 400 kg ha otoliti più piccoli di un merluzzo di 1 kg. Specie in grado di emettere e quindi di percepire suoni, come i membri della famiglia Sciaenidae, hanno gli otoliti più grandi in proporzione alle dimensioni del corpo. Al contrario le famiglie degli Ostariofisi, che possiedono una catena di ossicoli di Weberian per migliorare la percezione del suono, hanno sagitte più piccole e asterisci più grandi della norma. All'interno della specie, la dimensione e forma degli otoliti può variare col sesso, popolazione e tasso di crescita così come lo stadio di crescita ontogenetica. La magnitudine della differenza in taglia dovuta all'ontogenesi è sempre maggiore di quella associata a sesso, popolazione e tasso di crescita, dato che quest'ultime possono essere rilevate solo attraverso indagini statistiche [Campana e Casselman, 1993; Cardinale et al., 2004]. In generale all'interno della coppia di otoliti il sinistro e il destro sono molto simili anche se non l'immagine speculare l'uno dell'altro. Questa asimmetria è particolarmente evidente nei pesci piatti, nei quali un occhio migra sullo stesso

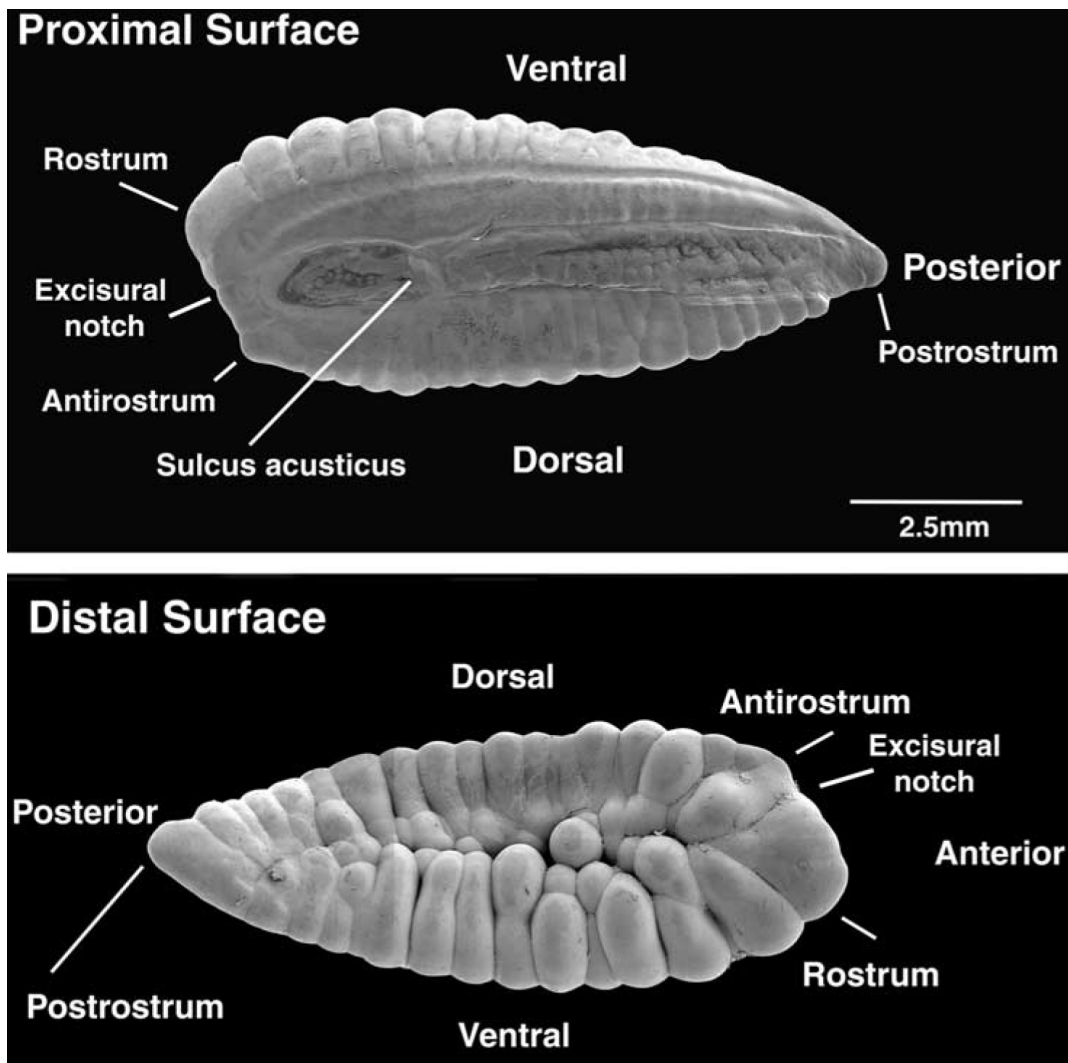


Figura 1.4: Immagine al SEM di una sagitta di *Melanogrammus aeglefinus* e relativa terminologia morfologica (da Campana, 2004)

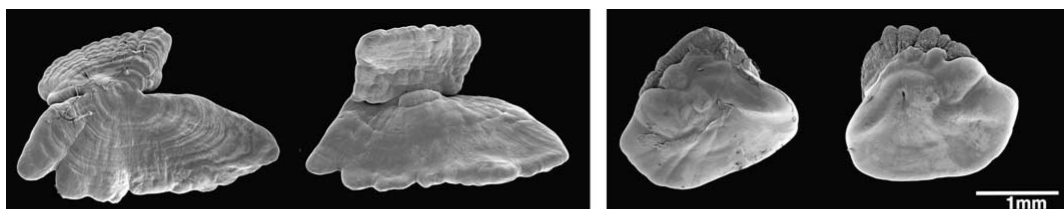


Figura 1.5: Immagine al SEM di un asterisco (a sinistra) e di un lapillo (a destra) di *Gadus morhua* (da Campana, 2004)

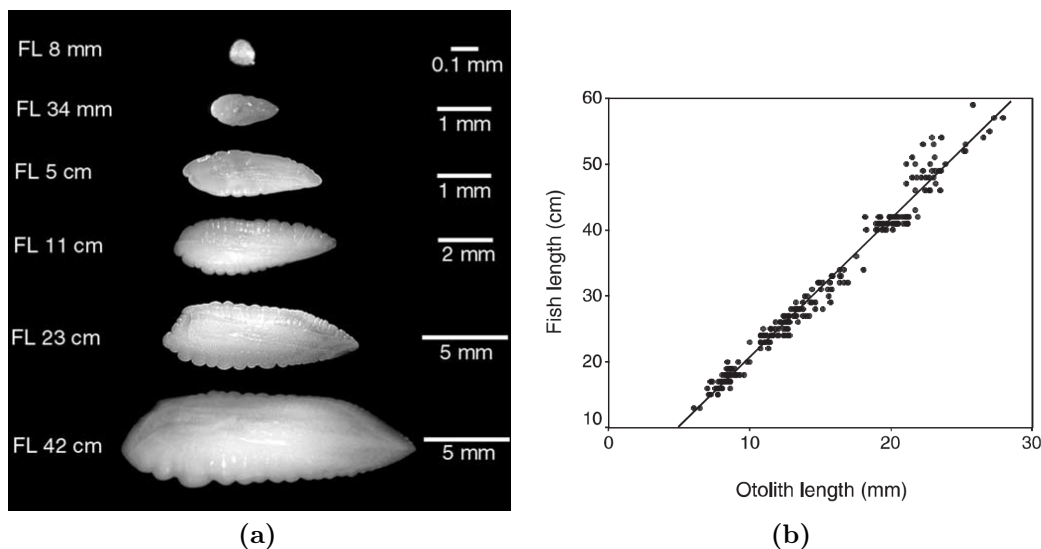


Figura 1.6: (a) – Sequenza ontogenetica che mostra il cambiamento in forma e dimensione di sagitte di *Melanogrammus aeglefinus* dalla larva di 36 giorni (in alto) all'adulto di 7 anni di età (in basso). Le immagini sono state scalate per esigenze tipografiche, fare riferimento alla barra di scale. FL, lunghezza alla forca (da Campana, 2004), (b) – relazione tra lunghezza pesce e lunghezza sagitta di *Merluccius bilinearis* (da Campana, 2004)

lato del corpo durante la metamorfosi che porta poi a raggiungere il fondo. La presenza o il grado di simmetria sembra variare tra individui ed è più evidente in quelli di taglia maggiore. Generalmente la sagitta che si trova sul lato superiore dei pesci piatti ha forma più irregolare ed è più spessa dell'altra. La funzionalità di questa asimmetria è sconosciuta ma presumibilmente collegata alla ridotta o alterata funzionalità di uno dei due otoliti.

1.2.5 Effetti della conservazione sulla morfologia degli otoliti

Forma e taglia degli otoliti rinvenuti dal contenuto stomacale o dalle feci dei predatori è stata a lungo utilizzata per ricostruire la composizione in specie e taglia della dieta [Barrett et al., 1990; Bowen et al., 1993; Burns et al., 1998; Dolloff, 1993; Jobling e Breiby, 1986; Murie e Lavigne, 1985; Pierce et al., 1991]. In molti casi ci sono poche alternative, dato che gli otoliti sono spesso i soli resti animali che possono essere identificati a livello di specie. Comunque ci sono limitazioni: studi condotti su predatori alimentati con prede note hanno dimostrato che la dissoluzione causata dalla digestione introduce forti errori nella ricostruzione della taglia e delle specie dallo studio degli otoliti [Bowen, 2000; Cottrell et al., 1996; Dellinger e Trillmich, 1988; Tollit et al., 1997]. Il risultato è essenzialmente una sottostima del contributo dei pesci alla dieta: gli otoliti piccoli e fragili, o di piccoli individui, sono più suscettibili alla dissoluzione durante la digestione e anche se questa non è totale la forma degli otoliti può cambiare drasticamente e rendere impossibile l'identificazione tassonomica (Fig: 1.7 nella pagina successiva). Sorprendentemente otoliti fossili perfettamente conservati (Fig: 1.7 nella pagina seguente) possono servire a identificare antichi assemblaggi [Elder et al., 1996], a

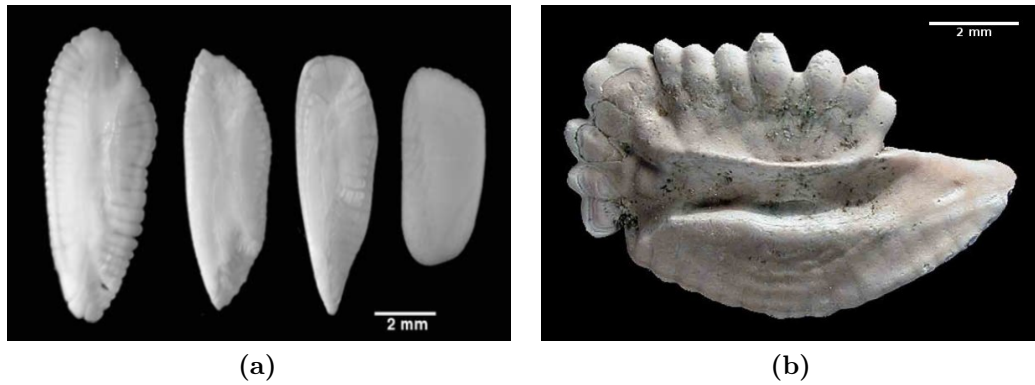


Figura 1.7: (a) – Morfologia di sagitte di *Merluccius bilinearis* rinvenuti in contenuti stomacali di foca che mostrano la graduale dissoluzione (da Campana, 2004), (b) – otolite fossile di *Lopholatilus chamaeleonticeps* del pliocene perfettamente conservato.

datate strati sedimentari [Gaemers, 1984], a ricostruire popolazioni storiche [Hales e Reits, 1992], a supporto degli studi filogenetici [Nolf, 1995], a ricostruire paleoclimi [Andrus et al., 2002; Ivany et al., 2000] e a fornire indicazioni su antichi insediamenti umani [Van Neer et al., 1993].

1.2.6 Microchimica

Lo studio della composizione chimica delle strutture calcificate e l'applicazione dei risultati ottenuti è alla base delle ricerche sugli otoliti. C'è stato un notevole incremento in queste ricerche negli ultimi anni [Campana, 2005; Campana e Thorrold, 2001]. Le singolari caratteristiche cronologiche e le proprietà chimiche degli otoliti continuano ad attrarre l'attenzione degli scienziati, spaziando dalla scienza della pesca alla palaeobiologia. Tali ricerche si focalizzano sulla composizione organica ed inorganica degli otoliti, isotopi ed elementi in tracce, sviluppo di strumentazioni analitiche, identificazione degli stock, migrazione, tratti della vita e ricostruzioni ambientali. Tutto questo a diversi livelli cronologici passando per tutti i gradi di risoluzione temporale: giorni, anni, decenni, millenni [Begg, Campana et al., 2005]. Gli incrementi giornalieri nelle strutture calcificate non sono così comuni come quelli annuali e sono caratteristici di un ristretto gruppo di specie nelle quali l'ambiente di deposizione della struttura può essere controllato dagli organismi senza un conseguente riassorbimento. Gli otoliti sono un esempio di tali strutture. La presenza di incrementi giornalieri facilmente identificabili fornisce un valido strumento per la stima dell'età della maggior parte delle larve e consente di stimare la data di schiusa e quindi di deposizione [Campana e Neilson, 1985]. Comprendere il processo che porta all'incorporazione degli elementi nelle strutture calcificate aiuta ad interpretare i risultati ottenuti. Osservazioni sull'andamento della chimica degli otoliti durante l'ontogenesi hanno rivelato che in nasello esistono differenze tra la composizione della regione nucleare e quella esterna [Morales-Nin et al., 2005]. Diversamente non ci sono differenze ontogenetiche nel rapporto Sr:Ca in sparidi catturati o allevati in laboratorio [Elsdon e Gillanders, 2005]. Un'applicazione

comune della chimica degli otoliti è la ricostruzione dei movimenti ontogenetici e l'identificazione degli stock. Molti studi hanno dimostrato l'utilità della chimica degli otoliti per tracciare i movimenti degli individui, il cambiamento di abitudini durante il corso della vita, la struttura degli stock e la connettività delle popolazioni [Daverat et al., 2005; Dorval et al., 2005; Fowler e K. C. Hall, 2005; Hobbs et al., 2005; McCulloch et al., 2005; Stransky et al., 2005; Tzeng, Severin, Wang et al., 2005]. Altri studi hanno consentito di discriminare pesci allevati da quelli naturali della stessa specie [Gillanders e Joyce, 2005]. Altri hanno esaminato la possibilità di marcare in massa individui con opportuni marcatori [Niva et al., 2005]. Le premesse comuni a questi studi sono che le strutture esaminate hanno proprietà uniche. Gli otoliti diversamente da altre strutture calcificate crescono in continuazione, sono metabolicamente inerti (non vengono cioè rimaneggiate durante la vita), non sono in diretto contatto con il mezzo esterno ma l'incorporazione degli elementi riflette le condizioni ambientali nei quali gli individui risiedono [Campana e Neilson, 1985; Chang e Geffen, 2013; Fowler et al., 1995], la temperatura [Marohn, Hilge et al., 2011] e l'alimentazione [Marohn, Prigge et al., 2009]. Con queste premesse la composizione elementare degli otoliti è un marcatore della relazione specie-ambiente di crescita. I rapporti isotopici di elementi come stronzio [Kennedy et al., 1997] e ossigeno [Thorrold et al., 1997] sono influenzati sia dalla disponibilità che dalla temperatura. I cambiamenti ambientali, registrati in modo permanente negli otoliti, possono così essere letti in individui che hanno vissuto per un lasso di tempo sufficiente in ambienti diversi. Il risultato è che la composizione elementare può essere considerata un tracciante per gruppi di pesci sia di acqua dolce che di mare. La presenza di variazioni geografiche nella temperatura e chimica dell'acqua, entrambe responsabile della diversa composizione degli otoliti, suggerisce che l'analisi di tali strutture possa discriminare bene gruppi di pesci vissuti in ambienti sufficientemente diversi. Non tenendo in considerazione la componente genetica però non è detto che si possa parlare di unità di stock corrispondenti a diverse composizioni chimiche. L'ontogenesi e l'età degli individui può portare a composizioni chimiche molto diverse fra individui di classe di taglia diverse della stessa popolazione [Kerr e Campana, 2014].

1.2.7 Morfometria

Come accennato precedentemente l'identificazione degli stock è una componente essenziale della moderna scienza della pesca [Begg e Waldman, 1999] e ci sono molte tecniche appropriate tra cui scegliere [Begg, Friedland et al., 1999; Cadrin et al., 2014; Ihssen et al., 1981]. Tra questa la morfometria geometrica è uno strumento robusto in grado di analizzare la forma sia dal punto di vista fisiologico che morfologico [Adams et al., 2004]. La forma definita come modello composto dai vari attributi di un oggetto è un aspetto di fondamentale importanza nelle indagini morfologiche [Chen et al., 2000]. Nello studio dei pesci le componenti dell'aspetto sono per esempio taglia, colore, forma e motivo. Tutte queste vengono utilizzate per identificare e classificare gli individui in particolari gruppi [Adams et al., 2004; Ihssen et al., 1981]. Gli otoliti contengono caratteristiche che sono stock specifiche [Ihssen et al., 1981] e sono i candidati ideali per un'analisi morfometrica data la limitata variabilità individuale nei confronti di quella somatica [Campana e

Casselman, 1993]. Vari metodi sono stati usati per descrivere e confrontare le forme in studi morfometrici: rapporti di dimensioni lineari, griglie ortogonali, matrici di distanze euclidee, "thin plate splines", "eigen shape analysis" e alcune varianti dell'analisi di Fourier [Adams et al., 2004; Chen et al., 2000]. L'analisi ellittica di Fourier rappresenta un metodo preciso per descrivere e caratterizzare i contorni di una forma, catturandone efficientemente le informazioni in maniera quantificabile [Kuhl e Giardina, 1982; Lestrel, 2008]. Questo metodo non richiede la definizione di punti omologhi o equidistanti lungo il contorno della forma e si adatta anche a forme complesse rispetto ad altri metodi quali la funzione polare di Fourier o l'analisi dei "landmarks" [Bird et al., 1986; Campana e Casselman, 1993; Castonguay et al., 1991; Torres et al., 2000]. Il limite dell'analisi polare di Fourier è data dal vincolo che ogni raggio baricentrico può intersecare una sola volta il contorno e in forme complesse, particolarmente convolute come alcuni otoliti, questa condizione non è rispettata.

1.2.8 Microstruttura

Le informazioni biologiche come longevità, età alla prima riproduzione e tassi di crescita al livello di singola specie e individuo sono basate fundamentalmente sui dati ottenuti dalla lettura degli incrementi annuali degli otoliti. La gestione degli stock monospecifici è fondata sull'età e sui dati di crescita stimati in base alle analisi effettuate sugli otoliti ed hanno una lunga tradizione nel campo della biologia della pesca. Si sono così messi a punto numerosi protocolli per la lettura degli incrementi annuali per la maggior parte delle specie di interesse commerciali oggetto di valutazione delle risorse. Nel ultimi decenni però l'attenzione dei ricercatori si sta spostando sui primi stadi di sviluppo degli individui. Recentemente si sta cercando di correlare i tratti di vita delle forme giovanili alle condizioni ambientale per cercare di modellare la dispersione e la colonizzazione degli individui. Questo grazie agli studi pionieristici sull'esistenza degli incrementi depositati giornalmente negli otoliti [Pannella, 1971; Stevenson e Campana, 1992]. La microstruttura giornaliera ci consente una chiave di lettura della "scatola nera" otolite rendendo possibile identificare i processi ecologici ed oceanografici fondamentali per il reclutamento, crescita e dinamica di una popolazione. Questi processi non solo influenzano la sopravvivenza delle fasi larvali dei pesci ma anche degli assemblaggi di specie a loro associati, consentendo un approccio ecosistemico alla gestione delle risorse. La risoluzione temporale della microstruttura degli otoliti rende possibile tracciare nel tempo e nello spazio gran parte della "life history" degli individui. È così possibile definire con relativa precisione la data e la durata della deposizione e schiusa delle uova, quantificare la fase planctonica e l'eventuale settlement (discesa al fondo) delle larve, tracciare i movimenti delle fasi giovanili verso le zone di concentrazione ("nursery area") e arrivare perfino a seguire l'eventuale migrazione nelle zone di riproduzione e deposizione degli adulti. Tutte queste informazioni integrate con quelle della pressione di pesca possono essere utilizzate per gestire in modo efficiente le aree di pesca e l'eventuale costituzione di zone di rispetto temporali o spaziali (regolamentazione della pesca) quali le aree marine protette [Botsford et al., 2009]

1.3 *Anguilla anguilla*

L'Anguilla europea, *Anguilla anguilla*, è una specie eurialina catadroma, il cui ciclo biologico è piuttosto complesso (Fig: 1.8 a pagina 15). Si tratta di un organismo marino, la cui area di riproduzione, unica, si trova molto distante dall'areale di distribuzione. Per questa specie è ormai ampiamente riconosciuta la necessità di intervento e di adozione di misure finalizzate alla gestione dello stock nonché alla sua conservazione. La portata del problema è su scala europea, in quanto la specie è costituita da uno stock unico, distribuito in tutto il continente europeo oltre che sulle coste settentrionali dell'Africa, che si riproduce in Oceano Atlantico e per il quale è al momento accettata l'ipotesi di panmissia, sulla base della ridotta variabilità genetica in rapporto alla scala geografica, confermata di recente [Andrello, Bevacqua, De Leo et al., 2006; Andrello, Bevacqua, Maes et al., 2011; Daemen et al., 2001; Dannewitz et al., 2005; Lintas et al., 1998; Palm et al., 2009; Pujolar, De Leo et al., 2009; Wirth e Bernatchez, 2001]. Lo sfruttamento da pesca dell'anguilla viene esercitato in tutto l'areale della specie e riguarda gli stadi giovanili e preadulti, ma la conservazione dello stock dipende dal reclutamento e dall'emigrazione dei riproduttori in mare. La pesca dell'anguilla è, nella maggior parte dei casi, una pesca a scala artigianale locale, mentre la trasformazione e la commercializzazione sono a scala più ampia, anche internazionale. L'allevamento dell'anguilla è praticato in molti paesi, per una produzione a livello europeo che ammonta a circa 8.000 tonnellate. Qualunque sia la tecnologia di allevamento (estensiva, intensiva, iperintensiva), la produzione dipende completamente dal seme selvatico, visto che la riproduzione artificiale, sebbene attuata a livello sperimentale, non va oltre la larva precoce. Per questa specie migratrice, ormai riconosciuta come una risorsa condivisa tra i vari Stati europei e del bacino del Mediterraneo, esiste una diffusa preoccupazione in relazione ad un vistoso e prolungato declino del reclutamento diffuso in tutto il continente e alla contrazione delle catture di anguille adulte in molti sistemi idrografici interessati dalla pesca di questa specie [Dekker, 2003a,b,c, 2004; ICES, 2014]. Nel 1998 è stato dichiarato in sede comunitaria che "lo stock è oltre i limiti biologici di sicurezza" e da allora ha avuto inizio il dibattito sull'identificazione di possibili linee per la gestione, sia in sede comunitaria che nell'ambito di organi tecnici.

1.3.1 Ciclo biologico

L'Anguilla europea (*Anguilla anguilla* L., 1758) è una specie che può essere definita altamente migratoria. Il suo ciclo biologico (Fig: 1.8 a pagina 15), chiarito negli anni '20 dallo studioso danese Johannes Schmidt, è considerato unico in relazione all'ampiezza della migrazione riproduttiva degli adulti e della migrazione larvale. La riproduzione avviene nell'Oceano Atlantico (Fig: 1.8 a pagina 15), e precisamente nel Mar dei Sargassi dove Schmidt rinvenne le larve di dimensioni più piccole [Schmidt, 1922]. Dopo la schiusa, le larve, denominate leptocefali, sono con tutta probabilità trasportate attraverso l'Atlantico dalla Corrente del Golfo: questa migrazione, passiva, ha una durata presunta di circa due anni, anche se studi più recenti compiuti sulla microstruttura di otoliti di ceche suggeriscono che la migrazione possa avvenire anche in meno di un anno [Bonhommeau, Blanke et al.,

2009; Bonhommeau, Castonguay et al., 2010; Bonhommeau, Le Pape et al., 2009; Desaunay e Guerault, 1997; Kettle e Haines, 2006; Kuroki et al., 2008; Lecomte-Finiger, 1992; Wang e Tzeng, 2000]. Al limite della piattaforma continentale europea, i leptocefali compiono una vera e propria metamorfosi, divenendo ceche, piccole anguilline trasparenti. A questo stadio le anguille colonizzano le acque costiere e continentali di tutte le coste Atlantiche e Mediterranee; il loro passaggio attraverso lo stretto di Gibilterra, come anche la fuoriuscita degli adulti, non sono mai stati osservati. La “rimonta” delle ceche costituisce il reclutamento per tutti i sistemi idrografici, siano essi lagune costiere, estuari e fiumi, canali e piccoli corsi d’acqua, laghi e bacini artificiali. Il passaggio dal mare alle acque continentali avviene con un meccanismo chiamato “selective tidal transport”, STT [McCleave e Wippelhauser, 1982]: le ceche non sono ancora in grado di nuotare attivamente, non avendo ancora attivato la vescica natatoria, ma usano movimenti verticali per spostarsi nella massa d’acqua in estuario, approfittando così della marea montante che le trasporta attraverso l’estuario. Nel corso di questa fase le ceche vanno incontro ad una serie di cambiamenti fisiologici ma anche comportamentali, divenendo pigmentate e capaci di nuotare attivamente. La fase successiva, chiamata di anguilla gialla in relazione alla livrea che l’animale assume nel corso dell’accrescimento, ha una durata molto variabile, che va dai 3 agli 8 anni per i maschi e dai 5 ai 15 anni per le femmine. Il pattern di crescita è estremamente variabile proprio in relazione alla grande varietà di habitat che l’anguilla può colonizzare. La maturazione sessuale inizia mentre le anguille sono ancora nelle acque continentali, e lo sviluppo delle gonadi va di pari passo con modificazioni a carico di vari organi e della livrea, tanto è vero che l’anguilla in questa fase è detta argentina. A questo stadio viene intrapreso, con la “smontata”, il ritorno verso il mare, ma della migrazione in ambiente oceanico non si sa nulla, anche se si ritiene che l’anguilla deponga una sola volta [Davidsen et al., 2011; Grassi, 1896; Lowe, 1952; Palstra, Guerrero et al., 2011; Tesch, 2003; van Ginneken e Maes, 2005; Westin, 1998]. Quello descritto è il ciclo biologico accettato al momento, e questo implica che si tratta di uno stock unico, che dipende dall’emigrazione dei riproduttori dai vari bacini idrografici dell’intero areale di distribuzione. Quest’ultimo comprende tutta l’Europa, e l’intero bacino Mediterraneo, estendendosi quindi dalla Scandinavia al Nord Africa, e dal Mediterraneo orientale alle Azzorre. Nel complesso, l’estrema uniformità genetica di questa specie ittica conferma la panmissia [Als et al., 2011; Dannewitz et al., 2005; Palm et al., 2009; Wirth e Bernatchez, 2001]. Ultimamente questa ipotesi è stata riesaminata nel dettaglio, anche grazie all’uso di nuove tecniche di genetica e nuovi marcatori molecolari. Alla fine degli anni ’90, alcuni studiosi canadesi avevano osservato, esaminando anguille provenienti da varie zone geografiche, alcune differenze [Wirth e Bernatchez, 2001], e avevano messo in dubbio la panmissia dell’anguilla. Indagini molto recenti, in realtà hanno evidenziato che ci sono differenze molto limitate tra le anguille provenienti dalle varie parti dell’areale di distribuzione, e che le differenze in realtà sono più legate ad una scala temporale che non ad una scala spaziale [Dannewitz et al., 2005]. Quindi l’ipotesi di un’unica area di riproduzione appare confermata, e questo pone implicazioni importanti nell’ottica di impostare strategie per la gestione della specie, in quanto si tratta di una specie marina e altamente migratoria.

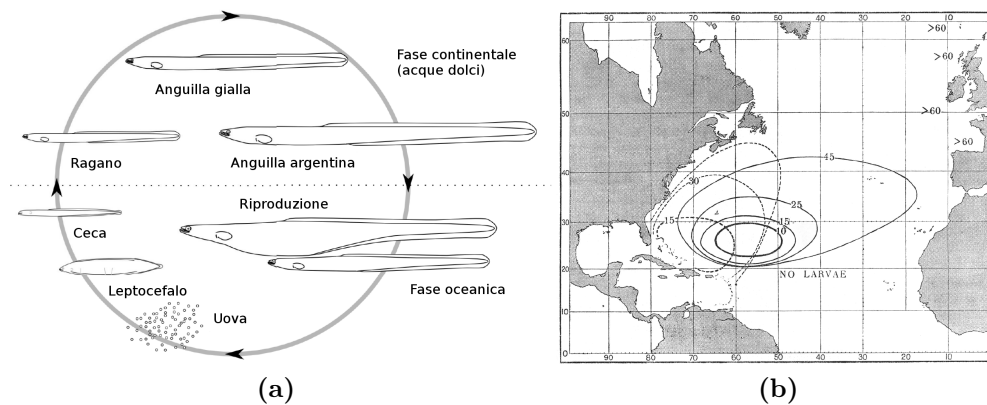


Figura 1.8: (a) – Ciclo biologico di *Anguilla anguilla*: eggs – uova, leptocephalus – leptocefalo, glass eel – ceca, elver – ragano, yellow eel – anguilla gialla, silver eel – anguilla argentina, spawning eel – anguilla in riproduzione, freshwater – acqua dolce, ocean – oceano. (b) – Area di riproduzione e limite di distribuzione delle larve di anguilla europea (linee continue) e dimensioni in millimetri [Schmidt, 1922]

1.3.2 Tipologie di sfruttamento

Lo sfruttamento da pesca dell'anguilla viene esercitato in tutto l'areale di distribuzione della specie, e riguarda gli stadi giovanili e pre-adulti (ceca, anguilla gialla in accrescimento, anguilla argentina non ancora matura sessualmente). La pesca di questa specie viene esercitata, come già accennato, in una grande varietà di ambienti (laghi, fiumi, estuari, lagune costiere) con una grande varietà di tecniche, che vanno da ami e reti di vari disegni, anche in relazione a tradizioni locali, al lavoriero tipico delle lagune. Le attività di pesca nei singoli paesi dipendono da un lato dalla disponibilità di anguille ai vari stadi e dall'altro dalle tradizioni di mercato o di consumo. Laddove vi è una intensa rimonta di ceche, come nei grandi estuari francesi del Golfo di Biscaglia, in Spagna e Portogallo, esistono situazioni di pesca di ceche a livello professionale, dirette al commercio per il consumo diretto, ma anche per fornire seme ad allevamenti e per il ripopolamento. Le anguille gialle sono oggetto di pesca praticamente in tutta l'Europa e il Nord Africa, mentre la pesca dello stadio di argentina, catturato nel corso della migrazione verso il mare sia lungo il corso dei fiumi che nelle lagune costiere, avviene un po' ovunque, ma è più concentrata in Scandinavia e nelle lagune mediterranee. La maggior parte della pesca professionale in Europa e nel bacino del Mediterraneo è di piccola scala. Le realtà di scala industriale sono rare; ad esse ammonta meno del 5% delle catture a livello europeo [Dekker, 2000b]. Ha un ruolo importante anche la pesca ricreativa. La trasformazione e il commercio sono organizzati in compagnie di grandi dimensioni e operano alla scala internazionale [Dekker, 2000b]. Per quanto riguarda più specificamente l'Italia [Ciccotti, Busilacchi et al., 2000], la pesca nelle acque interne è presente nei principali fiumi e laghi della penisola. La maggior parte delle catture, per lo più anguille gialle, deriva dai grandi laghi alpini del Nord Italia, ma l'anguilla è una specie bersaglio anche in molti laghi vulcanici dell'Italia centrale e in alcuni fiumi. La pesca delle ceche è presente in Italia, e viene

praticata quasi totalmente sulle coste Tirreniche dell'Italia centrale (Toscana, Lazio, Campania), presso foci di fiumi e canali. Si tratta sia di pescatori che operano a livello locale che di gruppi più organizzati, provenienti anche da altre regioni, soprattutto dalle marinerie Adriatiche, che raggiungono le aree di pesca con camion equipaggiati con ossigenatori, in modo da poter trasportare, anche per lunghi tratti, gli avannotti delle varie specie eurialine, tra cui l'anguilla. I pescatori locali sono generalmente singoli o riuniti in cooperative e sono equipaggiati con barche e strutture in grado di mantenere in vivo il pescato. Il pattern di sfruttamento di anguilla più tipico in Italia e nel Mediterraneo è senza dubbio la pesca lagunare. La gestione delle lagune costiere è sempre stata basata sullo sfruttamento delle migrazioni stagionali delle specie eurialine, tra cui appunto l'anguilla, tra mare e laguna: la montata dei giovanili in ambiente lagunare, più idoneo nella fase dell'accrescimento, e il ritorno degli adulti verso il mare, in relazione a cambiamenti delle condizioni ambientali e alla riproduzione. Per sfruttare questi movimenti, si è assistito nel tempo ad un progressivo miglioramento dei metodi di gestione di questi ambienti e delle tecniche di pesca. In tutte le lagune costiere del Mediterraneo, dagli stagni sardi alle lagune del sud della Francia e del Nord Africa, è presente una pesca lagunare di tipo artigianale, mentre la gestione è relativamente semplice, e si basa per lo più sul reclutamento naturale. Le tecniche per la pesca di anguille sono variabili, anche in relazione alle tradizioni locali, e vanno dalle nasse e bertovelli fino ai sistemi più complessi come le "paranze" utilizzate nella laguna di Lesina. La maggior parte delle catture di anguille, e in particolare di argentine, nelle lagune viene effettuata al lavoriero, uno sbarramento a forma di V situato nel canale di comunicazione tra mare e laguna, la cui struttura (forma, numero di camere), le cui dimensioni, i cui materiali (da canne a cemento e griglie di metallo) sono evolute nei secoli e differiscono tuttora da regione a regione e tra Paesi, in relazione a tradizioni locali ma anche al livello tecnologico raggiunto. Il principio su cui si basa il suo funzionamento, tuttavia, è sempre il medesimo: si tratta di una barriera che intercetta il pesce quando tenta di tornare al mare: nel caso dell'anguilla, la maggior parte delle catture ha luogo in inverno, in coincidenza con la "smontata". Le produzioni di anguilla in ambienti lagunari dipendono in primo luogo dalla qualità dell'ambiente, in misura maggiore che dal livello del reclutamento. Questi sono i due aspetti che influenzano le scelte di gestione per quanto riguarda sia lo sforzo di pesca che le semine. Di conseguenza le produzioni possono essere estremamente variabili, dalle ridotte produzioni, 6 kg/ha, che si osservavano a Comacchio nella seconda metà degli anni '80 [Ciccotti, 1997] fino ai 120- 300 kg/ha ottenuti nel lago di Monaci negli anni '80 [Ardizzone e Corsi, 1985] grazie a semine con ceche e piccole anguille gialle.

1.3.3 Interazioni tra pesca e allevamento

Lo sfruttamento dell'anguilla su base colturale ha una lunga tradizione nell'intera area Mediterranea, proprio in relazione alla gestione delle lagune costiere. L'anguilla era un'importante specie commerciale fin dal 1300, periodo a cui risalgono le prime realtà di allevamento su base estensiva, nella laguna di Venezia e nell'area Nord-Adriatica, con la vallicoltura. Questa pratica ha molti elementi in comune con la gestione tradizionale delle lagune costiere, ma se ne differenzia per una gestione più

attiva ed articolata, che include una gestione dell'ambiente acquatico basata sul controllo idraulico e sull'uso di semine di novellame [Ardizzone, Cataudella et al., 1988; Ciccotti, Busilacchi et al., 2000]. Le famose valli di Comacchio raggiunsero l'apice della prosperità nel 1800 proprio grazie all'anguilla e alla sua industria di trasformazione. L'acquacoltura estensiva, e le produzioni vallive e lagunari italiane, giocarono un ruolo primario nel panorama produttivo europeo fino agli anni '70, quando l'intero settore fu colpito da una patologia, l'argulosi, causata dal parassita *Argulus giordanii*. Questo fatto, unito ad una aumentata domanda da parte del mercato, diede la spinta alle prime esperienze di allevamento intensivo, in sistemi all'aperto in vasche in terra o in cemento, sulla scia dell'esperienza giapponese già ben consolidata. I fattori limitanti erano le tecnologie di svezzamento delle ceche, poco efficienti, e i tassi di conversione nella fase di ingrasso, oltre alla necessità di frequenti operazioni di selezione del prodotto. Nel corso degli anni '80, i progressi nella preparazione dei mangimi e miglioramenti delle tecniche di allevamento (nuove strutture produttive, trattamento delle acque, gestione delle patologie) migliorarono notevolmente i rendimenti, soprattutto in Italia. Le produzioni intensive mostrano un andamento crescente nel corso dell'ultima parte del 1900 (Fig: 1.12 a pagina 21). Fino alla metà degli anni '90, il Paese principale produttore era l'Italia, con 3.000 t/anno, circa il 47% della produzione europea totale [Ciccotti, Busilacchi et al., 2000]. Oggi i Paesi principali produttori sono Olanda e Danimarca, grazie a tecnologie di allevamento basate sul ricircolo e riscaldamento delle acque, che hanno portato le produzioni in questi paesi da 500 t/anno (1988) ad oltre 5.000 t/anno [Ciccotti e Fontenelle, 2001]. Di fatto, quindi, l'acquacoltura europea dell'anguilla si è ormai del tutto spostata verso produzioni molto elevate, di tecnologia iper-intensiva ma con ridotti impatti sull'ambiente. Questa produzione dipende interamente dal seme selvatico, le ceche. È stato stimato che le necessità di ceche per il settore dell'allevamento europeo ammontino a circa 40 t/anno [Moriarty e Dekker, 1997]

1.3.4 Stato dello stock

Il quadro generale sullo stato dello stock di anguilla e sulle produzioni della pesca è quello di una diminuzione notevole del reclutamento (Fig: 1.9 a pagina 19), diffusa in tutta Europa, [Feunteun, 2002; ICES, 2014; Moriarty e Dekker, 1997] e di ridotte produzioni di anguille adulte [ICES, 2014], evidenziate sia da dati di pesca che da verifiche scientifiche. La contrazione del reclutamento è documentata a partire dagli anni '80, grazie a serie storiche di dati di monitoraggio da tutta l'Europa, condotti con diverse metodologie [Dekker, 2002; Moriarty e Dekker, 1997], alcune delle quali coincidono con un monitoraggio della pesca professionale o di altri dati di tipo commerciale (export), alcuni parzialmente basati sulla pesca, e altri sono osservazioni indipendenti dalla pesca. Tutte le serie evidenziano un vistoso e prolungato declino del reclutamento diffuso in tutto il continente, [Moriarty e Dekker, 1997]. Si osserva una notevole congruenza tra gli andamenti delle varie serie: nonostante la variabilità da sito a sito e tra gli anni, è stata evidenziata la significatività del trend decrescente e l'entità della diminuzione dagli anni '90 in poi [Dekker, 2002; ICES, 2014]. Non emerge nessun segnale di ripresa, in nessuna delle serie; anzi, dopo il minimo storico toccato nel 2001, il 2005 ha mostrato livelli ancora più bassi [ICES, 2014]. Va sottolineato che il monitoraggio del reclutamento di *A.*

anguilla, vista la natura del suo ciclo biologico, assume un significato duplice: a livello globale fornisce informazioni, seppure imprecise, sul successo della migrazione riproduttiva e della migrazione larvale in Oceano Atlantico, ma al tempo stesso costituisce un dato sull'effettivo reclutamento a livello locale, ovvero nel singolo bacino idrografico di riferimento. Stime risalenti alla fine degli anni '90 [Moriarty, 1996] quantificavano in 920 t/anno circa la cattura totale di ceche in Europa, stime più recenti non sono disponibili, ma considerando che i grandi estuari francesi del Golfo di Biscaglia (Loire, Gironde) mostrano catture notevolmente ridotte rispetto agli anni '90 [ICES, 2014], la produzione globale potrebbe ammontare oggi a assai meno della metà. Le catture totali da pesca di anguilla, a livello europeo, erano stimate in circa 22.000-30.000 t/anno [Moriarty e Dekker, 1997]. Le catture europee di ceche costituiscono dunque più o meno il 2% del totale in termini di peso, ma sono oltre 2 miliardi di reclute in termini numerici [Feunteun, 2002]. Non esistono valutazioni relative alle catture di ceche in ambito Mediterraneo, anche se la pesca vi è praticata, almeno in Italia, tuttavia i livelli di produzione sono assai più bassi rispetto a quelli dei paesi sul versante Atlantico. Tuttavia, il declino del reclutamento riportato per l'Europa trova conferma per quest'area, come dimostrano dati relativi al monitoraggio effettuato alla foce del Tevere, Lazio [Ciccotti, 2005; Ciccotti, Busilacchi et al., 2000]. Gli effetti del ridotto reclutamento sullo stock di anguille adulte non sono facilmente dimostrabili e necessiterebbero di indagini a lungo termine alla scala dei singoli bacini idrografici, in molti dei quali, tra l'altro, vengono praticati ripopolamenti proprio per sostenere la pesca a livello locale (figura 1.10 a pagina 20 e 1.11 a pagina 20). In molti ambienti si osservano cali anche consistenti nelle catture di anguille gialle ed argentine [Moriarty e Dekker, 1997], ma nel complesso la riduzione dello stock di anguille adulte è assai meno documentata, vista anche l'ampia gamma di situazioni ambientali e gestionali che si ritrovano nell'ambito dell'areale di questa specie [Feunteun, 2002]. Gran parte dell'evidenza su questo aspetto viene da casi di studio eterogenei per localizzazione geografica, tipologia di habitat, qualità ambientale, densità di popolazione, opzioni gestionali, e così via, mentre una metaanalisi è stata tentata solo in alcuni lavori [Dekker, 2000a,b, 2003a], basati largamente sull'uso delle statistiche ufficiali di pesca. Tali tipologie di dati hanno il vantaggio di fornire serie storiche di dati anche lunghe, che possono essere utili per valutazioni comparative e per analizzare andamenti nel lungo termine; presentano tuttavia limiti per l'inaffidabilità dei sistemi di rilevamento e, dunque, per l'incompletezza e per le inesattezze che possono derivarne. Nel complesso, anche se i dati di pesca non rispecchiano lo stato dello stock, si ritiene che possano dare un quadro almeno per quanto riguarda l'andamento nel lungo termine delle catture. L'esame delle catture di anguilla a livello europeo mostra in effetti un trend discendente già a partire dagli anni '70 (Fig: 1.13 a pagina 21), e progressivamente più marcato negli ultimi 10 anni. Decisamente più evidente è la situazione di contrazione delle produzioni se si prendono in esame le catture relative alle lagune mediterranee (Fig: 1.14 a pagina 21), il cui andamento è assolutamente congruente con quello relativo alle produzioni lagunari italiane (Fig: 1.15 a pagina 22): le produzioni, che negli anni '70 ammontavano a circa 1.500 t/anno, si sono ridotte a 500 t/anno negli anni '90, fino a poco più di 200 t/anno negli ultimi 5 anni. Questo anche perché le produzioni di anguilla in ambiente lagunare risentono oggi non solo dei problemi di qualità ambientale su accennati, ma anche di cambiamenti nelle

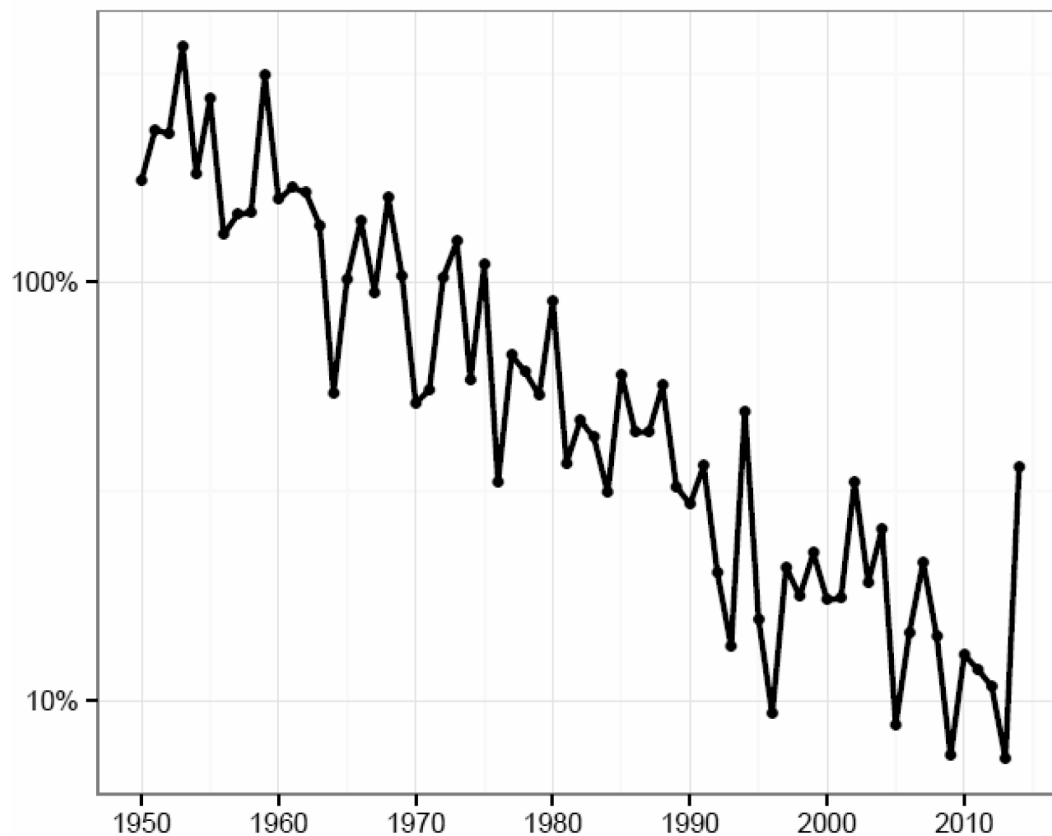


Figura 1.9: Stima del reclutamento medio basato su 12 serie storiche e scalato alla media degli anni 1960-1979 su scala logaritmica [ICES, 2014]

strategie gestionali. A causa della ridotta disponibilità di ceche e degli incrementi di prezzo, le semine di anguille sono state progressivamente abbandonate anche in ambienti vallivi, e questo fa preferire altre specie, visto anche il lungo ciclo che l'anguilla esibisce in questi ambienti. Il decremento delle catture di anguille è, invece, assai meno evidente per le catture nelle acque interne, anche in Italia (Fig: 1.15 a pagina 22), in quanto in questi ambienti, così come negli altri Paesi europei, vengono, o meglio venivano, effettuati ripopolamenti i cui effetti potrebbero essere ancora presenti, soprattutto in ambienti lacustri.

1.3.5 Impatti sullo stock

Le ipotesi formulate come possibili spiegazioni di questa situazione sono molte, e il dibattito su questo argomento è molto intenso, spaziando da cause di origine naturale a conseguenze di impatti antropici. Tra le prime, l'ipotesi più accreditata è che vi sia una dipendenza tra il declino del reclutamento e un cambiamento nei pattern di circolazione oceanica [Friedland et al., 2007; Knights, 2003]. A sostegno di questa ipotesi vi è l'osservazione di un parallelo declino del reclutamento dell'Anguilla americana (*Anguilla rostrata*) in alcune parti del suo areale. Altre possibili cause di riduzione dello stock sono la predazione da parte di uccelli ittiofagi, soprattutto cormorani le cui popolazioni in Europa sono notevolmente incrementate, e la diffusione del nematode *Anguillicola crassus*. Questo parassita

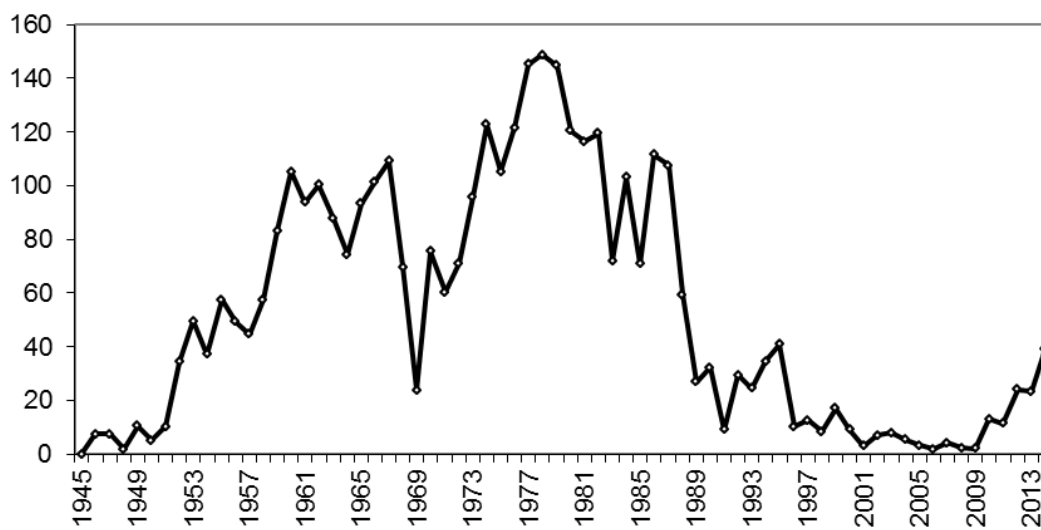


Figura 1.10: Numero ceche (milioni) a scopo di ripopolamento in Europa [ICES, 2014].

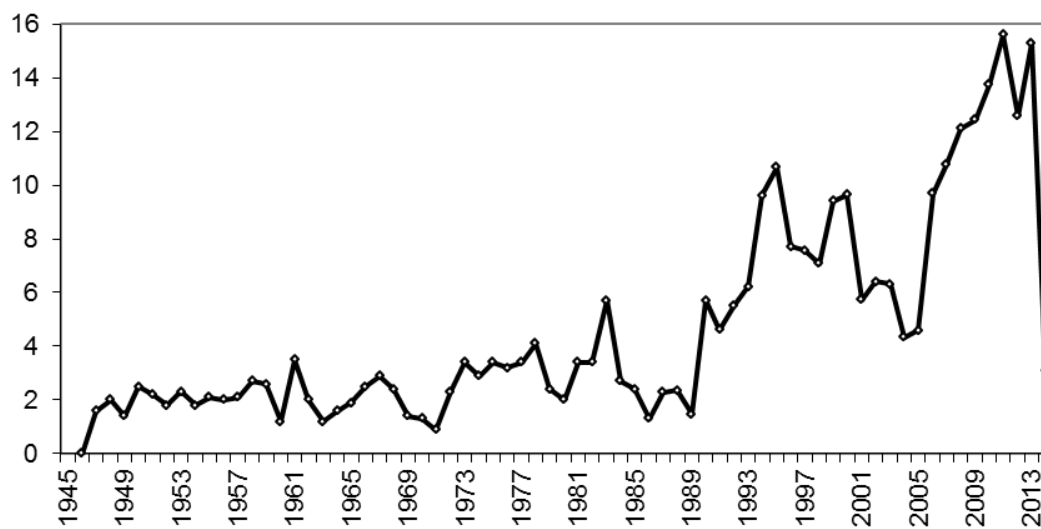


Figura 1.11: Numero ragani (milioni) a scopo di ripopolamento in Europa [ICES, 2014].

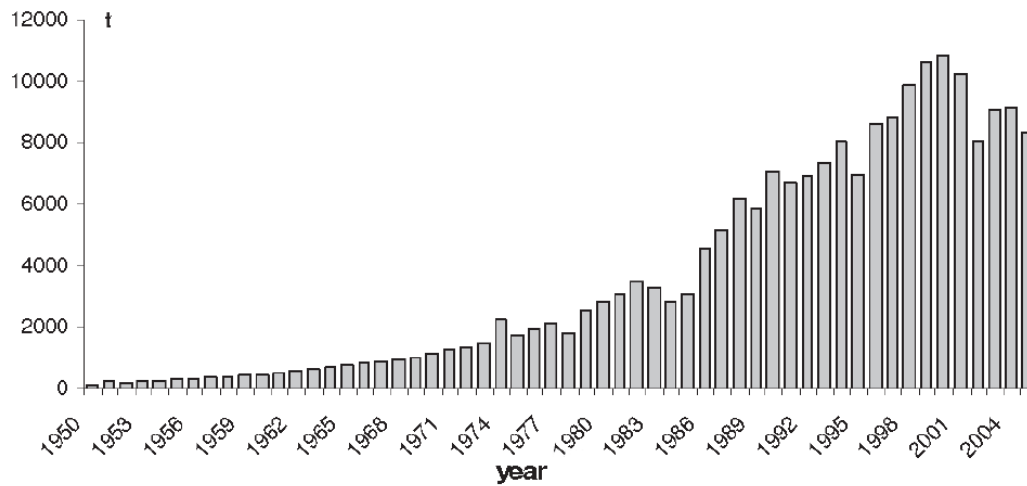


Figura 1.12: Produzione da acquacoltura di anguille nei Paesi europei, periodo 1950-2005 (dati FAO, 2006)

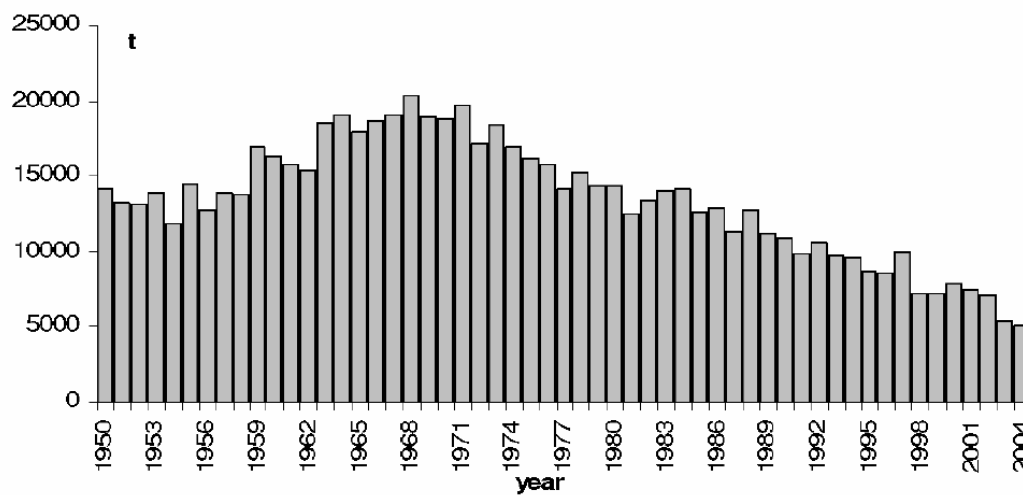


Figura 1.13: Catture di anguilla nei Paesi europei, 1950-2004 (dati FAO, 2004)

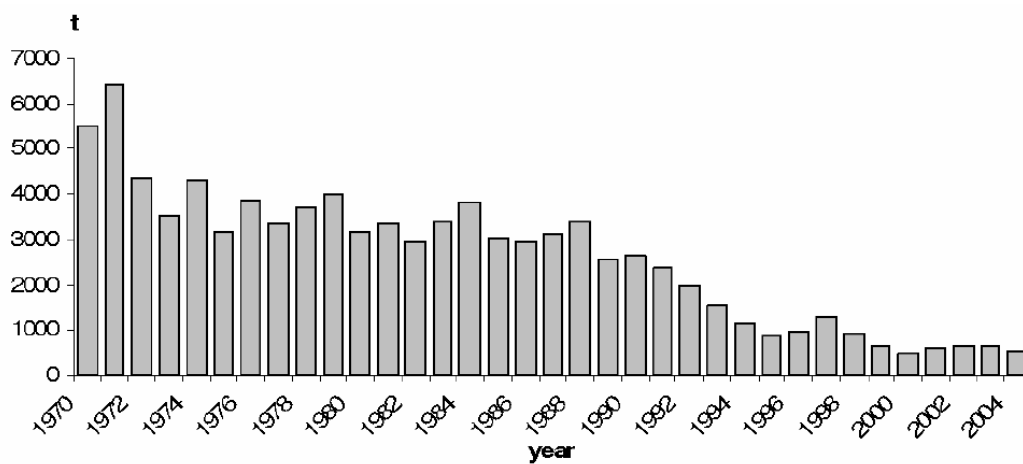


Figura 1.14: Catture di anguilla in acque lagunari mediterranee, 1950-2004 (dati FAO, 2004)

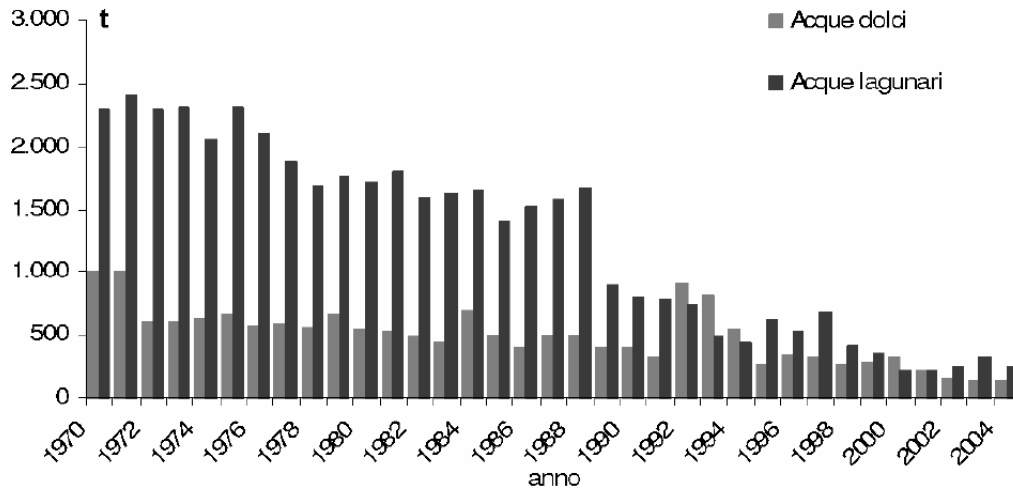


Figura 1.15: Catture di anguilla in Italia in ambienti lagunari e nelle acque interne (dati FAO, 2004)

ha un ciclo i cui ospiti intermedi sono organismi che fanno parte della dieta di questa specie ittica, e allo stadio adulto si insedia nella vescica natatoria, organo particolarmente importante per l'anguilla, in relazione alla sua capacità natatoria necessaria per effettuare la migrazione fino all'areale di riproduzione. Questo nematode è comparso in Europa circa vent'anni fa e la contaminazione è avvenuta con materiale proveniente dall'Asia e poi si è diffuso enormemente in tutta l'Europa in relazione ai trasferimenti per ripopolamento, tanto che si ritiene che non vi siano più popolazioni indenni e i livelli di infestazione sono ormai molto elevati in tutte le popolazioni che sono state esaminate. L'infestazione da *A. crassus*, come anche l'infezione da rhabdovirus EVEX sono cause importanti di riduzione della efficienza natatoria delle argentine, e quindi delle loro capacità migratorie e riproduttive [Szekely, Molnar, Muller et al., 2003; Szekely, Molnar e Racz, 2004]. Con riferimento agli effetti diretti degli impatti di natura antropogenica, vi è senza dubbio un impatto del prelievo, difficile da quantificare, mentre è sicuramente importante l'impatto dovuto alla perdita di habitat. Quest'ultima, legata a bonifiche e a riduzioni dell'estensione di zone umide ed estuarine, è stata considerevole in tutta Europa, anche se graduale nel corso della seconda metà dello scorso secolo [Feunteun, 2002; ICES, 2014], ma indubbiamente una larga parte degli habitat di acque interne in Europa è divenuta inaccessibile alle anguille a causa della costruzione di sbarramenti idroelettrici, dighe e altri ostacoli. Anche il degrado qualitativo degli habitat e la diffusione di contaminanti ha un ruolo, e questo aspetto è oggetto di numerose indagini recenti che hanno rilevato che l'accumulo di contaminanti, in particolare di PCB, ha conseguenze sulla qualità dei gameti, sulle uova e quindi sulla fertilità [Palstra, Van Ginneken et al., 2005].

1.3.6 Interazioni a livello globale

Dai tardi anni '90, l'anguillicoltura europea è stata coinvolta su scala globale, in relazione alle crescenti interazioni con l'anguillicoltura asiatica, le cui produzioni

ammontano a circa 180.000 t/anno, e per la globalizzazione che ha coinvolto le industrie di trasformazione ed il mercato. Un grande e rapido aumento dell'acquacoltura cinese ha comportato innanzi tutto un incremento della domanda di ceche per l'industria asiatica, da ogni parte del mondo, e dall'Europa in particolare, vista anche la scarsità di ceche di *Anguilla japonica*. Fino alla metà degli anni '90, nonostante il ridotto reclutamento, la dipendenza del settore dell'allevamento dal seme selvatico non era considerato un problema, la domanda si attestava su quantità pari alle 40 t/circa. Nel momento in cui il mercato asiatico si è rivolto all'Europa, questo ha completamente destabilizzato lo scenario e i mercati, in primo luogo determinando un vertiginoso aumento dei prezzi che ha creato da subito problemi ai produttori europei. Seconda conseguenza è stata un notevole incremento dello sforzo di pesca sulle ceche da parte dei pescatori autorizzati, nonché un aumento della pesca illegale. Quindi, l'impatto sullo stock è stato duplice: da un lato un incrementato prelievo di ceche, dall'altro una riduzione della disponibilità di seme per le semine in ambienti naturali. In tutta Europa i ripopolamenti, effettuati da Amministrazioni, sono praticati per sostenere gli stock locali e la pesca, e questa è pratica comune soprattutto in Paesi del Nord Europa (Svezia, Irlanda, Danimarca, ma anche Francia). I prezzi più elevati hanno determinato una riduzione di queste pratiche un po' ovunque, ripercuotendosi quindi sia sugli stock a livello locale che sulla pesca. Conseguenza secondaria è stata anche un eccesso di produzione, almeno inizialmente, in Asia che si è riflesso anche sul mercato Europeo.

1.3.7 Azioni in campo

Appare evidente da quanto illustrato fin qui che l'anguilla è una risorsa per la quale è ormai ampiamente riconosciuta la necessità di intervento e l'adozione di misure finalizzate alla gestione dello stock nonché alla sua conservazione. A partire dalla fine degli anni '90, il dibattito sulle possibili linee di intervento è stato molto acceso, ha coinvolto diversi aspetti che vanno dalla valutazione della portata del problema nei suoi molteplici aspetti a livello scientifico, a livello politico e a livello di strategie possibili da mettere in campo ai fini della tutela dello stock, cercando di tutelare le attività economiche connesse al suo sfruttamento. La portata del problema è da considerarsi su scala europea, e più in particolare comunitaria, in quanto la specie è costituita da uno stock unico, distribuito in tutto il continente europeo, dove viene sfruttato e dove subisce una serie di impatti, e la cui conservazione dipende dal reclutamento e dall'emigrazione dei riproduttori al mare a partire da ogni singolo bacino. Il fatto che l'anguilla sia una specie catadroma, quindi, non limita alla fase marina il campo di applicazione delle misure comunitarie. Le peculiarità del ciclo biologico di questa specie, anzi, costituiscono elementi a sostegno della necessità di una strategia transnazionale di collaborazione in materia di gestione, come è ben evidente al punto 5 del documento "Verso un piano d'azione comunitario per la gestione degli stock di anguilla europea", che fa riferimento all'articolo 37 del trattato CE, e all'articolo 67 della Convenzione delle Nazioni Unite sul Diritto del Mare [Commission, 2003]. Questo documento, riprendendo il parere dell'ICES, 2002, illustra in modo esauriente la necessità di elaborare una strategia per la gestione e la tutela dello stock di questa specie, attraverso la definizione di una serie di obiettivi a livello locale e la loro trasposizione in iniziative

concrete, inserite però all'interno di uno schema di riferimento di portata globale, viste le peculiarità biologiche e di sfruttamento di questa specie catadroma. La pubblicazione di questo documento rappresenta un importante punto di arrivo in un percorso che ha visto crescere, a partire dalla seconda metà degli anni '90, la consapevolezza della necessità di intervento per questa specie con un processo che ha coinvolto il mondo scientifico, ma anche il mondo della pesca, le Amministrazioni e la pubblica opinione. È stata sottolineata con progressiva enfasi la necessità di identificare opportune linee per la gestione, discusse sia in sede comunitaria sia nell'ambito di organi tecnici [ICES, 2001, 2002, 2004, 2006]. Tale discussione si è poi concretizzata nelle seguenti azioni:

- l'inserimento dell'anguilla, con il Regolamento N.1581/2004, emendamento al regolamento N. 1639/2001, nell'elenco di specie interessate dal Programma di Raccolta dei Dati (Data Collection Framework, Regolamento N. 1543/2000);
- la pubblicazione del documento "Verso un piano d'azione comunitario per la gestione degli stock di anguilla europea" (COM (2003) 573) che prelude all'invito ai Paesi Comunitari ad elaborare Piani di Gestione.

Alla pubblicazione di questo documento di orientamento ha fatto seguito un ampio dibattito, che ha riguardato i possibili obiettivi specifici, nonché le misure immediate da intraprendere per il ripristino dello stock, ma anche la tutela delle attività economiche legate alla pesca e all'allevamento. Va comunque sottolineato che tutte le parti in causa hanno concordato anche sul fatto che la migliore metodologia d'intervento consiste nel fissare obiettivi di gestione a livello comunitario, lasciando però agli Stati membri la libertà di scegliere le modalità di intervento per conseguire tali obiettivi. A questo scopo, nel 2005, è stato presentato dalla Commissione Europea il documento "Proposta per un Regolamento Europeo che stabilisce misure per il ripristino dello stock di Anguilla Europea" [Commission, 2005]. In termini di conservazione, l'obiettivo principale delle azioni di gestione è identificato nel consentire un adeguato livello di emigrazione di anguille argentine da ciascun bacino idrografico. Sono anche presi in considerazione possibili obiettivi a livello locale, con particolare riguardo a obiettivi in termini di reclutamento, sedentarizzazione, colonizzazione nonché di emigrazione, da raggiungere con una varietà di strumenti che vanno da limitazioni alla pesca ad azioni di restauro ambientale e di ripristino della viabilità sui corsi d'acqua. Lo strumento che è stato individuato a livello comunitario affinché tutti gli Stati membri interessati allo sfruttamento della risorsa "anguilla" possano partecipare al processo di ricostituzione dello stock di questa specie è costituito dai Piani di Gestione Nazionali, che ciascun Paese avrà l'obbligo di elaborare. La versione definitiva del Regolamento proposto nel 2005, dopo la revisione del Parlamento Europeo, è stata infatti approvata proprio di recente (giugno 2007). Vi è un nodo cruciale, nella questione, costituito dall'esportazione di ceche di anguille verso Paesi extracomunitari, che è difficile da risolvere in relazione agli accordi mondiali per il commercio. Ma questo nodo potrebbe essere sciolto da un'altra azione in corso, che vede coinvolti diversi Paesi (Svezia, Germania per conto di Stati membri della Comunità) con l'appoggio di organizzazioni non governative e della stessa Comunità Europea, ovvero la proposta di inclusione dell'anguilla nell'elenco di specie all'annesso II (Appendice B) della CITES, inclusione che

permetterebbe di regolamentare e controllare il commercio di anguilla e quindi anche di ceche. La conservazione e la gestione dell'anguilla sono due aspetti di un problema di ampia portata, che chiama in causa questioni anche molto diverse che vanno dallo sfruttamento commerciale alla tutela di habitat naturali. Le possibili conseguenze del commercio su scala internazionale aggiungono una dimensione globale al problema. Senza dubbio, quando si ha a che fare con una specie come l'anguilla, con un ciclo biologico così particolare, vi è una serie di incertezze riguardo sia alla fattibilità che alle possibilità di successo delle eventuali strategie di gestione. Il processo, iniziato molti anni fa con la presa di coscienza dell'esistenza di un problema, sta per portare ad un risultato, che vedrà ogni Paese coinvolto nella riflessione per l'elaborazione di una strategia ben precisa, con il fine comune di assicurare la conservazione dell'anguilla in un quadro di sostenibilità delle attività socio-economiche ad essa correlate. In questo quadro, alcuni aspetti distintivi delle tipologie di sfruttamento, ma anche delle tradizionali strategie di gestione, potrebbero dimostrarsi fattori chiave di questa riflessione, ad esempio a livello Mediterraneo. Le pratiche gestionali tipiche delle lagune costiere, unitamente alle loro caratteristiche ecologiche, in tutto il Mediterraneo ma soprattutto in Italia, hanno da sempre privilegiato il sostegno agli stock locali attraverso le semine, e questo ha consentito in passato di ottenere alte produzioni, di anguille argentine, la cui emigrazione veniva poi drasticamente ridotta dal passaggio al lavoriero. Allora uno strumento possibile appare proprio il modello di gestione lagunare, basato sull'uso razionale delle ceche ancora disponibili localmente e sulla possibilità di quote di restituzione a livello locale, per contribuire all'emigrazione dei riproduttori verso il mare aperto.

1.4 Piano di gestione nazionale e piani regionali

In applicazione al Regolamento (CE) n.1100/2007 del Consiglio che istituisce misure per la ricostituzione dello stock di anguilla europea, l'Italia ha scelto di contribuire a tale adempimento definendo un piano nazionale per l'anguilla e dei piani regionali. È nata una proficua collaborazione che ha consentito di superare alcuna difficoltà nel reperimento dei dati e nella definizione del quadro di riferimento, dovute sia alla frammentazione delle competenze in materia, che alle deleghe operate in favore delle Province per alcuni degli aspetti gestionali. Nel contempo le amministrazioni regionali hanno partecipato al processo di gestione dell'anguilla con la definizione di piani di gestione locali, di pertinenza delle unità amministrative come previsto dall'articolo 2 comma 1 del regolamento. Le Regioni Lombardia, Veneto, Friuli Venezia Giulia, Emilia Romagna, Toscana, Umbria, Lazio, Puglia e Sardegna, corrispondenti ai poli di significativa consistenza della risorsa e del suo sfruttamento, hanno presentato un proprio piano di gestione per l'anguilla. Le rimanenti Regioni, che non hanno manifestato interesse a partecipare al processo di ricostituzione dello stock di anguilla, dovranno adottare norme che prevedono il divieto di cattura sia di adulti che di giovanili della specie. I piani sono basati su modelli di recupero della risorsa e di raggiungimento degli obiettivi previsti nel regolamento (riduzione della mortalità antropogenica onde permettere un'elevata probabilità di passaggio in mare per almeno il 40% della biomassa di anguilla

argentina -art. 2 comma 4) ed hanno pertanto individuato interventi mirati al contenimento della pressione di pesca sulla specie in questione. A livello centrale, in relazione alle competenze sulla pesca in acque marine è previsto nel piano un intervento normativo sulla pesca delle anguille al di sotto dei 12 cm. (ceche), per le quali le novità più rilevanti sono:

- la riduzione del periodo autorizzato (5 mesi contro 9);
- l'introduzione di una quota massima di catture (proposta per il primo anno in 4 tonnellate) da suddividersi fra acque marine ed acque interne e poi per Regione (in precedenza non esistevano limiti);
- destinazione di una quota crescente di pescato al ripopolamento (massimo previsto 65% da conseguirsi gradualmente fino al 2013 e anni successivi);
- limitazione delle zone di cattura al solo compartimento marittimo di iscrizione dell'impresa (in precedenza 3 compartimenti per ciascuna autorizzazione, un'impresa poteva ottenere più autorizzazioni).

Capitolo 2

Scopo della tesi

Lo scopo del progetto di ricerca è stato quello di valutare la presenza di unità di stock di *A. anguilla* in Mediterraneo centrale, in particolare tra versante tirrenico e adriatico della penisola italiana. Per far questo oltre alle classiche analisi biometriche (lunghezza totale, peso, sesso, età e loro relazioni) si è deciso di utilizzare gli otoliti sfruttando due loro caratteristiche fondamentali:

- la forma specie-specifica e stock-specifica
- la composizione chimica che è in costante equilibrio con l'ambiente di crescita e non è rimaneggiata nel tempo

La forma, in particolare il contorno esterno, dell'otolite degli individui adulti è influenzata dall'ambiente di crescita e dalla genetica e rispecchia la sua ontogenesi, in particolare la situazione delle ultime fasi di vita fino al momento della cattura. Le indagini microchimiche sull'otolite levigato consentono invece di studiare cronologicamente l'evoluzione durante tutta la crescita dell'individuo. Proprio per questo il progetto di ricerca si è focalizzato sull'origine degli individui studiando la regione nucleare degli otoliti corrispondente ai primi mesi di vita che, secondo gli studi fino ad ora condotti, risulta totalmente marina e localizzata nel mare dei Sargassi. In base alla composizione degli elementi in tracce presenti nell'otolite si sono cercati eventuali gruppi con caratteristiche diverse. Per un ristretto gruppo di individui (un esemplare rappresentativo per sito di campionamento) le analisi chimiche sono state estese a tutta la fase di crescita per individuare eventuali comportamenti particolari come migrazioni nella fase adulta, sedentarietà o preferenza dell'ambiente di crescita. Sono poi state condotte analisi sull'età, sia tramite lettura di otoliti che di scaglie per risalire alla data di nascita di ogni individuo e correlarlo ad eventuali pattern rilevati nelle altre analisi. Per ultimo si sono fatte analisi sulla microstruttura degli otoliti mediante microscopia a scansione (SEM) per individuare eventi chiave della prime fasi di vita fissati durante la crescita. In particolare si è cercato di stimare il tempo di migrazione basandosi sul conteggio degli incrementi giornalieri e correlarlo alle diverse distanze percorse durante la migrazione per raggiungere il luogo di crescita definitivo.

Capitolo 3

Materiali e metodi

3.1 Campionamento

La fase di campionamento ha previsto la raccolta di un totale di 370 esemplari distribuiti nei vari stadi di sviluppo: ceche, ragani, anguille gialle e argentine. Il materiale raccolto proviene da varie località sia del versante adriatico che tirrenico come indicato in figura: [3.1 a pagina 32](#), che hanno caratteristiche ambientali abbastanza diverse tra loro in particolare per quanto riguarda il collegamento con il mare e quindi la salinità delle acque come indicato in figura [3.2 a pagina 33](#), [3.3 a pagina 34](#), [3.4 a pagina 35](#), [3.5 a pagina 36](#). Ogni sito di campionamento è caratterizzato da una determinata fase di crescita degli individui e modalità di cattura per cui non è stato possibile ottenere un campione omogeneo per taglia per ogni sito di campionamento come mostrato in Tab: [3.1](#). Per standardizzare le operazioni successive e per evitare sofferenze inutili e prolungate tutti gli esemplari sono stati refrigerati e congelati appena possibile e stoccati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ in attesa del processamento.

Tabella 3.1: Tabella sinottica della consistenza, tipologia e modalità di cattura degli esemplari catturati nei vari siti di campionamento

Sito	N. esemplari	Tipologia	Sistema di cattura
Albegna (Albe)	69	ceche	cogollo
Bonello (Bone)	19	adulti	cogollo
Chioggia (Chio)	23	adulti	bertovello
Comacchio (Coma)	89	adulti	lavoriero
Fano (Fano)	55	adulti	nassa
Orbetello (Orbe)	20	adulti	lavoriero
Spagna (Spag)	18	ceche	nd (importazione)
Succi (Succ)	59 (16)	adulti (ragani)	allevamento a terra
Noghera (Nogh)	18	adulti	lavoriero

3.1.1 Albegna (Albe)

Il fiume Albegna sfocia nel Mar Tirreno presso la località di Albinia, delimitando a nord il Tombolo della Giannella che unisce il promontorio dell'Argentario alla terra ferma. Grazie alla sua natura incontaminata questa località presenta ancora rimonta naturale di ceche selvatiche. Queste ed altre provenienti da zone adatte vengono catturate, svezate e alimentate al fine di abbassare la mortalità naturale per patologia o predazione. Terminata la quarantena vengono poi utilizzate per la ricostituzione degli stock nei torrenti toscani o per l'acquacoltura. Tra tutti gli individui campionati sono gli unici di sicura rimonta naturale e completamente autoctoni.

3.1.2 Bonello (Bone)

La valle Bonello è un relitto dell'omonima valle da pesca che fino al 1966 si estendeva per 372 ettari e confinava con le valli Grata, Donzella e Papadopoli. Le otto valli da pesca furono bonificate negli anni '70, con la sola eccezione di una piccola parte di questa valle, ultima testimonianza del paesaggio vallivo ed oggi zona umida di elevato valore naturalistico. Il biotopo si estende per 45 ettari ed è caratterizzato da acque salmastre, da antichi dossi (bonelli) ricchi di vegetazione che delimitano le peschiere e da tratti di acque dolci derivanti dai canali di scolo delle bonifiche. Gli esemplari provenienti da questa località sono ingrassati artificialmente e di incerta provenienza anche se ufficialmente non sono state fatte semine con materiale alloctono negli ultimi 20 anni.

3.1.3 Chioggia (Chio)

La laguna di Chioggia è la parte più meridionale della laguna di Venezia che si estende per circa 550 km²; è stata inserita nel 1987 nella lista del patrimonio mondiale dell'umanità dall'UNESCO. Nella laguna di Chioggia sono stati campionati esemplari adulti mediante cattura commerciale utilizzando il bertovello. Gli esemplari provenienti da questo sito sono stati comprati da pescatori locali che ne hanno garantito la provenienza. Rispetto agli altri siti di campionamento è quello che insieme alla Valle Noghera ha i maggior scambi di acqua con quelle del mare.

3.1.4 Comacchio (Coma)

Le Valli di Comacchio sono una vasta zona umida situata in Emilia-Romagna, tra le province di Ferrara e Ravenna. La zona è classificata come sito di interesse comunitario e zona di protezione speciale per un'estensione di quasi 17.000 ettari, all'interno del Parco regionale del Delta del Po. Nella laguna di Comacchio sono stati campionati esemplari adulti mediante lavoriero. Le misurazioni biometriche sono state condotte in campo perché gli esemplari catturati (tutte argentine) erano destinate alla lavorazione in loco a fini commerciali come anguilla arrosto o marinata. Dopo le misurazioni, ad ogni esemplare, è stata recisa la testa e stoccata per le analisi successive per consentire la commercializzazione del prodotto.

3.1.5 Fano (Fano)

Fano è una città costiera della provincia di Pesaro-Urbino nelle Marche. Il porto commerciale e turistico è collegato ad un canale di acqua dolce che origina dal fiume Metauro. A nord sfocia il torrente Arzilla e a sud il fiume Metauro. La battigia è caratterizzata da sabbia a nord del porto (zona del Lido) e ghiaia a sud (zona di Sassonia). I fondali sono sabbioso-fangosi e sono presenti scogliere artificiali sia sommerse che emerse parallele a costa e alcuni pennelli trasversali che partono da terra verso mare. Nel sito di Fano sono stati campionati esemplari adulti mediante nasse posizionate nella zona portuale e in mare lungo costa mediante canna e mulinello.

3.1.6 Orbetello (Orbe)

La laguna di Orbetello è una laguna costiera della Toscana, nella Maremma grossetana. La sua estensione è di circa 27 km². La profondità media è di un metro circa, la massima non supera i 2 m. È separata dal mare a ponente e a levante da due strisce di terra lunghe circa 6 km (i Tomboli sabbiosi della Giannella a nord-ovest e della Feniglia a sud-est) e ad ovest dal promontorio dell'Argentario. Una terza lingua istmica di terra si protende nel centro della laguna e su di essa sorge il centro urbano di Orbetello. Un ponte artificiale (la diga Leopoldiana) collega Orbetello al Monte Argentario e divide la laguna in due parti, la laguna di Ponente e la laguna di Levante. Comunica con il mare per mezzo di tre canali artificiali: il canale di Fibbia (o delle Saline) nei pressi della foce del fiume Albegna ed il canale di Nassa (in località Santa Liberata), entrambi sul Tombolo di Giannella ed il canale di Ansedonia sul tombolo di Feniglia. Un quarto canale, il canale del Pertuso, fu progettato e furono anche iniziate le opere di scavo, che però non furono mai portate a termine. Nella laguna di Orbetello sono stati campionati esemplari adulti (gialle) mediante lavoriero: pur essendo catture commerciali, rispetto agli altri siti di campionamento, per motivi di mercato e di tradizione regionale la taglia degli esemplari è minore. La provenienza degli esemplari ufficialmente è autoctona, dato che nella laguna vengono effettuate solo semine di esemplari catturati da rimonta naturale del versante tirrenico.

3.1.7 Spagna (Spag)

I campioni di ceche spagnole provengono da materiale d'importazione a scopo acquacolturale e sono del versante mediterraneo.

3.1.8 Succi (Succ)

L'allevamento Succi di Codigoro (FE) ha fornito gentilmente ragani e adulti ingrassati in vasca: sono stati collezionati esemplari non in perfetto stato di salute ritenuti non idonei alla prosecuzione dell'ingrasso e vendita. La provenienza degli esemplari è dubbia e sicuramente il risultato di diverse fonti di approvvigionamento del materiale da ingrassare che vanno da ceche italiane a ceche e ragani di importazione spagnola e francese.

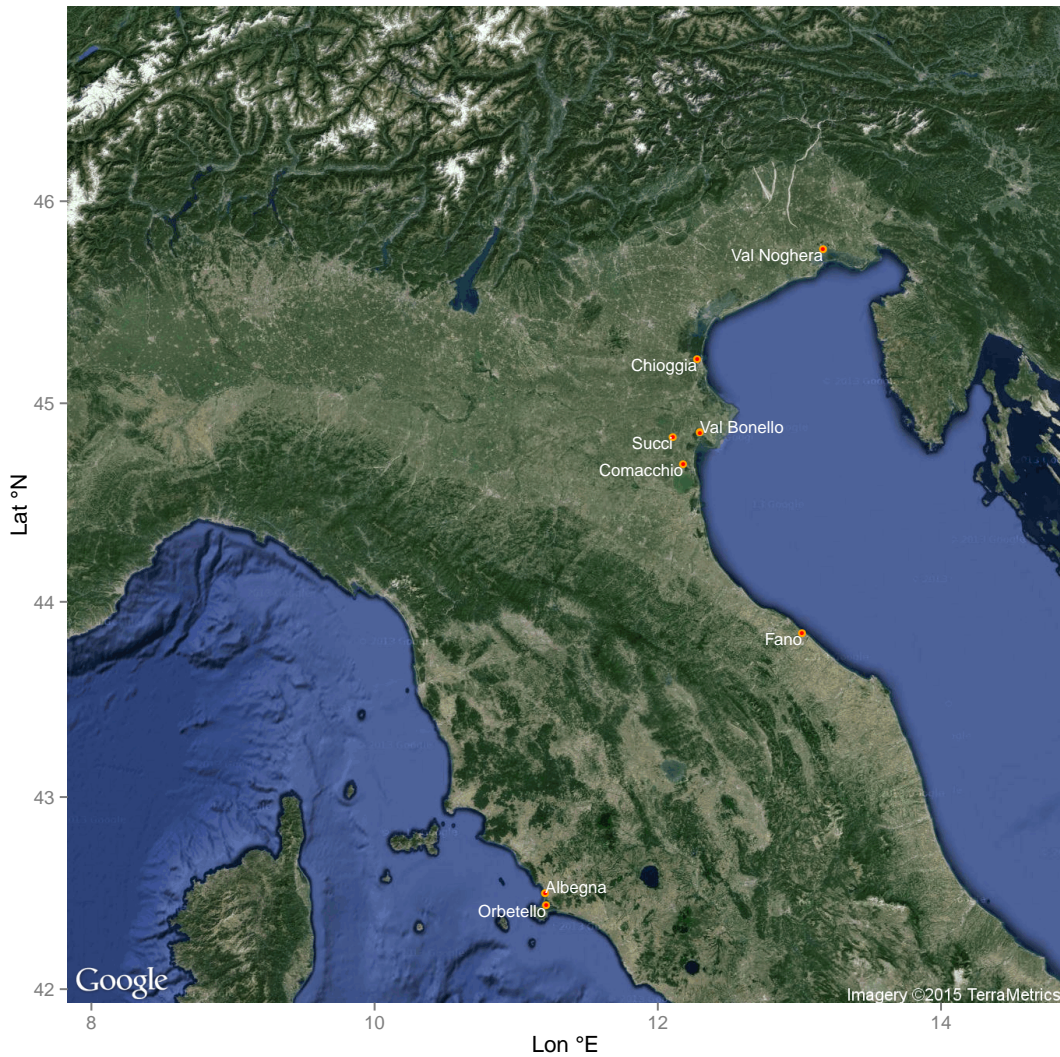
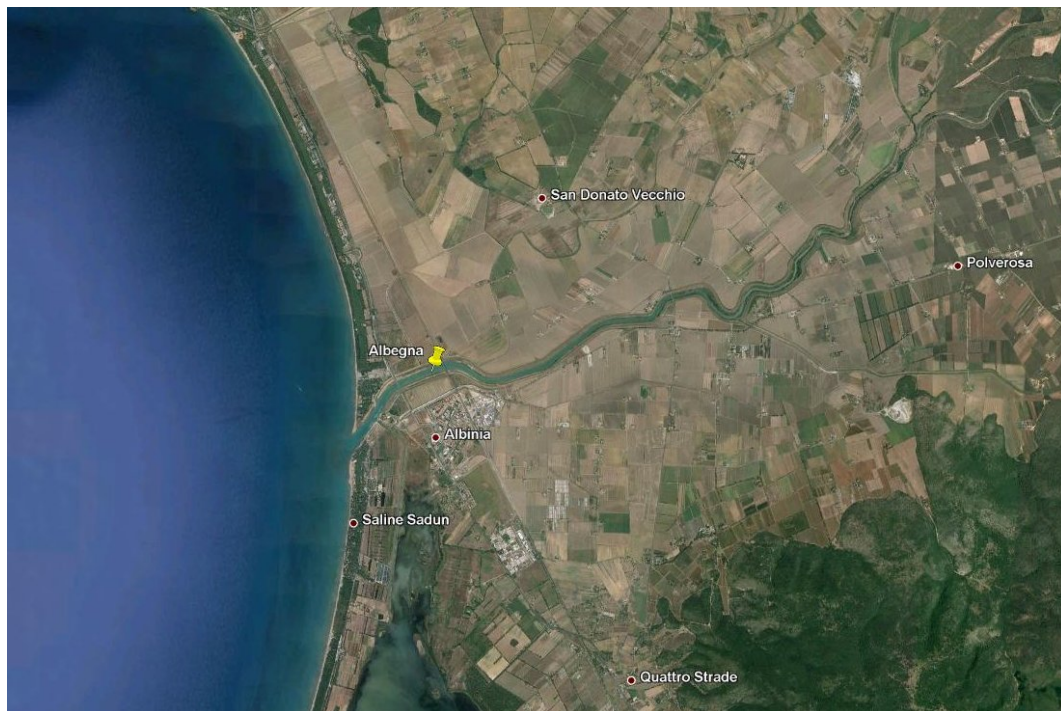


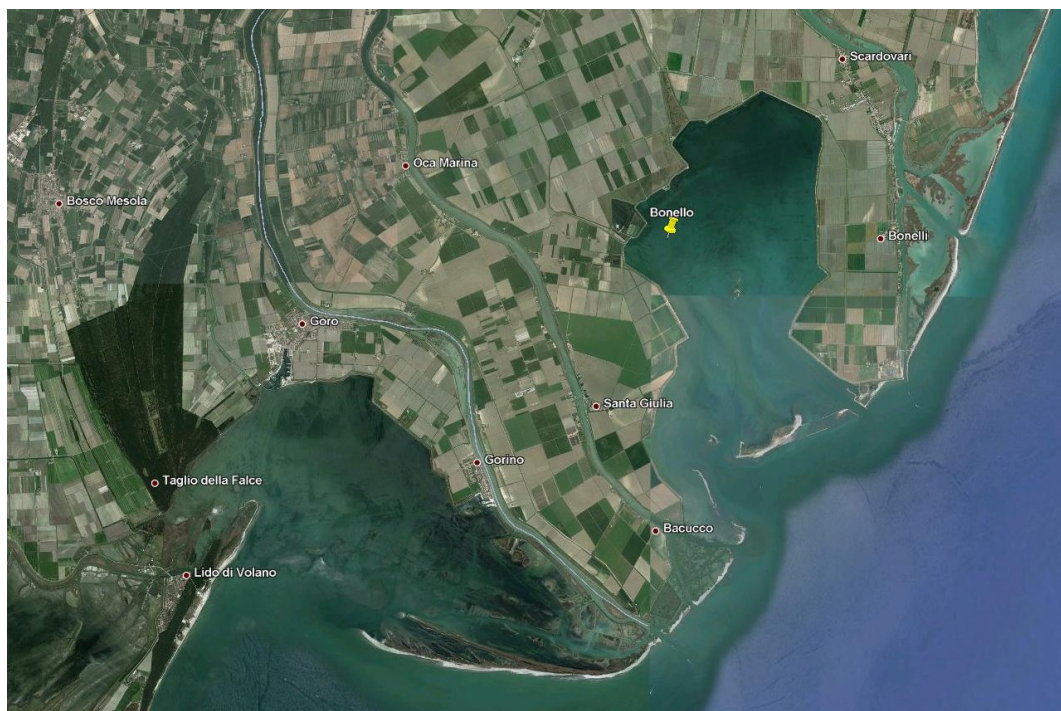
Figura 3.1: Siti di campionamento di *Anguilla anguilla*

3.1.9 Noghera (Nogh)

La valle Noghera è inserita nell'area della Laguna di Marano e Grado, compresa da Est ad Ovest tra gli apparati deltizi rispettivamente dei fiumi Isonzo e Tagliamento, la Laguna è delimitata verso mare da un cordone litoraneo formato da isole, ed in parte anche da ulteriori banchi sabbiosi, che si allungano parallelamente alla costa da Lignano a Grado per circa 20 km; verso la terraferma la delimitazione è costituita dall'argine di conterminazione lagunare. L'intera area lagunare copre complessivamente una superficie di circa 16.000 ettari per una lunghezza di 32 km ed un'ampiezza di circa 5 km. I campioni di anguilla adulti della Val Noghera sono stati catturati mediante lavoriero e dovrebbero essere autoctoni. È l'unico sito in cui sono stati trovati maschi maturi e quella con più sbocchi a mare.

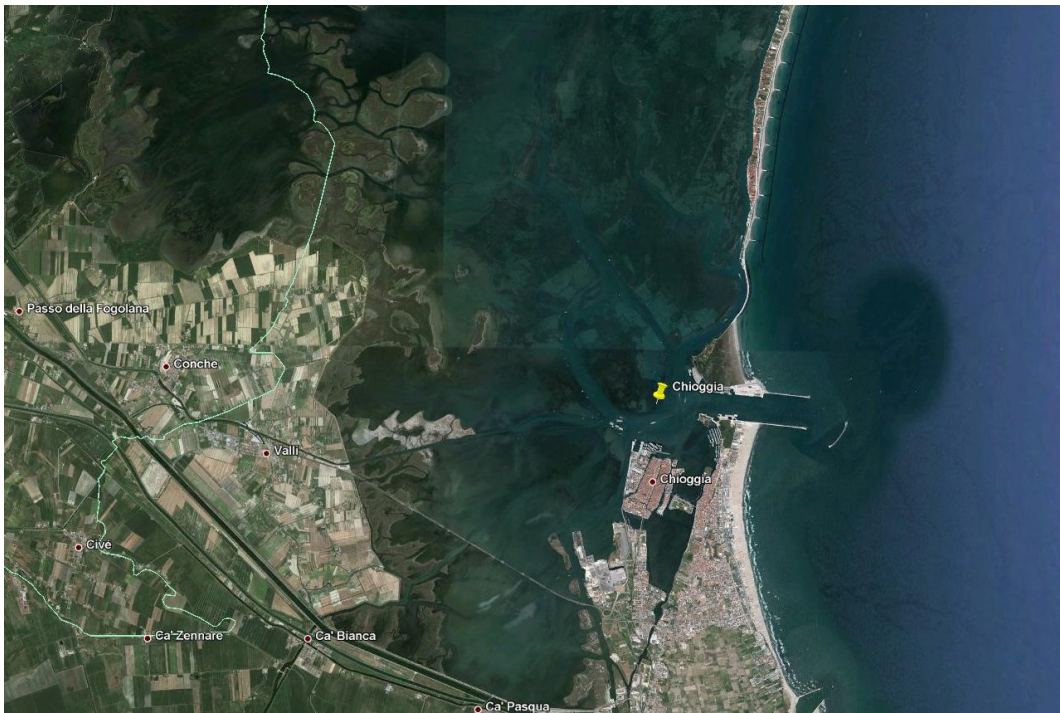


(a)



(b)

Figura 3.2: Dettaglio caratteristiche ambientali dei siti di campionamento: (a) – Albegna (Albe), (b) – Bonello (Bone).

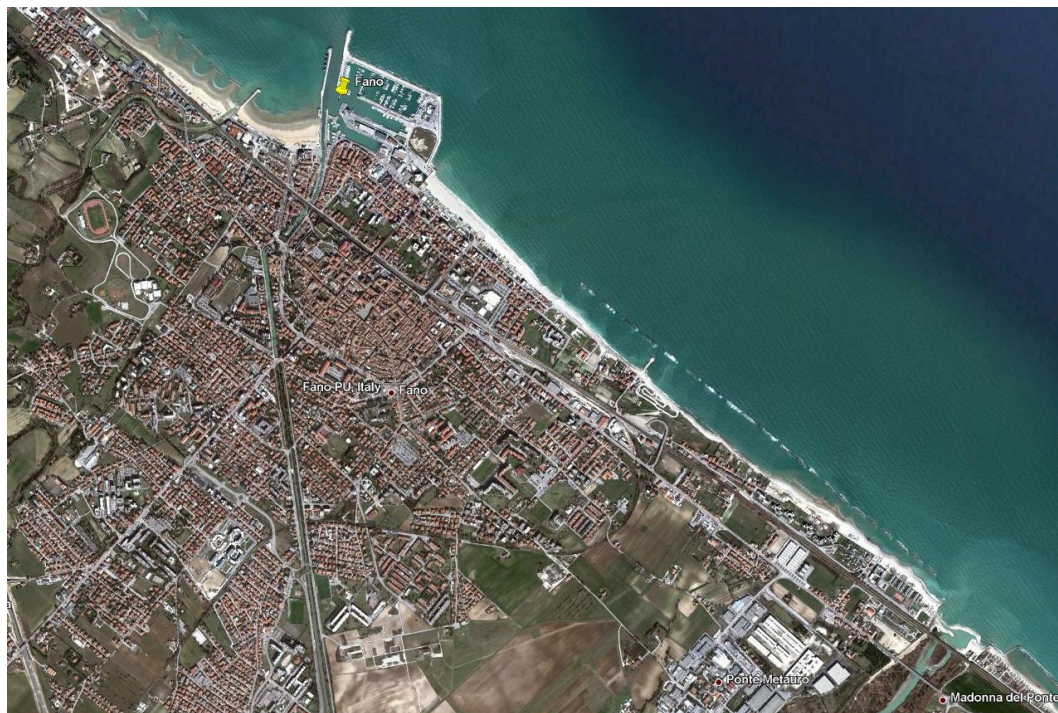


(a)

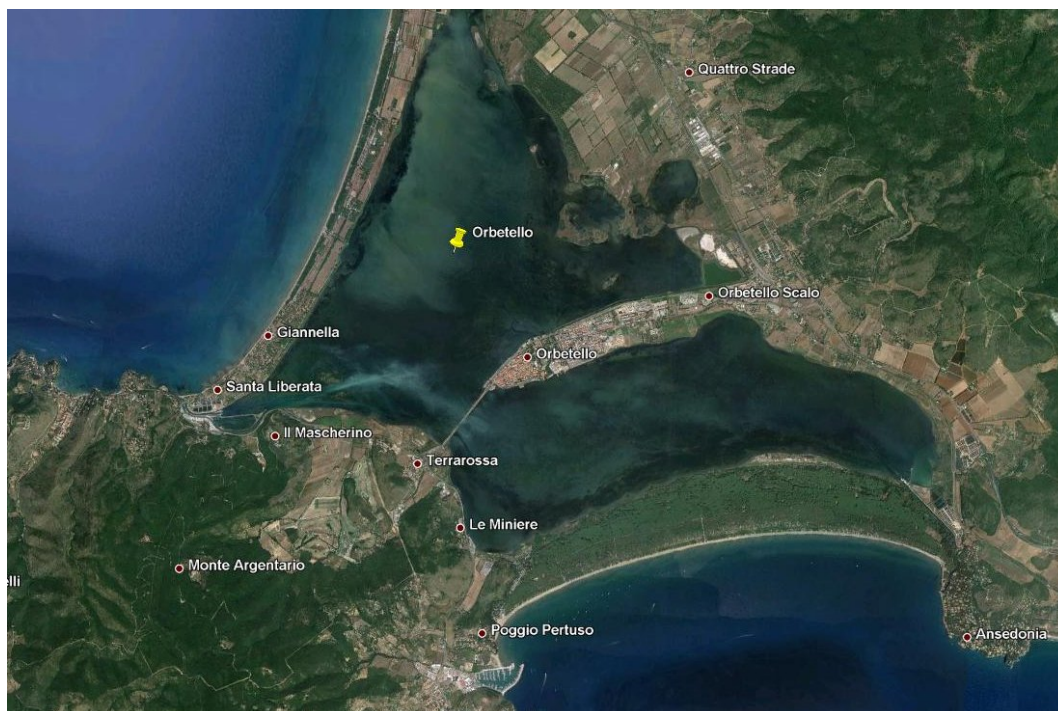


(b)

Figura 3.3: Dettaglio caratteristiche ambientali dei siti di campionamento: (a) – Chioggia (Chio), (b) – Comacchio (Coma).



(a)



(b)

Figura 3.4: Dettaglio caratteristiche ambientali dei siti di campionamento: (a) – Fano (Fano), (b) – Orbetello (Orbe).



(a)



(b)

Figura 3.5: Dettaglio caratteristiche ambientali dei siti di campionamento: (a) – Succì (Succ), (b) – Noghera (Nogh).

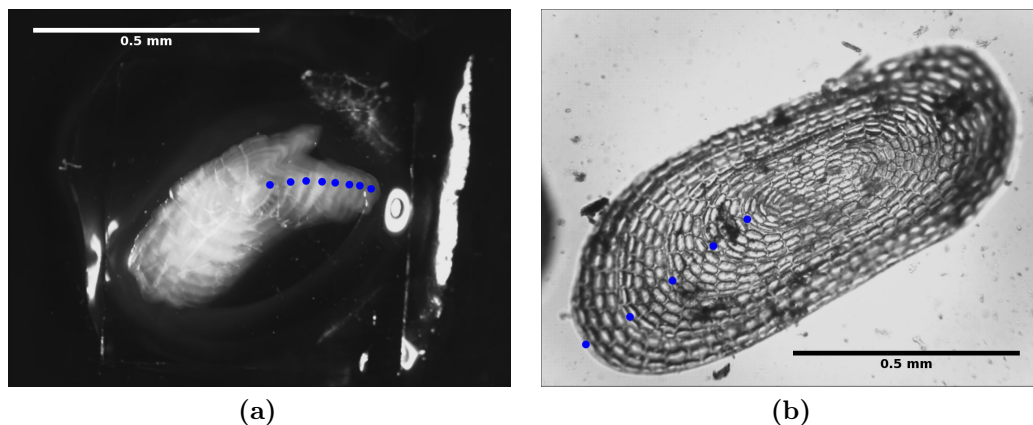


Figura 3.6: Stima dell'età: (a) mediante lettura discontinuità su otoliti e (b) su scaglie.

3.2 Biometria

Su tutti gli esemplari sono state effettuate misure di lunghezza totale (LT) in mm, peso in g, valutazione macroscopica del sesso (I – indeterminati, F – femmine, M – maschi) e stima dell'età mediante lettura di otoliti e scaglie (figura 3.6). Le letture degli otoliti sono state effettuate dopo la fase di montaggio e levigatura ad otolite ancora umido per migliorare la visibilità e il contrasto delle discontinuità di accrescimento. Volutamente non si sono effettuate colorazioni o etching per non compromettere la composizione chimica degli otoliti destinati alle analisi microchimiche. Nell'assegnazione dell'età non si è tenuto conto della fase di migrazione ma solo degli annuli postmetamorfosi. La durata della migrazione anche se non conosciuta è stata considerata costante per tutti gli individui campionati.

La lunghezza totale e il peso sono stati analizzati per studiarne la relazione anche in funzione della località e si sono calcolati range, media, deviazione standard, distribuzione ed eventuali regressioni. A causa dell'impossibilità di raggiungere un disegno sperimentale bilanciato, i dati sono stati analizzati graficamente mediante dispersione di punti e boxplot.

3.3 Estrazione scaglie

Da ogni individuo sono state estratte, mediante rimozione dello strato di muco e raschiamento, le scaglie da tre posizioni lungo il corpo: testa, tronco, coda. Il raschiamento è stato effettuato mediante la lama di un coltello in ceramica nero che garantisce un ottimo contrasto con il colore chiaro delle scaglie rimosse e una più facile quantificazione del materiale asportato (Fig: 3.7 nella pagina successiva). Acquisita una certa esperienza si è cercato di asportare una quantità di materiale che contenesse almeno 50 scaglie per ogni posizione. Per evitare fenomeni di distorsione e garantire un'efficace conservazione il materiale asportato è stato conservato in microtubi da 2 mL riempiti con 1 mL di formalina al 2%. Per evitare compattazione delle scaglie con il muco comunque presente durante il raschiamento ogni microtubo è stato sottoposto a rimescolamento mediante Vortex per 15 secondi. Le scaglie sono state osservate al microscopio dopo un periodo di fissazione compreso tra

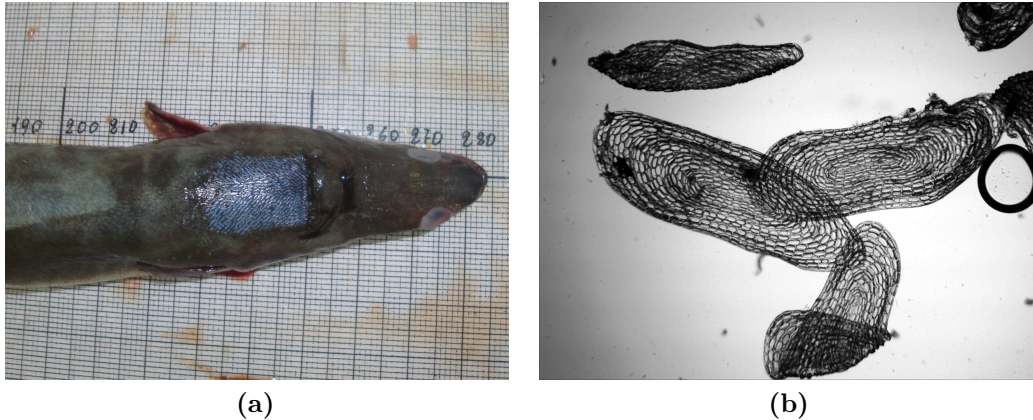


Figura 3.7: (a) Grattaggio delle scaglie dalla regione cefalica. (b) Scaglie montate su vetrino e osservate al microscopio ottico in luce trasmessa

un minimo di 7 e un massimo di 180 giorni e un'opportuna risospensione del materiale sedimentato. Sul vetrino è stato posto una quantità di materiale che contenesse almeno 25 scaglie. Su ogni vetrino si sono poi osservate almeno 20 scaglie e per ognuna si è stimata l'età identificando le discontinuità nel pattern di crescita (Fig: 3.6 nella pagina precedente).

3.4 Estrazione e pulizia otoliti

Per estrarre gli otoliti dalla scatola cranica di anguilla adulta si è messa a punto una tecnica che prevede l'incisione mediante tre tagli: un primo taglio è effettuato trasversalmente all'altezza degli occhi fino alla mascella inferiore, un secondo taglio sempre trasversale all'altezza delle branchie fino all'esofago e un ultimo taglio questa volta longitudinale che unisce i due precedenti; per gli esemplari più piccoli è stato omesso il primo taglio e quello longitudinale arriva fino all'apice della bocca. Questo consente un facile accesso alle cavità che ospitano gli otoliti e consente il drenaggio dei liquidi che ne ostacolano l'individuazione e l'estrazione. L'estrazione vera e propria è stata condotta con pinzette in plastica appuntite per evitare rotture degli otoliti stessi (Fig: 3.8 nella pagina successiva). Nel caso degli stadi giovanili (ceche e ragani) l'estrazione è stata condotta in immersione d'acqua bidistillata dentro capsule petri poste sotto uno stereomicroscopio e mediante l'uso di aghi da dissezione. Per evitarne di dannergiarli, i piccoli otoliti, liberati dal cranio, sono stati estratti mediante pipettamento con micropipette i cui puntali sono stati recisi per ottenere fori di diametro adatto agli otoliti da prelevare. Prima dello stoccaggio a secco in microtubi da 2 mL, opportunamente etichettati, è stata rimossa per quanto possibile la membrana che ricopre gli otoliti, per scongiurare la formazione di muffe e conseguente acidificazione ed erosione della superficie dell'otolite, che ne comprometterebbe forma e composizione (Fig: 3.8 a fronte). Una volta stoccati, gli otoliti sono stati sottoposti ad un protocollo di pulizia e decontaminazione entro 30 giorni dall'estrazione:



Figura 3.8: (a) Estrazione degli otoliti dalla scatola cranica. (b) Stoccaggio degli otoliti estratti in microtubi opportunamente etichettati.

- reidratazione dei tessuti con 1 mL di acqua bidistillata e filtrata 0.2 μm per 15 min
- drenaggio e aggiunta di 1 mL di perossido d'idrogeno al 3% per 10 min
- drenaggio e aggiunta di 1 mL di acqua bidistillata e filtrata 0.2 μm in sonificatore per 5 min da ripetere per 3 volte
- essiccamento in stufa a 37 °C "overnight".

Tutto il protocollo è eseguito in microtubi da 2 mL e il drenaggio avviene mediante micropipette con puntali da 1 mL e da 200 μL . Dopo questo trattamento gli otoliti si conservano indefinitamente.

3.5 Acquisizione immagini digitali

Una volta puliti e decontaminati tutti gli otoliti di anguille adulte sono stati fotografati mediante una camera digitale (DCM500 USB2.0 5MP) applicata allo stereomicroscopio (Wild) con ingrandimento 6x, 12x, 25x e 50x (Fig: [3.9 nella pagina successiva](#)). L'ingrandimento è stato scelto secondo un criterio oggettivo: l'immagine dell'otolite deve essere pari a due terzi del campo inquadrato. Per ogni otolite (sia destro che sinistro) sono state acquisite 2 immagini, una prossimale e una distale, alla risoluzione di 1280x960 pixel con luce riflessa led da 3 W e angolo di fascio 20°. Questa risoluzione, combinata con il giusto rapporto di ingrandimento al microscopio, è stata scelta per avere un numero sufficiente di punti (superiore a 1000) lungo il contorno degli otoliti per le successive analisi morfometriche. Per aumentare il contrasto e semplificare il successivo riconoscimento automatico del contorno, gli otoliti sono stati posti su una superficie nera opaca e priva di graffi per evitare dannose riflessioni e illuminati lateralmente con due fasci per annullare le ombre. Nelle successive fasi di lavorazione gli otoliti sono stati fotografati anche al microscopio ottico (Leitz Ortholux II) a 100x e 400x per valutare la qualità del risultato ottenuto e per individuare pattern a livello microstrutturale. Anche le squame sono state fotografate mediante microscopio ottico con ingrandimenti

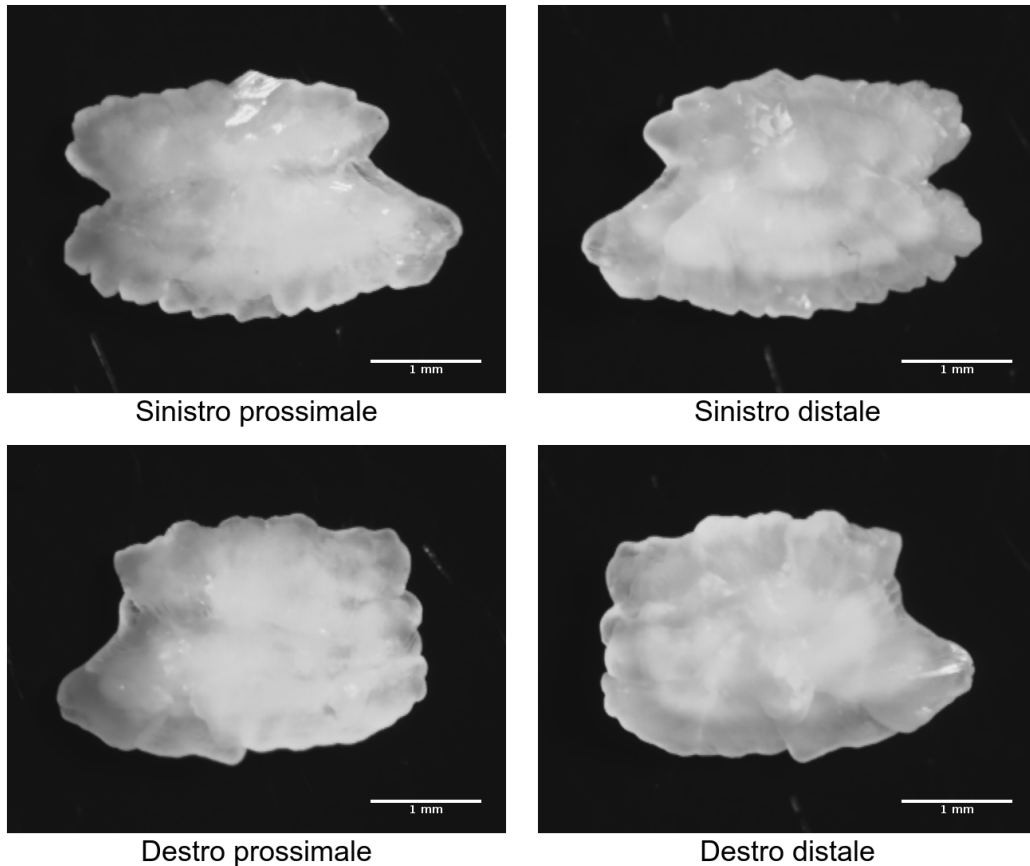


Figura 3.9: Immagini digitali di una coppia di sagitte acquisita attraverso stereo microscopio

fino a 100x. Tutte le immagini sono state calibrate spazialmente mediante vetrino micrometrico, tenendo conto del tipo di illuminazione (trasmessa o riflessa). La calibrazione è stata effettuata in modo automatico in ambiente ImageJ [Abramoff et al., 2004] con opportuno script messo a punto personalmente.

3.6 Inclusione e lavorazione otoliti

Una volta fotografati, gli otoliti sono stati sottoposti a montaggio in resina su vetrino da microscopio e lavorati opportunamente secondo un metodo innovativo messo a punto durante l'attività di ricerca (Fig: 3.10 a fronte). Data la piccola dimensione degli otoliti di anguilla (4 – 5 mm al massimo) si è proceduto in questo modo:

- mediante punta al vidia affilata al diamante (taglio vivo di 2 mm) si sono tagliati piccoli pezzi quadrati di vetrino coprioggetto (al massimo 10 mm di lato);
- un singolo pezzo di coprioggetto è stato incollato mediante resina termoplastica Crystalbond 509 clear al centro di un vetrino da microscopio;

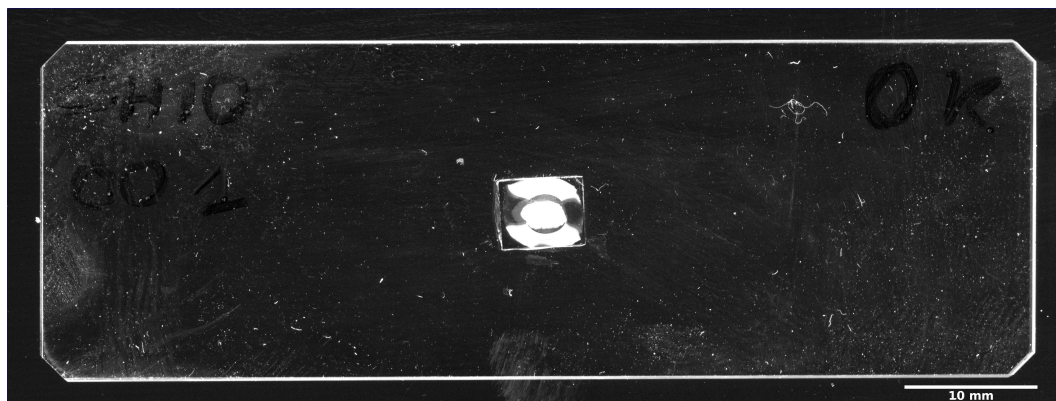


Figura 3.10: Montaggio degli otoliti in goccia di resina epossidica su vetrino

- si pone una singola goccia di resina epossidica atossica bicomponente senza solvente (E-30 effetto acqua Prochima) sul pezzetto di coprioggetto facendo attenzione a non oltrepassarne i bordi;
- si immerge l'otolite nella goccia di resina avendo cura di bagnarlo uniformemente evitando la formazione di bolle e posizionandolo con il solco acustico verso l'alto;
- si lascia catalizzare la resina epossidica per almeno 36 ore in stufa a 37 °C.

Per evitare la formazione di bolle e massimizzare la forza di adesione della resina epossidica, tutti gli elementi che compongono il sistema di montaggio sono stati preriscaldati a 37 °C. In particolare durante la preparazione della resina epossidica entrambi i componenti sono stati preriscaldati e una volta mescolati accuratamente sono stati sottoposti a sonicatura per allontanare le eventuali bolle formatesi e assicurare la perfetta miscelazione dei componenti. Gli otoliti così montati sono pronti per la successiva levigatura ad umido (acqua bidistillata) mediante carte abrasive al carburo di silicio con granulometria di P1500, P2500, P4000. Durante questa fase l'obiettivo è quello di raggiungere il livello del nucleo di formazione dell'otolite. Tutte le operazioni sono monitorate periodicamente al microscopio. Una volta raggiunto il nucleo si passa alla lucidatura ad umido (acqua bidistillata) mediante carte di lappatura all'ossido di alluminio (allumina) con granulometria decrescenti da 5 μm a 0.1 μm . Durante ogni passaggio da un abrasivo ad un altro il campione viene sottoposto a sonicatura in acqua bidistillata per rimuovere ogni traccia di materiale abraso e abrasivo dalla superficie dell'otolite ed evitare la formazione di graffi profondi. Tutte le operazioni sono state effettuate manualmente, per controllare meglio le varie fasi di lavorazione, su opportuni supporti quadrati resi perfettamente piani mediante rettifica (laminato in plexiglass di 7 mm di spessore e 12 cm di lato) in cui si è incollato con adesivo spray la carta abrasiva o di lappatura. Terminata la procedura di levigatura e lucidatura i campioni sono stati sonicati, asciugati e conservati a secco fino alle analisi successive.

3.7 Etching

I campioni di otoliti di ceche (e di alcune anguille adulte) da analizzare al microscopio a scansione elettronica (SEM) una volta levigati e lucidati sono stati trattati chimicamente (etching) per enfatizzare le differenze nella composizione del materiale biomineralizzato (matrice cristallina e proteica). Si sono testate due tipologie di etching:

- Acido, mediante HCl 1% per 10 – 30 s;
- Decalcificante, mediante EDTA 5% per 2 – 5 min.

Dopo l'attacco chimico i campioni sono stati immersi alcune volte in acqua bidistillata e filtrata 0.2 μm per allontanare i reagenti e arrestare l'attacco chimico. Si è evitato volutamente l'uso del sonicatore perché si è riscontrata un'alterazione della microtopografia messa in luce dall'etching, che essendo fragile viene asportata dall'azione degli ultrasuoni. I campioni sono poi stati essiccati sempre a 37 °C overnight. Una volta asciutti i campioni sono stati fotografati al microscopio ottico ($N = 39$) e una parte al SEM ($N = 20$).

3.8 SEM

Dopo levigatura, lucidatura ed etching i campioni sono stati trasferiti su stub di ottone sfruttando il particolare sistema di montaggio e le proprietà termoplastiche della resina che unisce vetrino e coprioggetto (Fig: 3.11 nella pagina successiva). Una volta sullo stub il campione è stato metallizzato con oro (100 Å) e fotografato al SEM (Hitaci S-2400) a 10 – 25 kV fino a 2000 ingrandimenti (Fig: 3.11 a fronte). Le immagini comprendono una panoramica a basso ingrandimento per decidere la traiettoria migliore da fotografare poi a più alto ingrandimento acquisendo più immagini parzialmente sovrapposte che coprono la direttrice nucleo – bordo. Su queste immagini si sono individuate le principali discontinuità, le distanze dal nucleo e i diametri delle principali zone individuate: in particolare il diametro del nucleo e della fase di crescita marina sono serviti a dimensionare lo stop laser per le indagini microchimiche. Nelle zone con incrementi giornalieri riconoscibili se ne è effettuato il conteggio per stimare l'età degli individui.

3.9 LA-ICP-MS

Le indagini microchimiche sono state condotte tramite LA-ICP-MS (laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry) sui campioni levigati e lucidati ($N = 45$) effettuando 4 spot su ogni campione. Uno spot è stato centrato sul nucleo ed è indicato con a , gli altri 3 chiamati $b - c - d$ posizionati nelle sue vicinanze, evitando il cratere di ablazione degli altri spot e controllando di rimanere nella zona di crescita corrisponde alla fase marina, approssimativamente in un raggio di 75 μm (3.12 a pagina 44). Su un numero ristretto di campioni ($N = 6$) si sono effettuate analisi lungo un transetto dal nucleo al bordo (3.12 a pagina 44) distanti

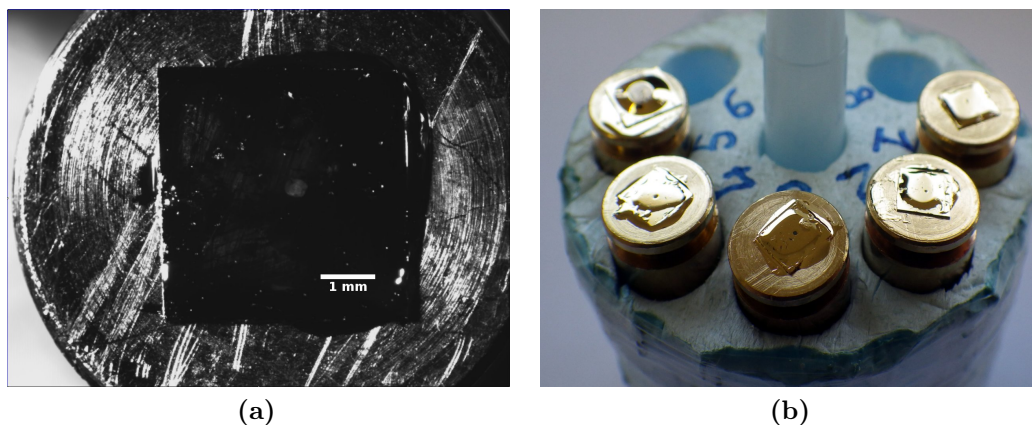


Figura 3.11: Montaggio degli otoliti su stub per indagini elettroniche al microscopio a scansione: (a) – prima e (b) – dopo metallizzazione con oro.

circa $75\ \mu\text{m}$ uno dall'altro indicando con $p1$ e $p2$ i più vicini al nucleo e con p gli altri. I parametri delle analisi sono i seguenti:

- Lunghezza d'onda laser $193\ \text{nm}$
- Frequenza laser $8\ \text{Hz}$
- Diametro spot laser analisi degli standard $50\ \mu\text{m}$
- Diametro spot laser analisi campione zona nucleare $35\ \mu\text{m}$
- Diametro spot laser analisi lungo transetto $50\ \mu\text{m}$
- Potenza laser $3.5\ \text{mW}$
- Carrier He-Ar
- Elan DRC-e spettrometro di massa a quadrupolo

Per la calibrazione e l'integrazione dei risultati sono stati effettuati 2 spot su vetro NIST910 e 1 spot su BCR2 all'inizio e fine delle varie corse e ogni 20 spot effettuati sui campioni in esame. Per la calibrazione interna e la compensazione della quantità di materiale ablatato è stato usato il conteggio di ^{44}Ca . La riduzione dei dati è stata fatta con il programma Glitter [Van Achterbergh et al., 2001]. Per ottimizzare i tempi di analisi e di conseguenza il costo giornaliero, i vari otoliti sono stati trasferiti su dischi in vetro da $30\ \text{mm}$ di diametro e $1\ \text{mm}$ di spessore. Questa accortezza ha annullato i tempi per ripristinare il vuoto nella camera d'analisi e la stabilizzazione della linea di base tra i vari campioni. I tre spot esterni al core sono stati testati statisticamente e quando possibile mediati per aumentare la robustezza del dato. Sono stati ricercati i seguenti 25 elementi: ^7Li , ^{11}B , ^{23}Na , ^{25}Mg , ^{43}Ca , ^{44}Ca , ^{45}Sc , ^{49}Ti , ^{51}V , ^{53}Cr , ^{55}Mn , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{66}Zn , ^{85}Rb , ^{88}Sr , ^{89}Y , ^{90}Zr , ^{93}Nb , ^{111}Cd , ^{133}Cs , ^{138}Ba , ^{208}Pb : dopo la riduzione dei dati, sono stati scelti quegli elementi al di sopra del livello di confidenza di rilevanza presenti in almeno il 50% dei campioni. Le concentrazioni degli elementi sono state trasformate in rapporto elemento/Ca e moltiplicate per 1000 per esigenze tipografiche e

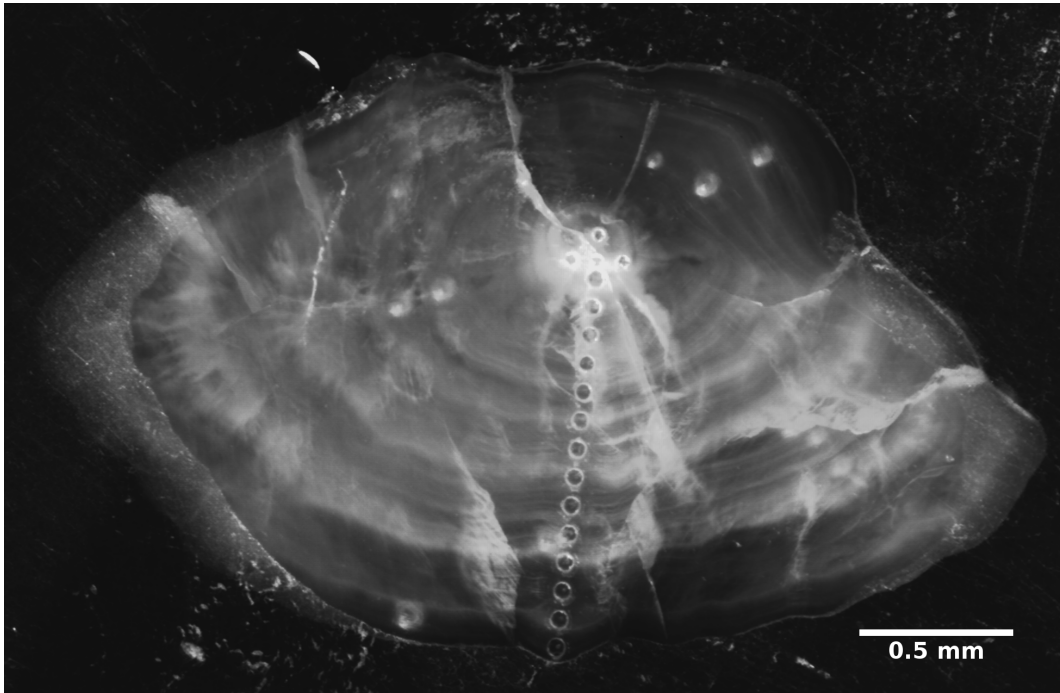


Figura 3.12: Campione di otolite levigato e sottoposto ad analisi di ablazione laser, notare i 4 spot nella regione centrale ($35\ \mu\text{m}$) e lungo il transetto dalla regione centrale al bordo ($50\ \mu\text{m}$)

di lettura. I dati così trasformati sono stati utilizzati per calcolare ordinamenti multivariati con tecnica PCA e distribuzioni univariate mediante boxplot correlati a sito di campionamento, età, sesso e anno di nascita stimato.

3.10 Morfometria

Le immagini digitali degli otoliti fotografati ($N = 283$) allo stereomicroscopio sono stati processati con un algoritmo messo a punto in ambiente Imagej [Abramoff et al., 2004] che in successione effettua le seguenti operazioni (Fig: 3.13 nella pagina successiva):

- Riduzione dello spazio colore da 24 bit colore a 8 bit scala di grigi
- Riduzione da scala di grigi a immagini bianco – nero 1 bit mediante soglia
- Individuazione del contorno dell’otolite
- Calcolo dei principali parametri geometrici (area, perimetro, diametro massimo (Feret) e minimo (MinFeret), "aspect ratio" (AR), rotondità, circolarità e solidità)

Feret Massima distanza tra due punti lungo il contorno (massima misura al calibro) – misurato in *mm*

MinFeret Minima distanza tra due punti lungo il contorno (minima misura al calibro) – misurato in *mm*



Figura 3.13: Esempio di processamento immagini automatico per individuazione contorno

Perimetro Perimetro misurato lungo il contorno dell'otolite – misurato in mm

Area Area dell'intero otolite racchiuso dal contorno – misurato in mm^2

AR "Aspect ratio" è il rapporto tra l'asse maggiore e minore dell'ellisse che circonda il contorno dell'otolite – numero adimensionale

Circolarità È proporzionale al rapporto tra l'area e il perimetro al quadrato, il valore 1 indica un cerchio perfetto mentre lo 0 indica una forma sempre più allungata – numero adimensionale

Rotondità È l'inverso dell'AR ed è una misura della rugosità del contorno – numero adimensionale

Solidità È il rapporto tra l'area e l'area convessa ed esprime appunto la convessità del contorno – numero adimensionale.

Sui parametri restituiti dall'algorithm si sono eseguite analisi di statistica descrittiva visualizzate mediante boxplot per individuare eventuali differenze e correlarle ai siti di campionamento e alle altre variabili. Sulle immagine in bianco-nero è stata applicata l'analisi ellittica di Fourier (EFA) [Bonhomme et al., 2014; Kuhl e Giardina, 1982] per ricostruire il contorno dell'otolite mediante riparametrizzazione delle coordinate cartesiane e definizione dei coefficienti armonici. Per ottimizzare l'analisi EFA si è calcolato il numero ottimale di armoniche mediante ricostruzioni grafiche e metodi analitici. Nel metodo grafico si è plottato un pannello di immagini ricostruite usando un numero crescente di armoniche che approssimano sempre meglio la forma originale. Nei metodi analitici si è valutata la varianza degli scostamenti tra forma originale e ricostruita in funzione del numero crescente di armoniche. Una volta definito il numero di armoniche da utilizzare e i relativi parametri, si sono condotte analisi multivariate con ordinamenti PCA per individuare eventuali pattern correlati alle variabili oggetto di studio come località, età e sesso.

3.11 Analisi dati

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate in ambiente R [R Core Team, 2014] utilizzando le routine di base e i seguenti pacchetti:

- Momocs per la morfometria (analisi ellittica di Fourier) [Bonhomme et al., 2014]

- ggplot2 per la rappresentazione grafica dei risultati [Wickham, 2009]
- ADE4 per le analisi multivariate [Dray e Dufour, 2007]
- dplyr per la normalizzazione dei dati (tidy data) [Wickham e Francois, 2015]

Capitolo 4

Risultati

4.1 Biometria

In generale la composizione per sesso degli esemplari campionati, al netto di ceche e di ragani, mostra un sostanziale equilibrio tra esemplari indeterminati (110) ed esemplari adulti (173), ma un sostanziale squilibrio tra i sessi: 110 femmine contro 6 maschi. Questo dato non riflette appieno la distribuzione in natura, a causa del sistema di campionamento che privilegia esemplari ancora giovani e esemplari in maturazione che si accingono alla migrazione, generalmente di sesso femminile e di taglia maggiore. Inoltre la determinazione macroscopica del sesso è molto difficile e valida solo per esemplari in avanzato stadio di maturazione. Comunque anche campionamenti ad hoc per la cattura di esemplari maschi a scopo riproduttivo per l'acquacoltura hanno evidenziato una sex-ratio fortemente a favore delle femmine. In dettaglio la distribuzione per sesso a livello di sito di campionamento è mostrato in tabella 4.1

Tabella 4.1: Tabella sinottica della distribuzione per sesso nelle località di campionamento.

Sesso	Bone	Chio	Coma	Fano	Nogh	Orbe	Succ	Totale
I	0	0	0	31	0	20	59	110
F	19	23	89	24	12	0	0	167
M	0	0	0	0	6	0	0	6

Anche la distribuzione per taglia purtroppo non rispecchia quella naturale perchè il campionamento è selettivo e legato anche a tradizioni locali che prediligono determinate classi di taglia per il commercio e la trasformazione. Nella tabella 4.2 a pagina 49 sono indicati i principali parametri statistici relativi a lunghezza totale e nella tabella 4.3 a pagina 49 quelli relativi al peso degli esemplari giovanili e adulti nei vari siti.

I dati relativi alle lunghezze di ceche e ragani sono mostrati in tabella 4.4 a pagina 52 e quelli relativi al peso in tabella 4.5 a pagina 52

La relazione lunghezza peso degli esemplari giovanili e adulti nel loro complesso ha un andamento esponenziale come evidenziato nella figura 4.1 nella pagina successiva.

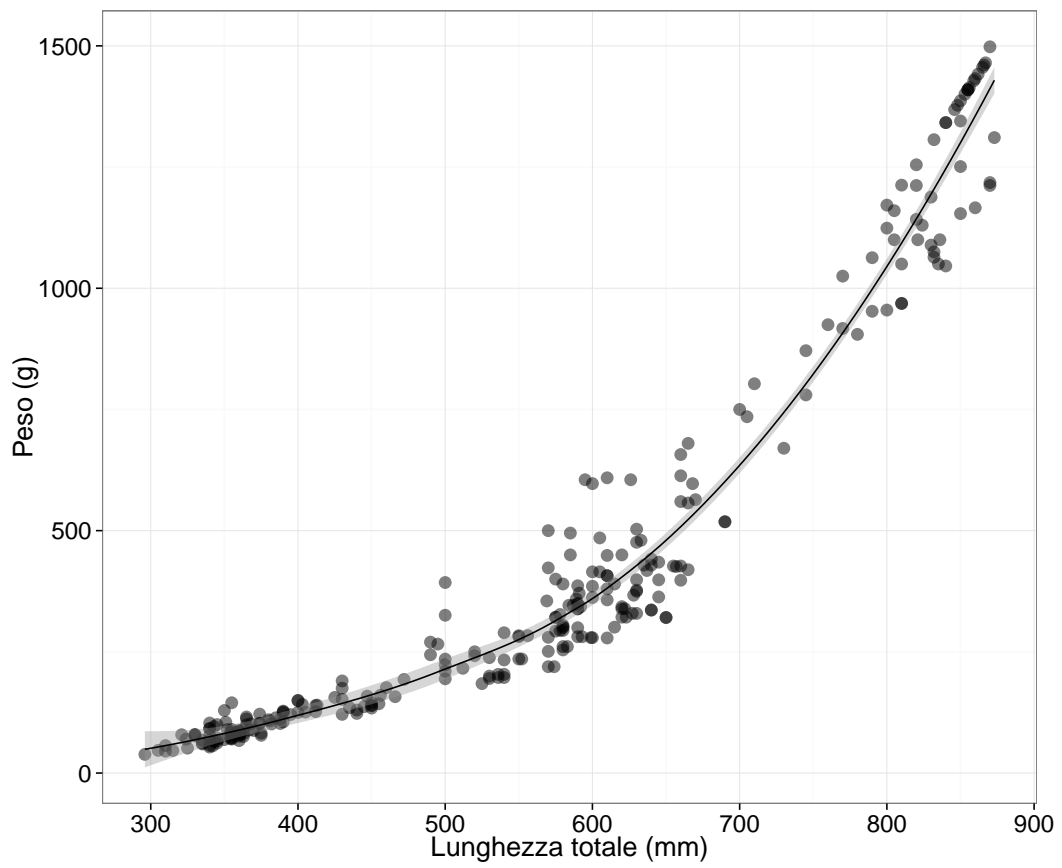


Figura 4.1: Relazione lunghezza peso degli esemplari giovanili e adulti.

Tabella 4.2: Tabella sinottica della distribuzione di taglia per località di campionamento degli esemplari giovanili e adulti. LT - lunghezza totale in mm, dev. std. - deviazione standard.

Site	N	LT min	LT max	LT media	dev.std.
Bone	19	536	810	614	62
Chio	23	512	665	607	42
Coma	89	540	873	725	113
Fano	55	330	805	502	99
Nogh	18	500	870	664	133
Orbe	20	305	390	347	20
Succ	59	296	556	369	40

Tabella 4.3: Tabella sinottica della distribuzione di peso per località di campionamento degli esemplari giovanili e adulti. Peso - peso in g, dev. std. - deviazione standard.

Site	N	Peso min	Peso max	Peso medio	dev. std.
Bone	19	197	968	349	170
Chio	23	216	425	353	56
Coma	89	197	1465	811	431
Fano	55	76	1100	281	205
Nogh	18	195	1498	669	452
Orbe	20	45	105	67	13
Succ	59	38	283	99	36

In figura 4.2 nella [pagina seguente](#) sono evidenziati i siti di campionamento: Orbetello e Succi sono caratterizzati da esemplari giovani, Fano mostra il più ampio range di taglia, mentre gli altri siti sono caratterizzati da soli individui adulti (argentine).

Tra gli individui di taglia maggiore quelli di Bonello mostrano un peso inferiore a parità dimensione, mentre tra i più piccoli quelli Orbe hanno un peso inferiore a Succ. Nella figura 4.3 a [pagina 51](#) possiamo notare che applicando il logaritmo alle variabile messe in relazione otteniamo un andamento lineare. In questo modo è più facile confrontare le pendenze delle rette di regressione che rappresentano il coefficiente b della relazione allometrica lunghezza-peso. Nella tabella 4.6 a [pagina 56](#) sono riportati i parametri della regressione lineare (della relazione lunghezza-peso linearizzata mediante logaritmo): il valore molto basso di b per il sito di Chio è dovuto al limitato range di taglia del campione e all'ampia variabilità individuale.

Come evidenziato precedentemente il campionamento non è stato omogeneo per taglia nei vari siti per effetto di diversi fattori, tra cui selettività degli attrezzi utilizzati, caratteristiche ambientali, tradizioni di pesca e disponibilità (figura 4.4 a [pagina 51](#)). Nel caso delle ceche invece il range di taglia tra i due siti di campionamento è confrontabile (figura 4.4 a [pagina 51](#))

Nel caso di ceche e ragani invece la relazione è più complessa: le taglie più

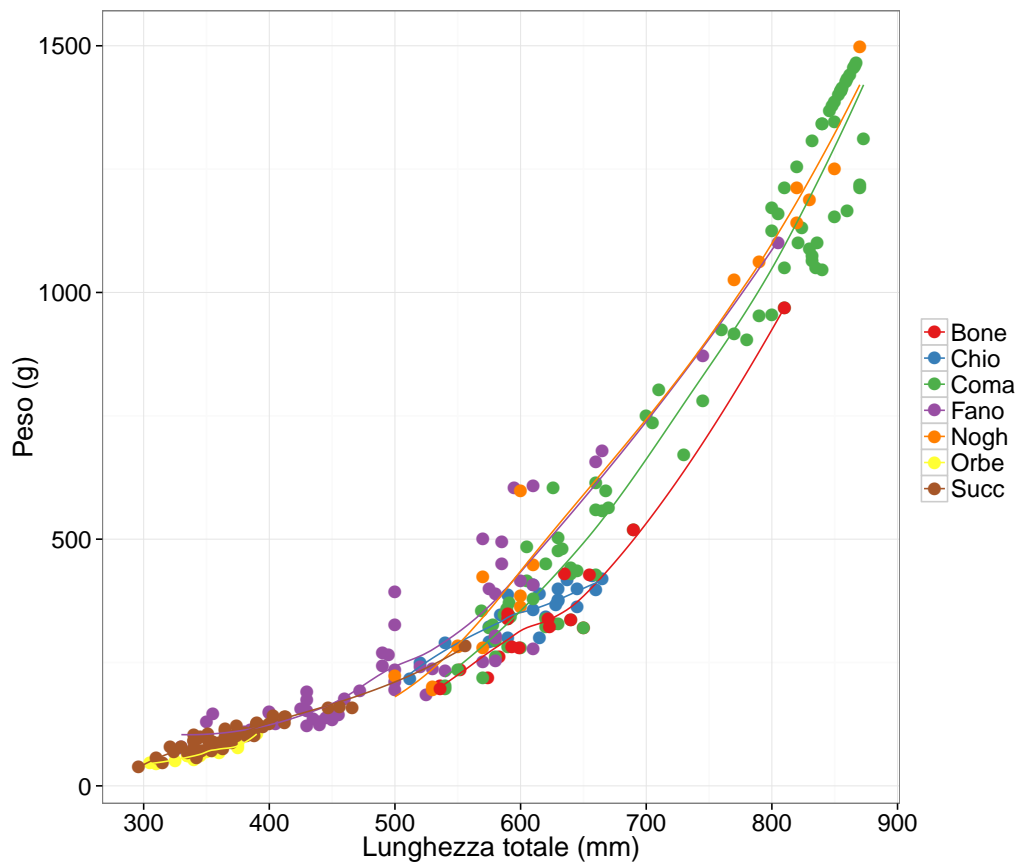


Figura 4.2: Relazione lunghezza peso degli esemplari giovanili e adulti separati per sito di campionamento.

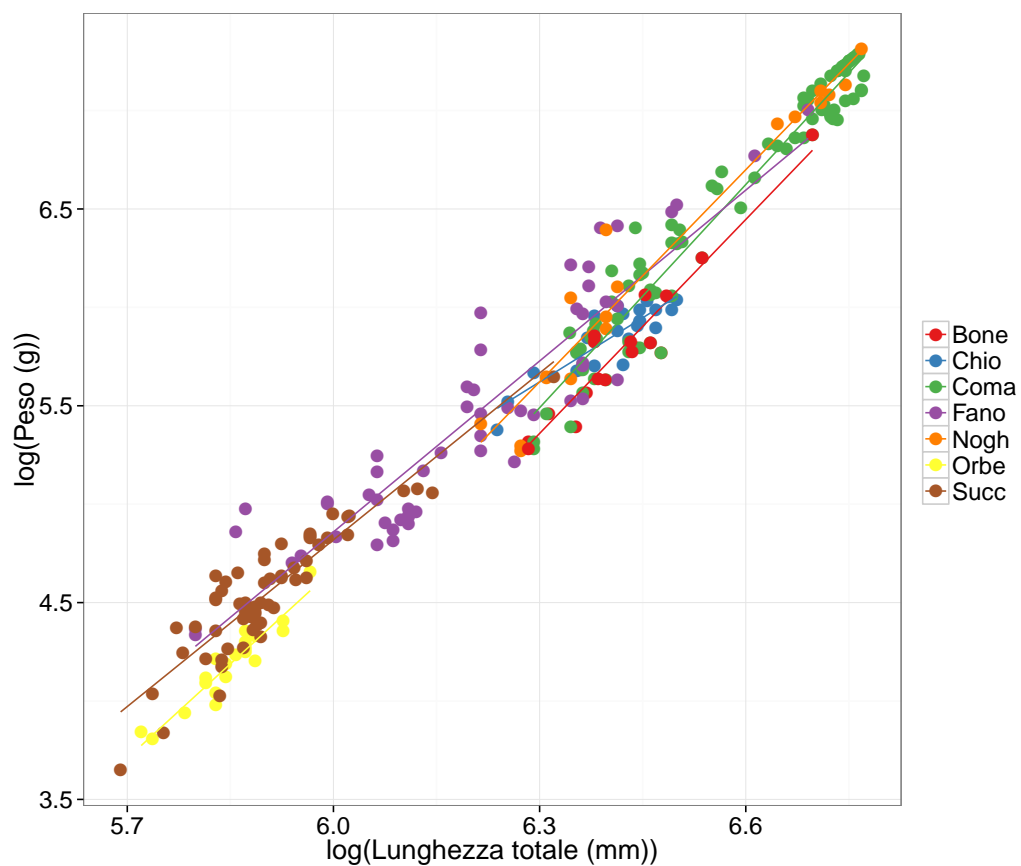


Figura 4.3: Relazione lunghezza peso degli esemplari giovanili e adulti separati per sito di campionamento linearizzata mediante applicazione del logaritmo alle variabili.

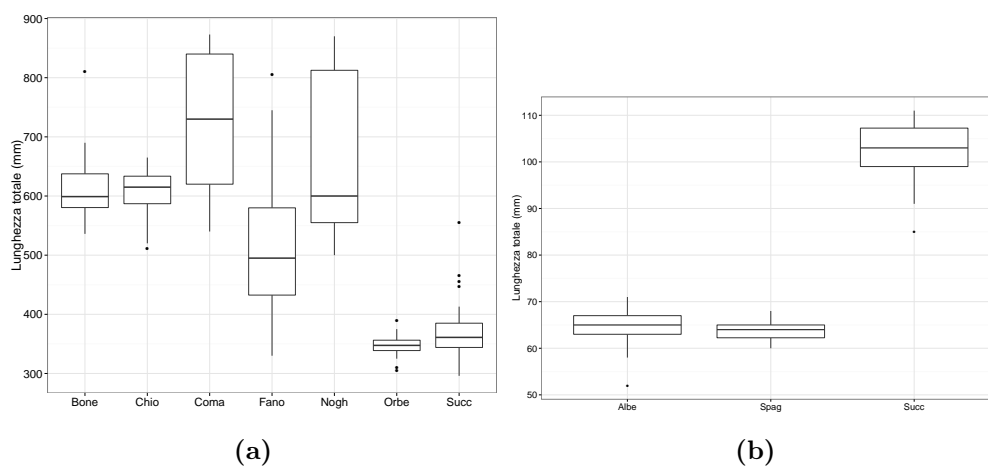


Figura 4.4: Boxplot della distribuzione delle lunghezze totali degli esemplari campionati: (a) – adulti, (b) – ceche e ragani.

Tabella 4.4: Tabella sinottica della distribuzione di taglia per località di campionamento di ceche e ragani. LT - lunghezza totale in mm, dev. std. - deviazione standard.

Site	N	LT min	LT max	LT media	dev.std.
Albe	69	52	71	64.754	3.215
Spag	18	60	68	63.667	2.326
Succ	16	85	111	101.812	7.222

Tabella 4.5: Tabella sinottica della distribuzione di peso per località di campionamento di ceche e ragani. Peso - peso in g, dev. std. - deviazione standard.

Site	N	Peso min	Peso max	Peso medio	dev. std.
Albe	69	0.060	0.190	0.134	0.029
Spag	18	0.060	0.250	0.114	0.043
Succ	16	0.260	1.670	1.199	0.374

piccole corrispondenti alle ceche mostrano una buona relazione lineare mentre i ragani una distribuzione più eterogenea (figura 4.5 nella pagina successiva).

Le ceche spagnole pesano meno a parità di taglia come evidenziato dalla figura 4.6 a pagina 54 e ancora meglio in figura 4.7 a pagina 55.

4.2 Estrazione e pulizia otoliti

Il protocollo di estrazione e pulizia messo a punto si è rivelato particolarmente efficace consentendo la raccolta e lo stoccaggio di tutti gli otoliti estratti senza nessun danno o perdita di campioni con una recovery di oltre il 95% anche per gli individui di taglia più piccola. La superficie dell'otolite perfettamente pulita ha consentito l'acquisizione di immagine di alta qualità ed evitato artefatti che possono alterare le indagini morfometriche. Inoltre ha garantito un'ottima adesione della resina epossidica durante il montaggio e la lavorazione degli otoliti. Dopo 4 anni di stoccaggio la superficie è ancora pulita e non si sono sviluppati organismi dannosi all'interno dei microtubi di stoccaggio.

4.3 Inclusione e lavorazione otoliti

L'innovativo sistema di montaggio messo a punto durante l'attività di ricerca si è rivelato estremamente produttivo sotto molti punti di vista:

- minimo utilizzo di resina epossidica e di resina termoplastica
- minor tempo di lavorazione di ogni singolo otolite
- ottimizzazione dei tempi di analisi laser ed elettronica
- possibilità di effettuare le lavorazioni ad umido o a secco

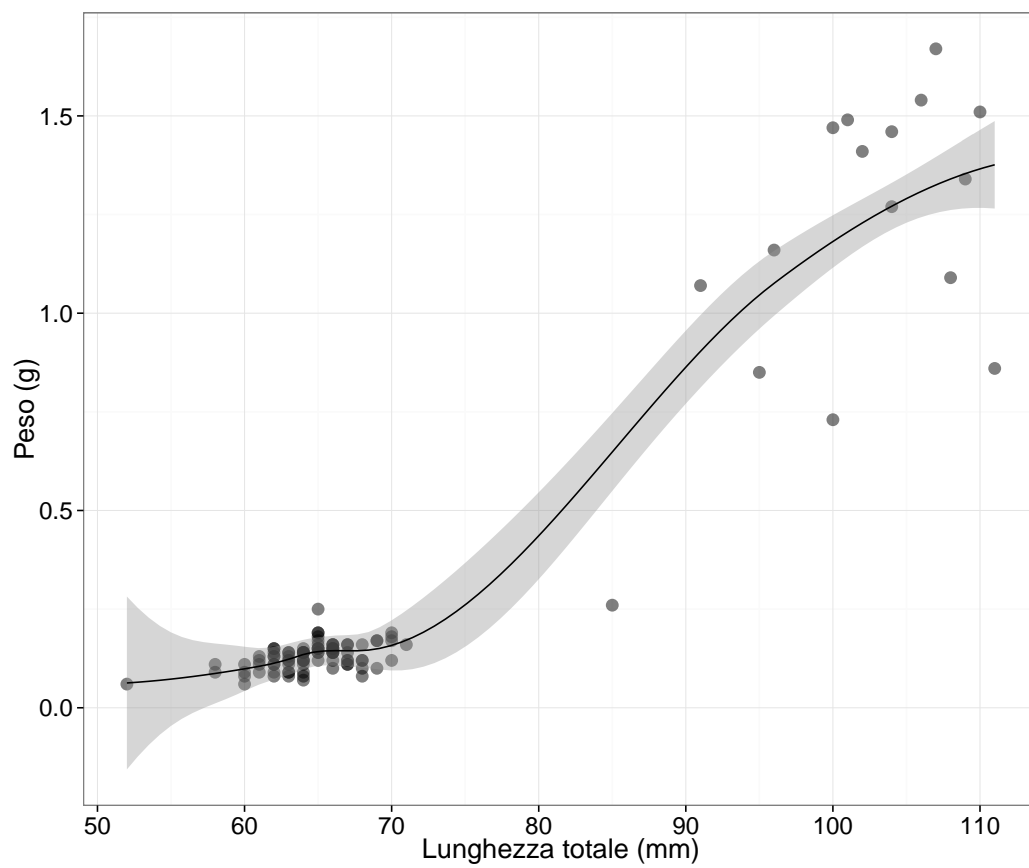


Figura 4.5: Relazione lunghezza peso di ceche e ragani

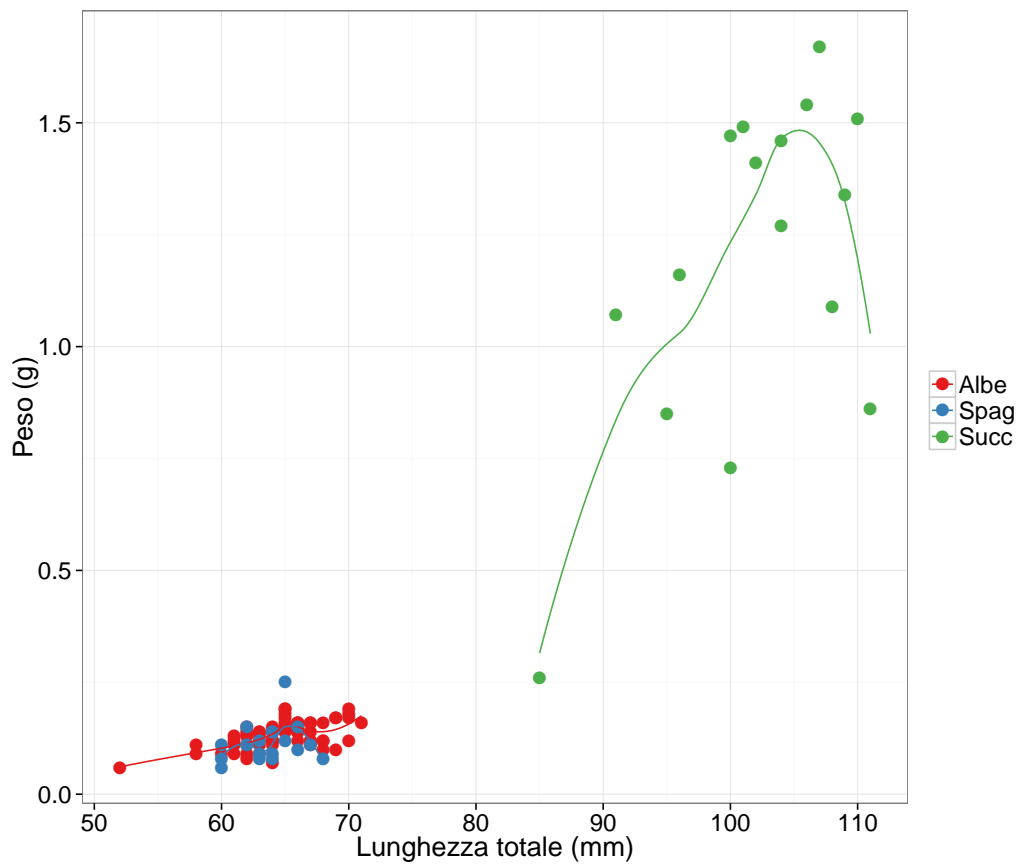


Figura 4.6: Relazione lunghezza peso di ceche e ragani separati per sito di campionamento

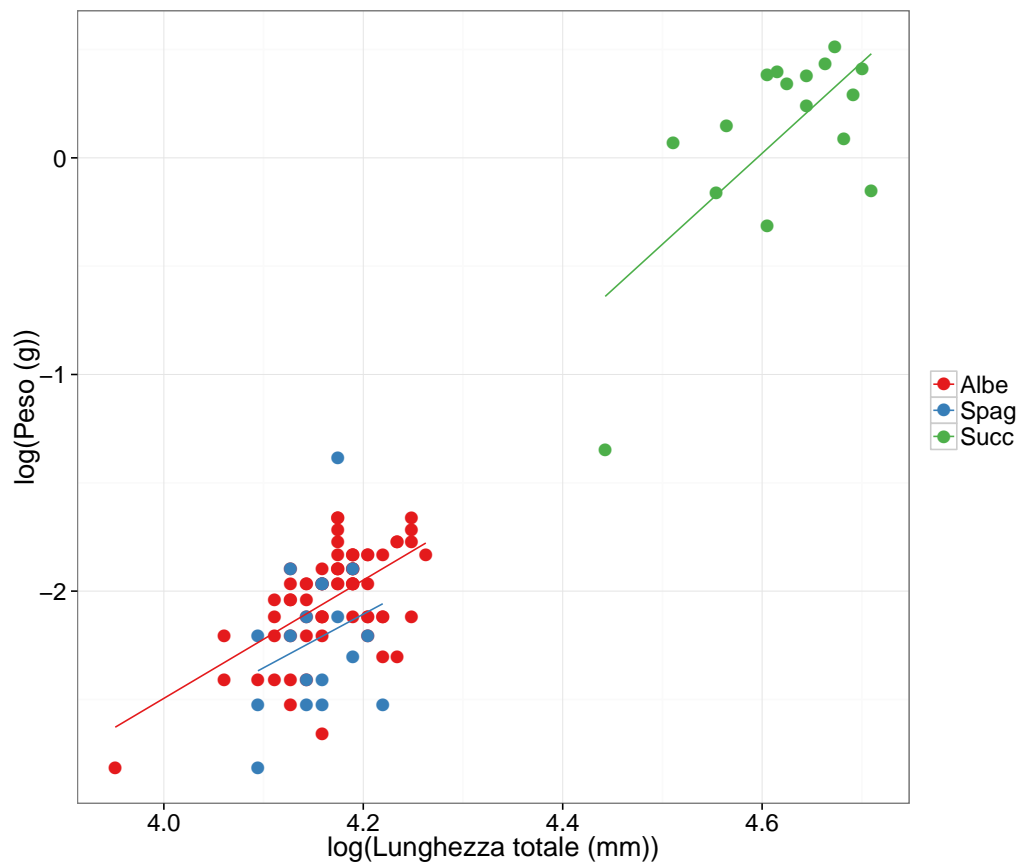


Figura 4.7: Relazione lunghezza peso di ceche e ragani separati per sito di campionamento linearizzata mediante applicazione del logaritmo alle variabili

Tabella 4.6: Coefficienti della regressione lineare lunghezza-peso: b - pendenza della retta di regressione, b_{inf} - limite inferiore al 95% di confidenza, b_{sup} - limite superiore al 95% di confidenza, R^2 - coefficiente di determinazione.

Siti	b	b_{inf}	b_{sup}	R^2
Bone	3.624	3.020	4.228	0.904
Chio	2.174	1.659	2.688	0.786
Coma	3.780	3.601	3.960	0.953
Fano	2.894	2.559	3.230	0.850
Nogh	3.592	3.167	4.018	0.952
Orbe	3.200	2.644	3.756	0.890
Succ	2.824	2.466	3.182	0.814
Totale	3.047	2.973	3.122	0.959

- possibilità di effettuare le operazioni manualmente o con macchine automatiche

La minima quantità di resina epossidica e di resina termoplastica rende le operazioni di lavorazione più veloci, specialmente la fase di levigatura, consentendo un notevole risparmio anche del materiale abrasivo e un minor accumulo di rifiuti. Inoltre l'esigua quantità di resina termoplastica consente il trasferimento dei campioni in modo rapido e con minimo riscaldamento che preserva l'integrità dei campioni. Nel caso delle indagini al laser la possibilità di trasferimento e montaggio multiplo su singolo mount ha consentito un abbattimento dei tempi d'analisi notevole con grande vantaggio economico. Le particolari resine utilizzate consentono la lavorazione sia a secco che ad umido, che nel caso particolare di questa attività di ricerca si è dimostrata più efficace e standardizzabile. Nonostante si sia preferito operare in modo manuale, per controllare più frequentemente la fasi di lavoro e la qualità ottenuta, l'intero processo può essere automatizzato mediante macchine levigatrici con portacampione predisposto per l'alloggiamento di vetrini biologici.

4.4 Etching

Dall'analisi al microscopio ottico appare evidente che la modalità di etching più adatta agli otoliti di anguilla è quella decalcificante a base di EDTA. L'HCl invece, anche se utilizzato a basse concentrazioni, nonostante i buoni risultati, è troppo aggressivo e agisce troppo velocemente rendendo difficile standardizzare le operazioni (figura 4.8 a fronte). Già al microscopio ottico i campioni sottoposti ad etching hanno confermato che la zona nucleare è più ricca in sostanza organica essendo erosa preferenzialmente da EDTA, zona scura, ma non da HCl, zona chiara (figura 4.9 nella pagina successiva).

4.5 Lettura età

La stima dell'età effettuata mediante analisi di scaglie ha evidenziato alcune criticità: nonostante sia un metodo poco invasivo (rispetto all'estrazione degli otoliti

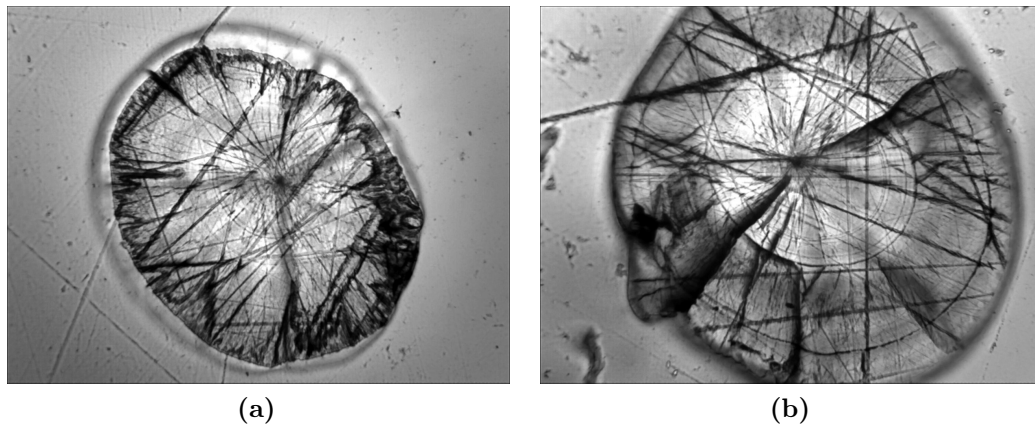


Figura 4.8: Esempio di campioni con etching da HCl: (a) – ceca di rimonta naturale, (b) – ceca d'importazione.

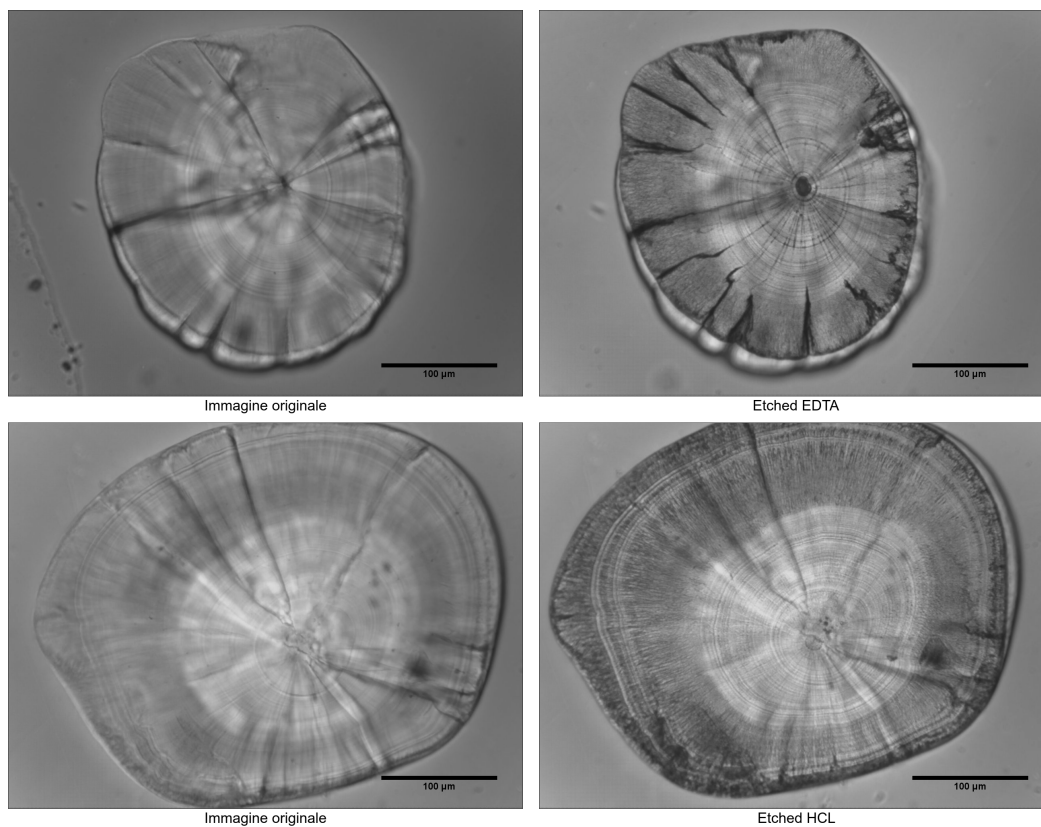


Figura 4.9: Immagini al microscopio ottico di otoliti di ceca sottoposti ad etching con EDTA (in alto a destra) e HCL (in basso a destra). Notare il diverso colore della zona nucleare.

che prevede il sacrificio degli esemplari) per poter trovare scaglie con il numero massimo di discontinuità e quindi non sottostimarne il valore si è reso necessario analizzarne almeno 20: questo a causa della presenza di scaglie rigenerate o con assenza di discontinuità (figura 4.10 a fronte). In figura 4.11 a pagina 60 si è messo in relazione il numero di scaglie della regione cefalica col valore massimo di letture sul totale analizzato per classe di età: si vede chiaramente che il valore è inversamente proporzionale all'età stimata. Il confronto tra le scaglie prelevate in diverse zone del corpo è stato possibile solo per i siti Chio, Fano, Orbe e Succi e non hanno mostrato differenze significative nella stima dell'età, in caso di stime differenti tra regioni del corpo si è preso il valore più alto (tabella 4.7). I dati della lettura degli otoliti sono mostrati in tabella 4.8. La lettura mediante scaglie sottostima sempre quella effettuata con otoliti di 2 – 3 anni. In base alla data di cattura e alla stima dell'età si è calcolata per differenza l'anno di nascita (o di provenienza) escludendo il periodo della migrazione ritenuto costante (tabella 4.9 a pagina 62). La relazione età – lunghezza totale è mostrata in figura 4.12 a pagina 61. Dal terzo anno di vita la variabilità in lunghezza a parità di età è molto alta e questa caratteristica rende molto difficile sapere a priori quali età campionare in base alla dimensione ed è il motivo principale per cui non è stato possibile effettuare un campionamento bilanciato per età e per taglia.

Tabella 4.7: Composizione per età degli esemplari campionati per sito: lettura di scaglie.

Età	Bone	Chio	Coma	Fano	Nogh	Orbe	Succ
0	0	0	0	0	0	5	8
1	0	0	0	9	0	15	51
2	0	0	0	17	0	0	0
3	0	0	28	19	3	0	0
4	13	7	36	8	4	0	0
5	5	16	25	1	10	0	0
6	1	0	0	1	1	0	0

Tabella 4.8: Composizione per età degli esemplari campionati per sito: lettura di otoliti.

Età	Bone	Chio	Coma	Fano	Nogh	Orbe	Succ
2	0	0	0	0	0	5	4
3	0	0	0	7	0	15	55
4	0	0	0	19	0	0	0
5	0	0	25	20	2	0	0
6	11	6	38	7	4	0	0
7	7	17	26	1	11	0	0
8	1	0	0	1	1	0	0

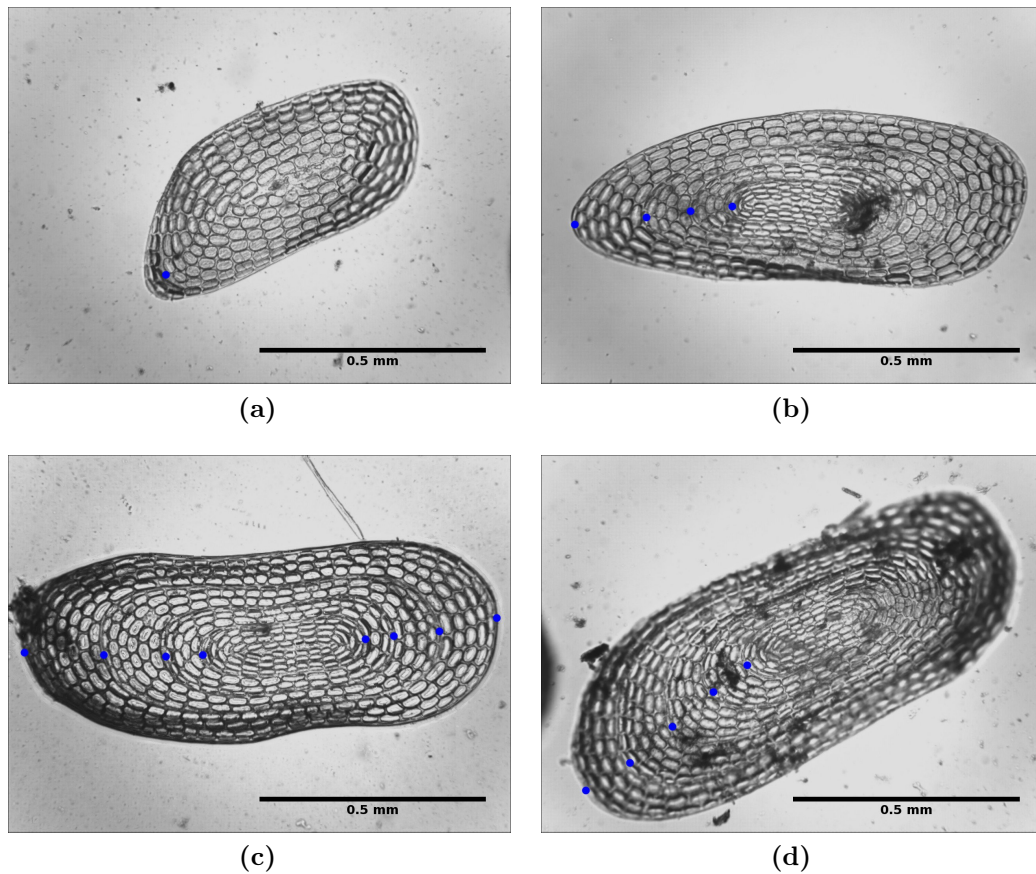


Figura 4.10: Esempio di scaglie osservate in uno stesso individuo: (a) una singola discontinuità, (b) e (c) 4 discontinuità ma con forma diversa, (d) 5 discontinuità (valore massimo per questo individuo).

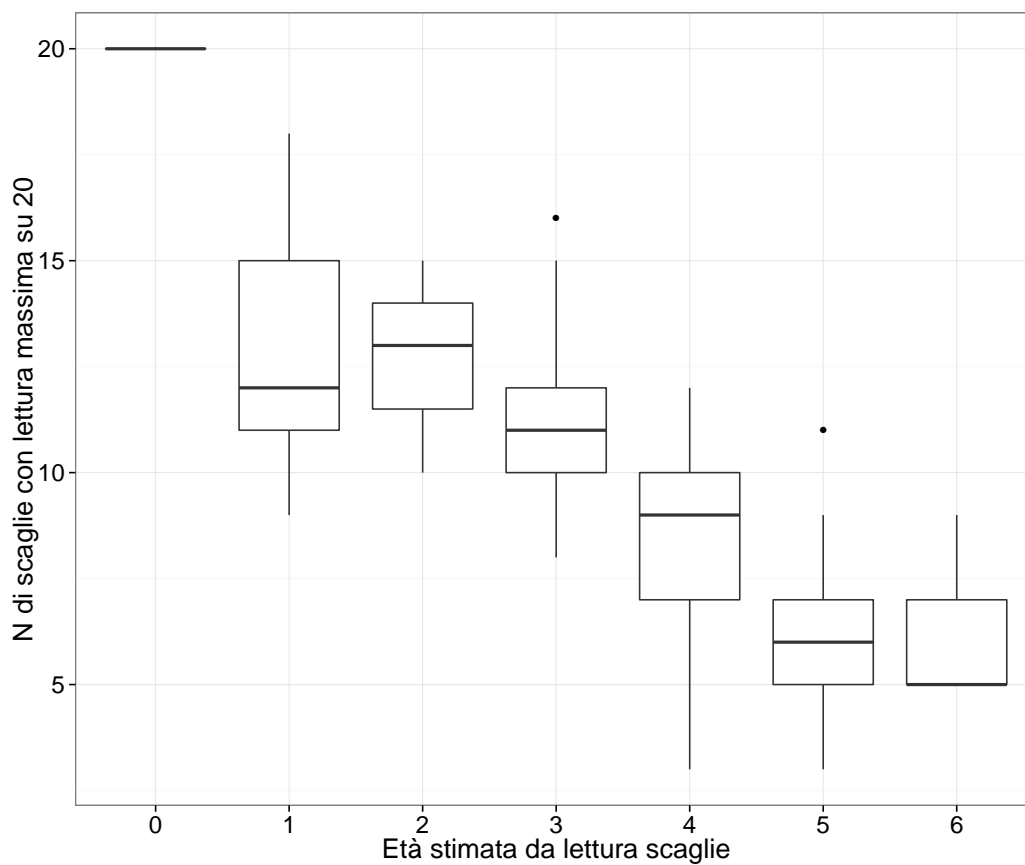


Figura 4.11: Distribuzione del numero di scaglie con lettura massima sul totale di quelle lette.

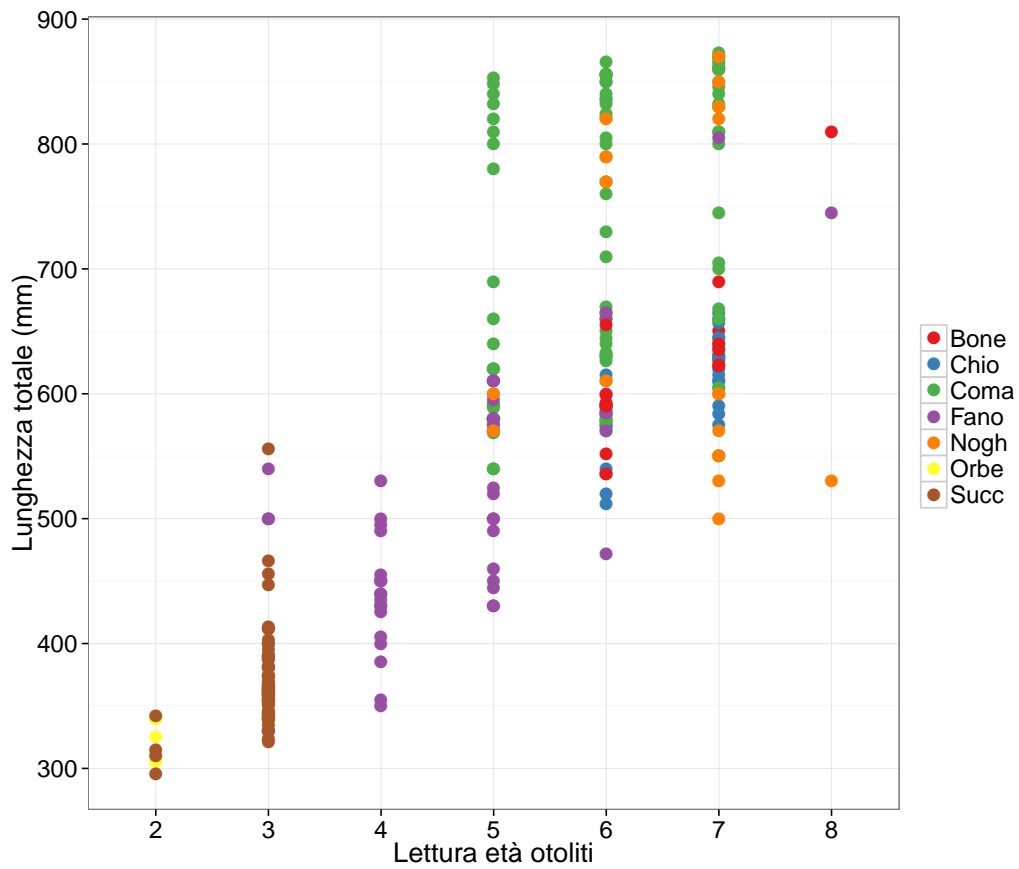


Figura 4.12: Relazione età lunghezza totale degli individui.

Tabella 4.9: Stima dell'anno di nascita: calcolato mediante differenza tra la data di cattura e la lettura dell'età con otoliti. Il tempo di migrazione è stato omesso e considerato costante.

Anno nascita	Bone	Chio	Coma	Fano	Nogh	Orbe	Succ
1995	0	0	0	0	1	0	0
1996	1	0	0	1	0	0	0
1997	0	0	2	0	8	0	0
1998	7	0	8	0	3	0	0
1999	0	0	19	0	4	0	0
2000	11	17	12	1	0	0	0
2001	0	0	25	1	1	0	0
2002	0	6	12	3	1	0	0
2003	0	0	11	7	0	0	0
2004	0	0	0	4	0	0	0
2005	0	0	0	14	0	0	0
2006	0	0	0	2	0	0	7
2007	0	0	0	20	0	15	48
2009	0	0	0	2	0	5	4

4.6 SEM

Le indagini al SEM hanno confermato quanto visto al microscopio ottico. Si nota inoltre un successione di discontinuità riconducibili a particolari fasi di crescita (figura 4.13 nella pagina seguente):

- zona nucleare
- FFC "first feeding check" (fine del riassorbimento del sacco vitellino e inizio dell'alimentazione attiva)
- zona di accrescimenti giornalieri
- zona diffusa senza anelli giornalieri
- ingresso in acque dolci

Il diametro medio del nucleo fino alla discontinuità del FFC è di $21.7 \mu\text{m}$ con un range di $18.2 - 26.8 \mu\text{m}$ e una deviazione standard di $2.9 \mu\text{m}$. La zona con evidenti incrementi giornalieri è pari a $224.7 \mu\text{m}$ di diametro con un range di $177.8 - 343.6 \mu\text{m}$ e una deviazione standard di $48.9 \mu\text{m}$. La zona diffusa ha uno spessore medio di $80.2 \mu\text{m}$, un range di $42.6 - 146.9 \mu\text{m}$ e una deviazione standard di $28.4 \mu\text{m}$. La discontinuità dovuta all'ingresso in acque dolci e fredde si trova ad un diametro medio di $367.9 \mu\text{m}$, ha un range di $287.8 - 500.9 \mu\text{m}$ e una deviazione standard di $69.8 \mu\text{m}$. Purtroppo la forma ellittica di queste discontinuità e l'impossibilità di montare e lavorare gli otoliti perfettamente sullo stesso piano rende inutile confrontare statisticamente questi valori tra campioni provenienti da siti diversi (figura 4.13 nella pagina successiva). La lettura degli incrementi giornalieri non è stata sempre possibile lungo la stessa direttrice per cui quando necessario si sono sommati i conteggi delle letture effettuate lungo direttrici diverse (figura 4.14 a pagina 65).

Il numero di incrementi giornalieri rilevabili è in media di 212 con un range di $167 - 325$ e una deviazione standard di 56. Non ci sono differenze significative tra il numero di conteggi giornalieri nei due siti di campionamento (Albe e Spag). Lo spessore medio dei singoli incrementi giornalieri è in media di $0.53 \mu\text{m}$ con un range di $0.45 - 0.58 \mu\text{m}$ e una deviazione standard di $0.042 \mu\text{m}$.

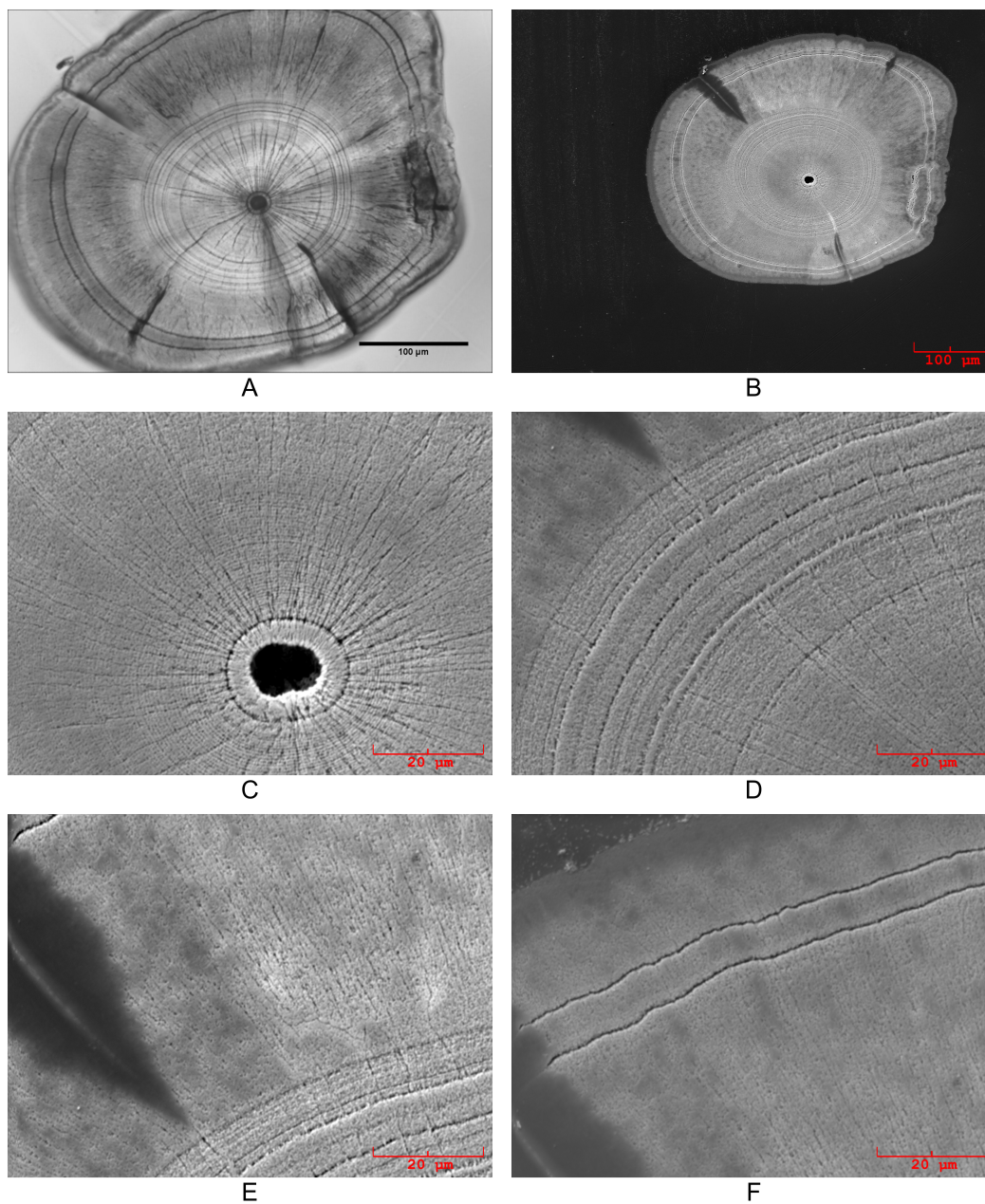


Figura 4.13: Immagini di otoliti di ceca di importazione spagnola sottoposti ad etching con EDTA: A - immagine al microscopio ottico, B - panoramica al SEM, C - dettaglio al SEM della regione nucleare: notare la zona scura ricca in proteine, l'evidente discontinuità corrispondente al FFC ("first feeding check") e gli incrementi giornalieri regolari, D - zona esterna al nucleo con evidenti discontinuità di accrescimento giornalieri, E - zona diffusa senza anelli di accrescimento, F - discontinuità dovute all'ingresso in acque a salinità e temperatura diversa (normalmente più dolci e fredde).

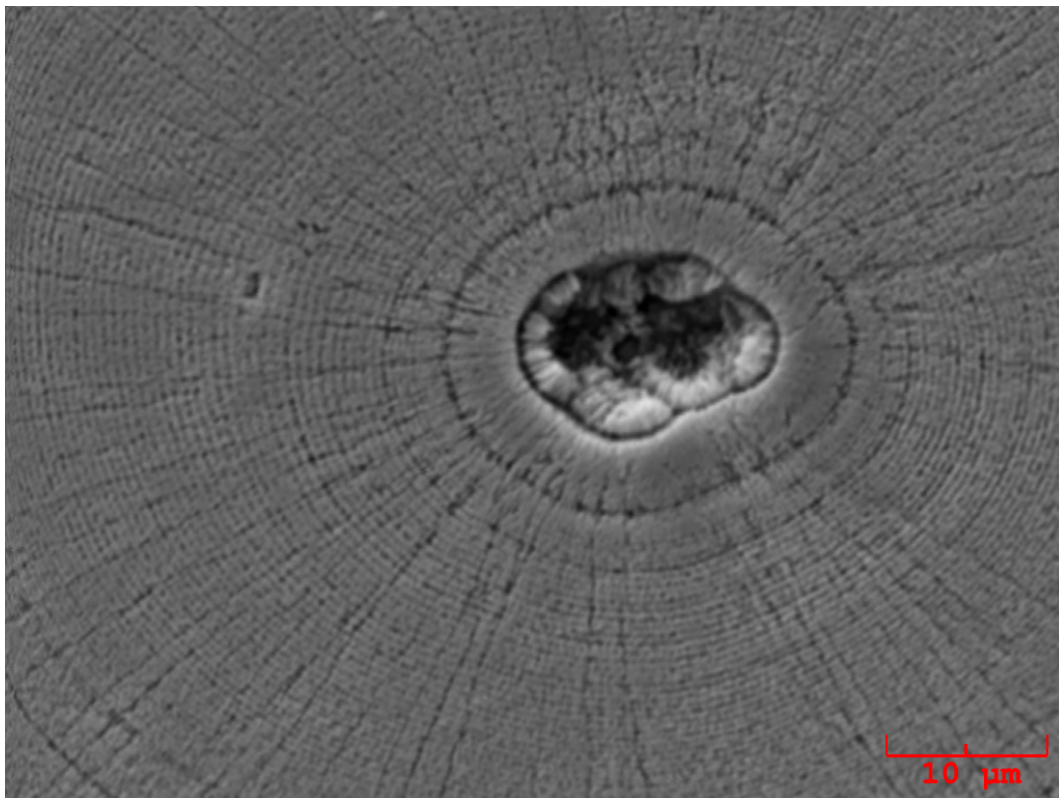


Figura 4.14: Immagine al SEM della regione nucleare di otolite di ceca con evidenti discontinuità giornaliere.

4.7 LA-ICP-MS

I risultati ottenuti dalle analisi chimiche sugli otoliti sono riassunti in figura [4.15 nella pagina successiva](#). Dei 25 elementi ricercati solo 10 sono risultati al di sopra del livello minimo di confidenza del rilevatore e sono ${}^7\text{Li}$, ${}^{11}\text{B}$, ${}^{23}\text{Na}$, ${}^{25}\text{Mg}$, ${}^{55}\text{Mn}$, ${}^{59}\text{Co}$, ${}^{63}\text{Cu}$, ${}^{88}\text{Sr}$, ${}^{138}\text{Ba}$, ${}^{208}\text{Pb}$. Le concentrazioni elementari degli spot $b - c - d$ corrispondenti alla zona perinucleare mostrano valori simili (figura [4.16 a pagina 68](#)) e non essendoci differenze significative sono stati mediati ed espressi come unico valore nelle elaborazioni successive indicandolo con la lettera m . L'elemento più abbondante è il ${}^7\text{Li}$ seguito da ${}^{23}\text{Na}$ e ${}^{88}\text{Sr}$, mentre quello meno abbondante è il ${}^{59}\text{Co}$.

In figura [4.17 a pagina 68](#) è mostrato l'ordinamento mediante analisi delle componenti principali (PCA) dello spot a (zona nucleare) e della media degli spot $b - c - d$ (m). È evidente che ci sono solo piccole differenze fra le due zone per cui si può ipotizzare che la massa d'acqua in cui sono cresciuti gli individui fino a quel punto è la stessa o ha le stesse caratteristiche chimiche.

Nella figura [4.18 a pagina 69](#) sono stati aggiunti i dati relativi ai profili effettuati dalla zona nucleare al bordo dell'otolite per verificare le caratteristiche dell'ambiente di vita durante l'ontogenesi. Possiamo notare come le caratteristiche dell'ambiente di crescita siano variate nel corso della crescita. I valori degli spot a , m , $p1$ corrispondono alla fase "oceanica" o "migratoria", caratterizzata da abbondanza di ${}^{88}\text{Sr}$ e quindi acque molto salate, lo spot $p2$ corrisponde alla fase di "transizione" e "metamorfosi" (ceca-ragano) caratterizzata dai valori più bassi di ${}^{88}\text{Sr}$ e più alti di ${}^{138}\text{Ba}$ caratteristici di acque dolci, mentre gli spot successivi raggruppati in p corrispondono alla fase "continentale" caratterizzata da valori intermedi di ${}^{88}\text{Sr}$ e di ${}^{138}\text{Ba}$ sinonimo di acque salmastre (figura [4.19 a pagina 70](#)).

Nella figura [4.20](#) si può vedere il dettaglio dell'analisi PCA un ristretto numero di campioni tutti nati presumibilmente nel 2010 (età stimata mediante lettura degli otoliti e ipotizzando lo stesso tempo di migrazione) che evidenzia una forte dicotomia fra i campioni di Albe rispetto a Orbe e Succ. Lo stesso pattern è evidenziato in figura [4.21 a pagina 71](#).

I profili delle concentrazioni dei singoli elementi mostrano particolari pattern. Quello relativo al ${}^7\text{Li}$ mostra valori altalenanti con un valore medio attorno a 200 che si protrae per tutto il corso della vita in tutti i siti e non sembra essere discriminante (figura [4.22 a pagina 72](#)). Il ${}^{11}\text{B}$ da valori piuttosto alti in media tende a decrescere durante l'accrescimento e mostra valori più bassi nei siti di Nogh rispetto agli altri (figura [4.23 a pagina 73](#)). Il ${}^{23}\text{Na}$ e il ${}^{25}\text{Mg}$ hanno un andamento costante a parte i siti di Bone (per ${}^{23}\text{Na}$ e ${}^{25}\text{Mg}$) e Nogh (per ${}^{23}\text{Na}$) che partono da valori più alti (figura [4.24 a pagina 73](#) e [4.25](#)). Il ${}^{55}\text{Mn}$ mostra dei caratteristici picchi di abbondanza nella fase intermedia di crescita nei siti di Bone, Chio, Nogh e valori bassi e costanti in uno degli esemplari del sito di Fano (figura [4.26 a pagina 74](#)). Il ${}^{59}\text{Co}$ non mostra particolari andamenti e non sembra discriminante durante la crescita degli individui: i valori nulli nella zona nucleare dei siti di Coma e Fano sono probabilmente dovuti alle basse concentrazioni di ${}^{59}\text{Co}$ vicine al limite di rilevabilità (figura [4.27 a pagina 75](#)). Il ${}^{63}\text{Cu}$ mostra un trend negativo nei siti di Fano, positivo in quello di Chio e costante negli altri (figura [4.28 a pagina 75](#)). Lo ${}^{88}\text{Sr}$ mostra un trend negativo durante la crescita in

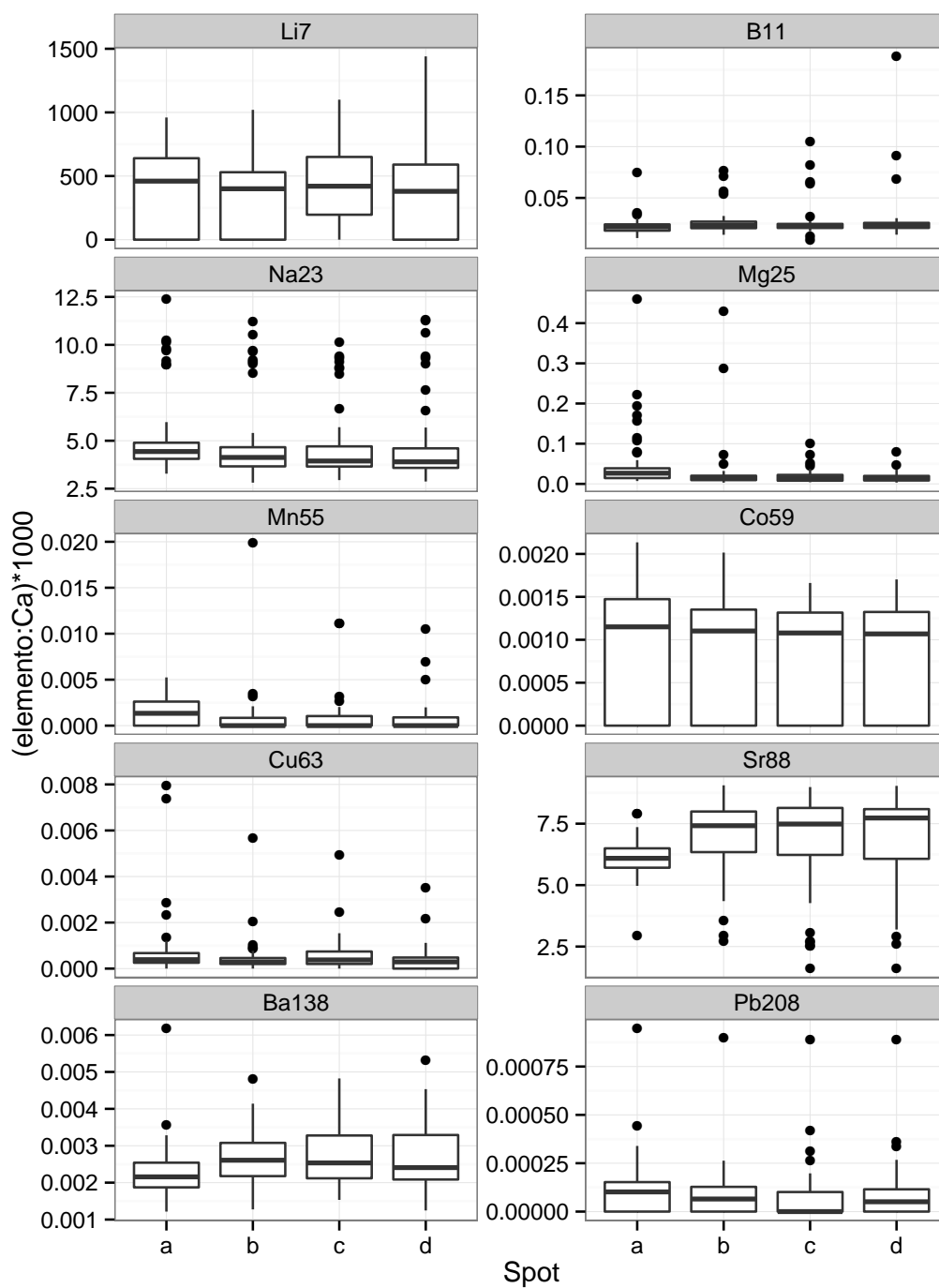


Figura 4.15: Boxplot della distribuzione delle concentrazioni degli elementi in tracce ottenuti dall'analisi chimica degli otoliti raggruppati per spot: *a* - zona nucleare, *b* - *c* - *d* zona perinucleare.

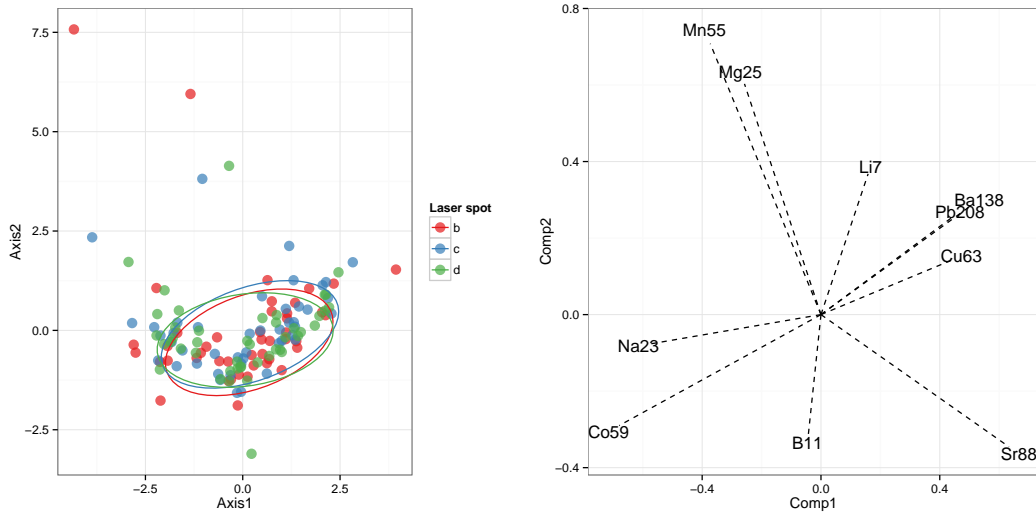


Figura 4.16: Ordinamento PCA delle concentrazioni elementari degli spot $b - c - d$ (zona perinucleare).

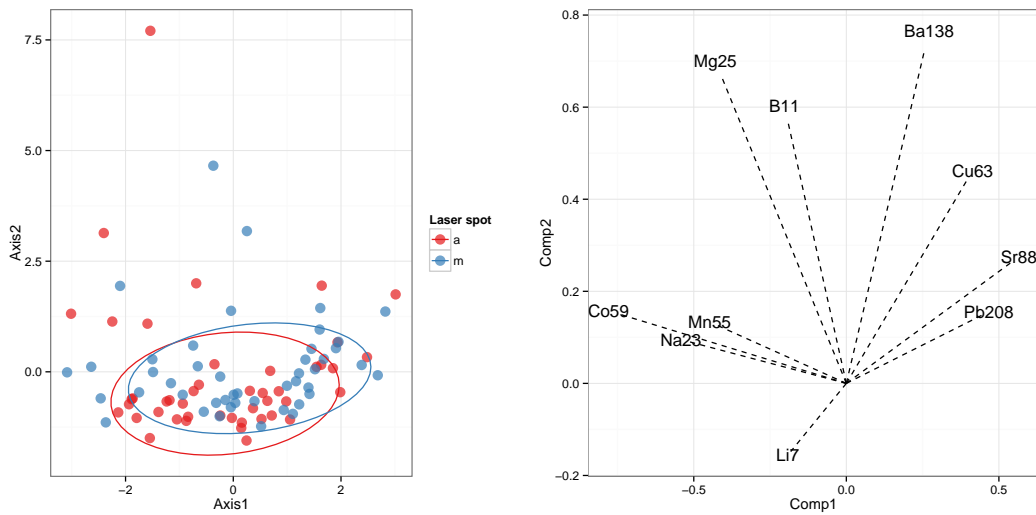


Figura 4.17: Ordinamento PCA delle concentrazioni elementari dello spot a (zona nucleare) e m (media degli spot perinucleari $b - c - d$).

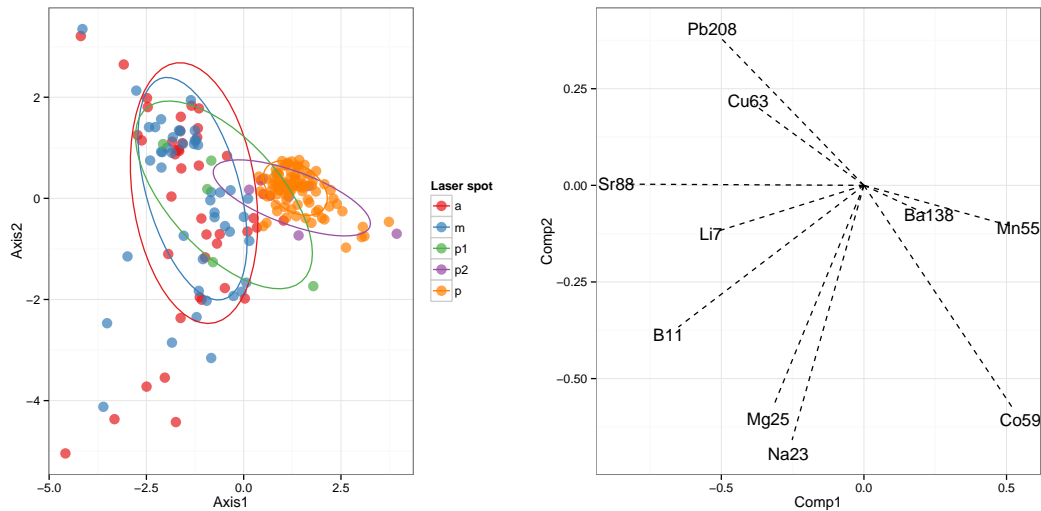


Figura 4.18: Ordinamento PCA delle concentrazioni elementari dello spot *a* (zona nucleare), *m* (media degli spot perinucleari *b* – *c* – *d*), *p1* (fine della fase migratoria), *p2* (metamorfosi ceca-ragano), *p* (zona continentale).

tutti i siti a testimonianza della provenienza degli individui da acque di salinità elevate ("marine") ed un accrescimento in acque salmastre o dolci: nei siti di Bone e Nogh i valori nelle ultime fasi di crescita (corrispondenti al periodo di cattura) sono al limite tra acque salmastre e salate a riprova delle caratteristiche ambientali del luogo di campionamento (figura 4.29 a pagina 76). Il ^{138}Ba mostra dei picchi di abbondanza caratteristici nelle primissime fasi di vita (metamorfosi ceca-ragano) corrispondenti alla diminuzione di ^{88}Sr e sinonimo di acque dolci: fanno eccezione i siti di Chio e Nogh che mostrano andamenti regolari (figura 4.30 a pagina 76). Il rapporto $^{88}\text{Sr}/^{138}\text{Ba}$ mostra un caratteristico andamento positivo con la crescita a parte i siti di Coma e uno di quelli Fano (figura 4.32 a pagina 77). Il ^{208}Pb mostra una chiara dicotomia: nei siti Bone, Chio e Nogh ha valori bassi rispetto a quelli di Coma e Fano, in particolare questi presentano anche un picco di abbondanza nelle primissime fasi di crescita (figura 4.31 a pagina 77).

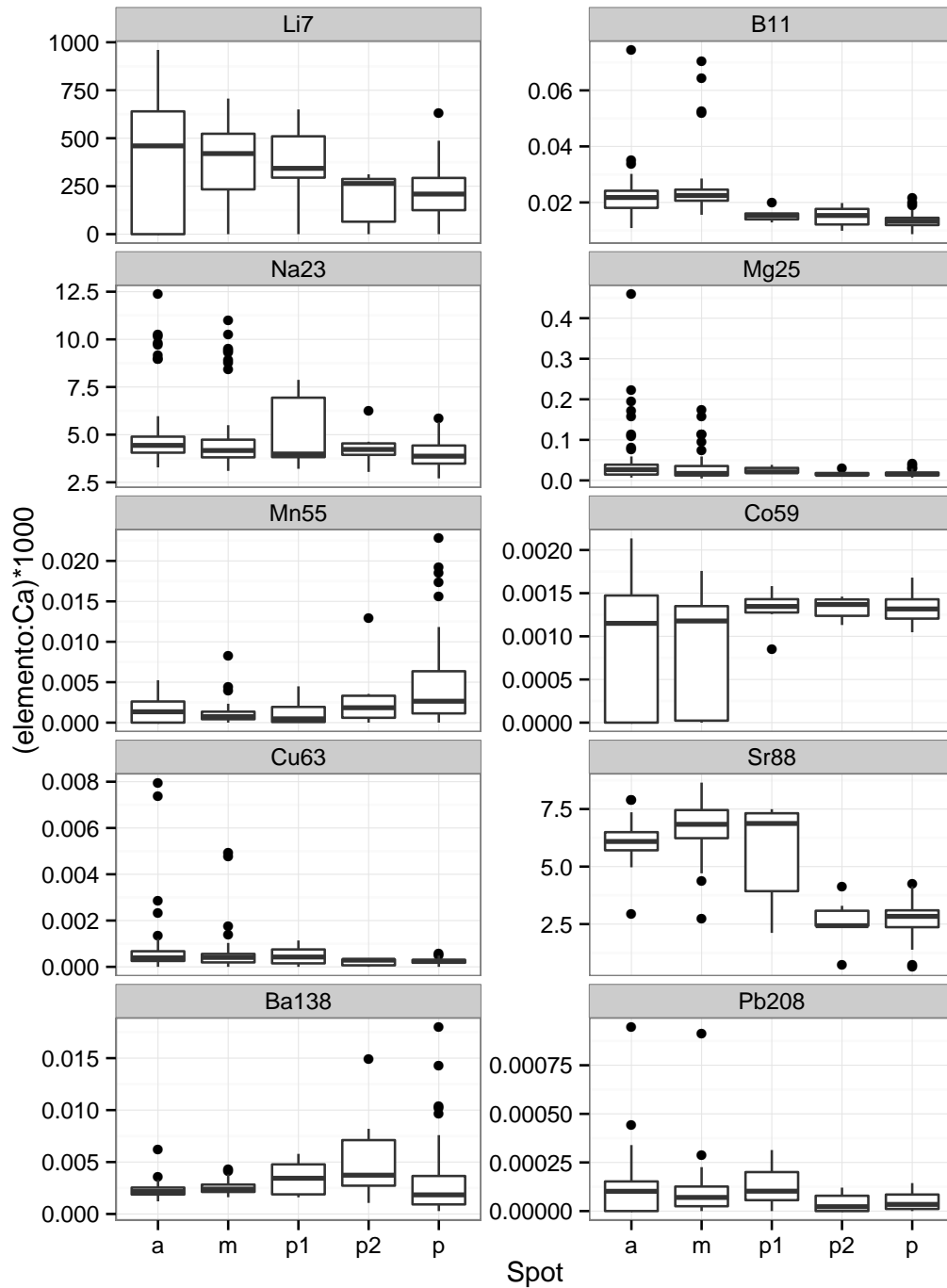


Figura 4.19: Boxplot della distribuzione delle concentrazioni degli elementi in tracce ottenuti dall'analisi chimica degli otoliti raggruppati per spot: *a* - zona nucleare, *m* zona perinucleare (media di *b* - *c* - *d*), *p1* limite della zona "oceanica" o "migratoria", *p2* zona della "metamorfosi" ceca-ragano, *p* zona continentale.

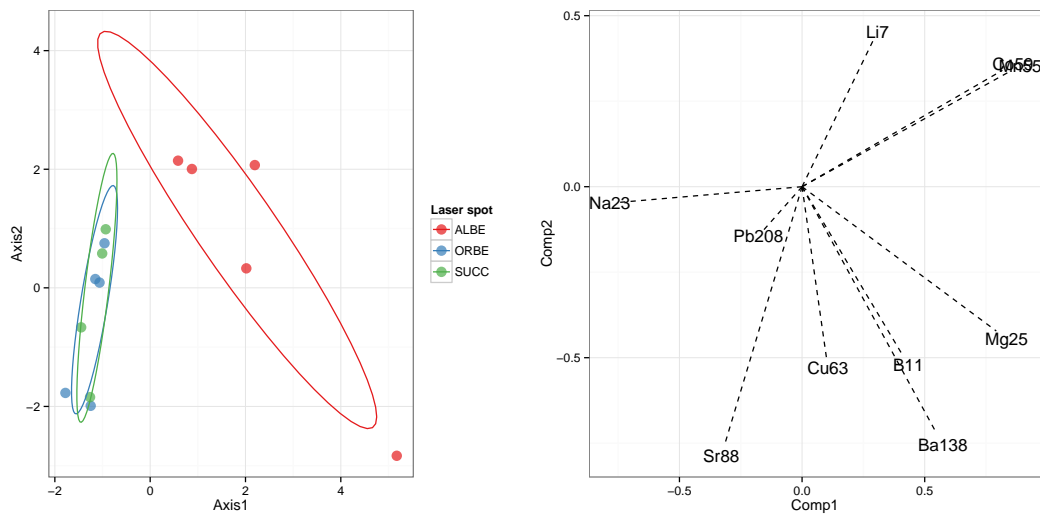


Figura 4.20: Ordinamento PCA delle concentrazioni elementari dello spot *a* (zona nucleare), nei campioni di otoliti di individui nati nel 2010.

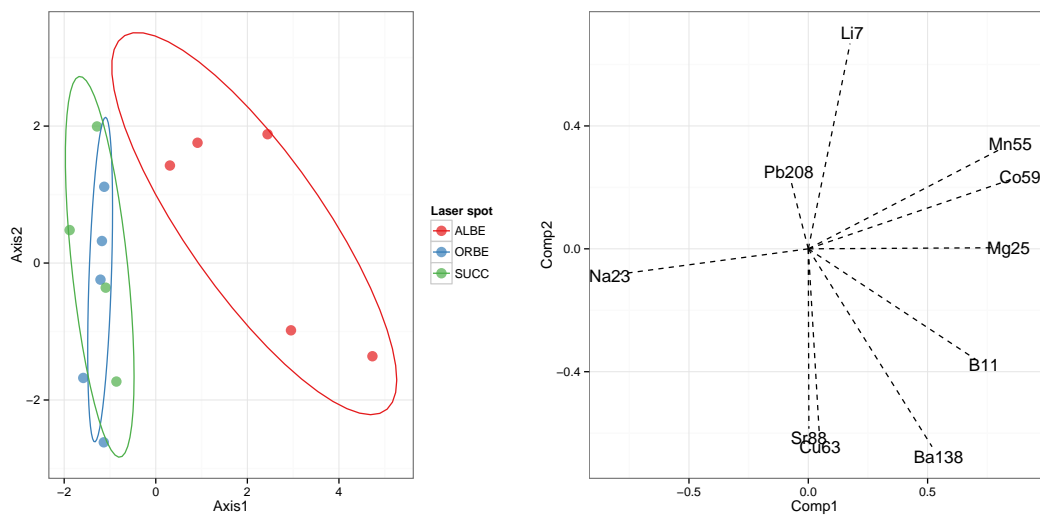


Figura 4.21: Ordinamento PCA delle concentrazioni elementari dello spot *m* (zona perinucleare), nei campioni di otoliti di individui nati nel 2010.

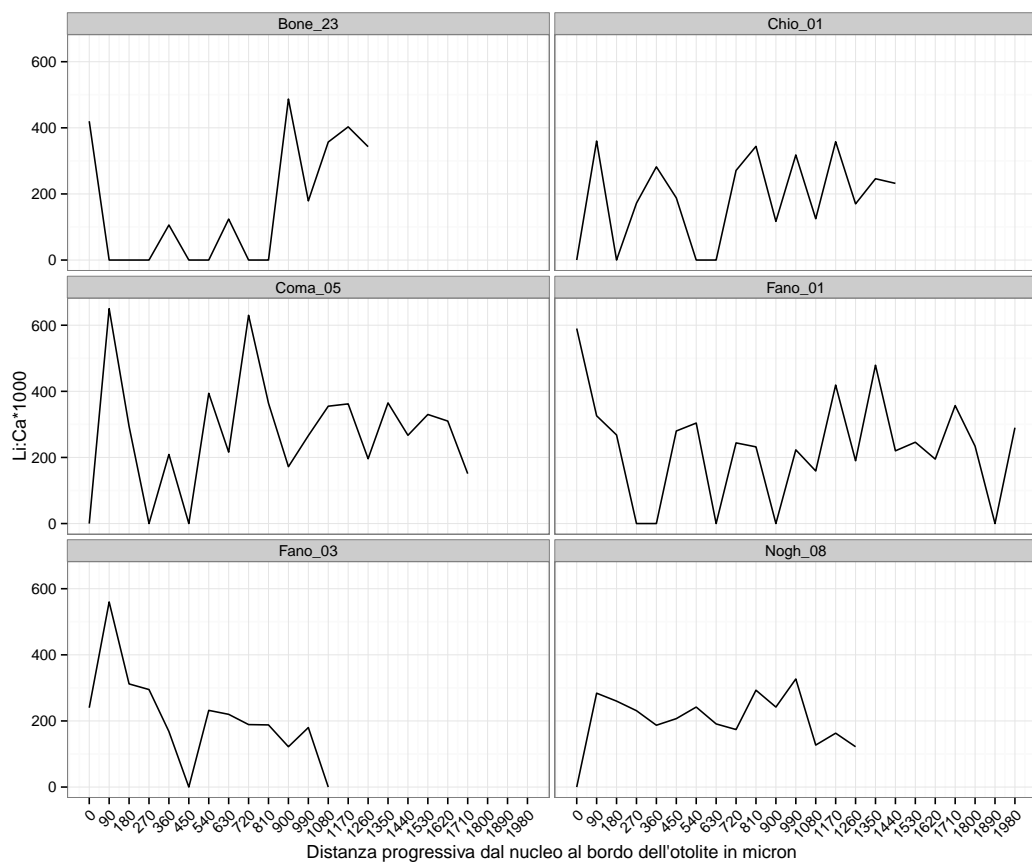


Figura 4.22: Profili di concentrazione di ${}^7\text{Li}$ lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)

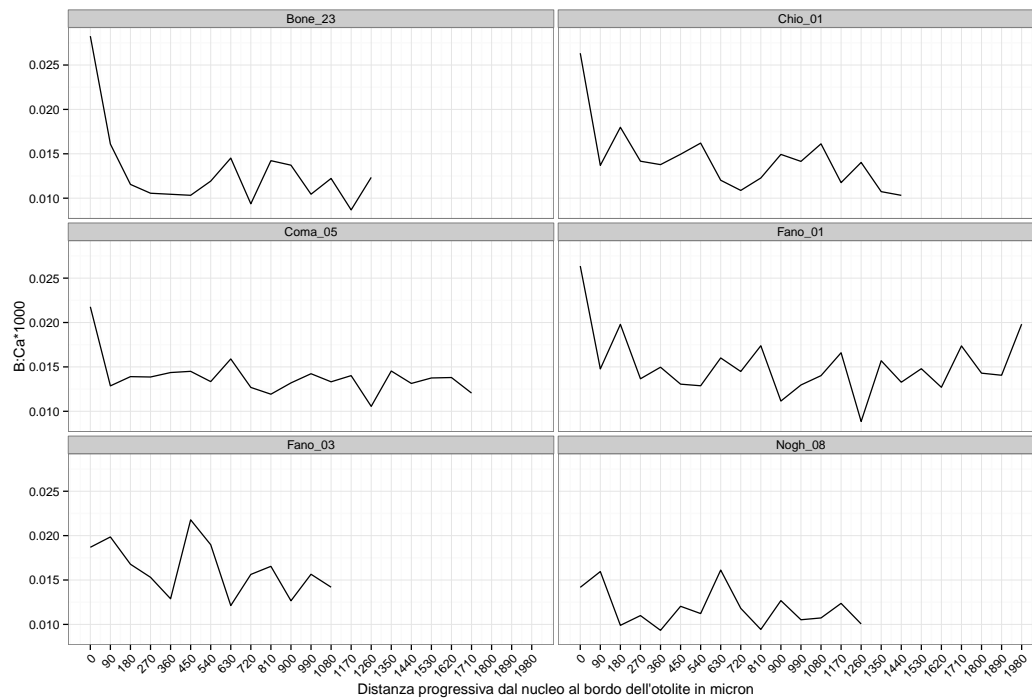


Figura 4.23: Profili di concentrazione di ^{11}B lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)

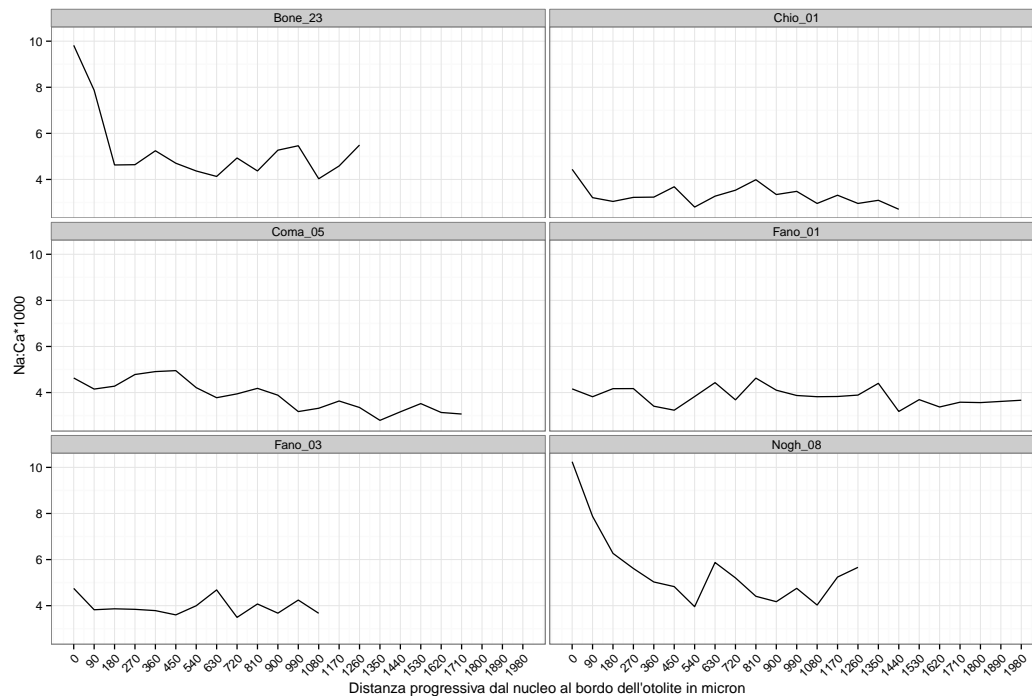


Figura 4.24: Profili di concentrazione di ^{23}Na lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)

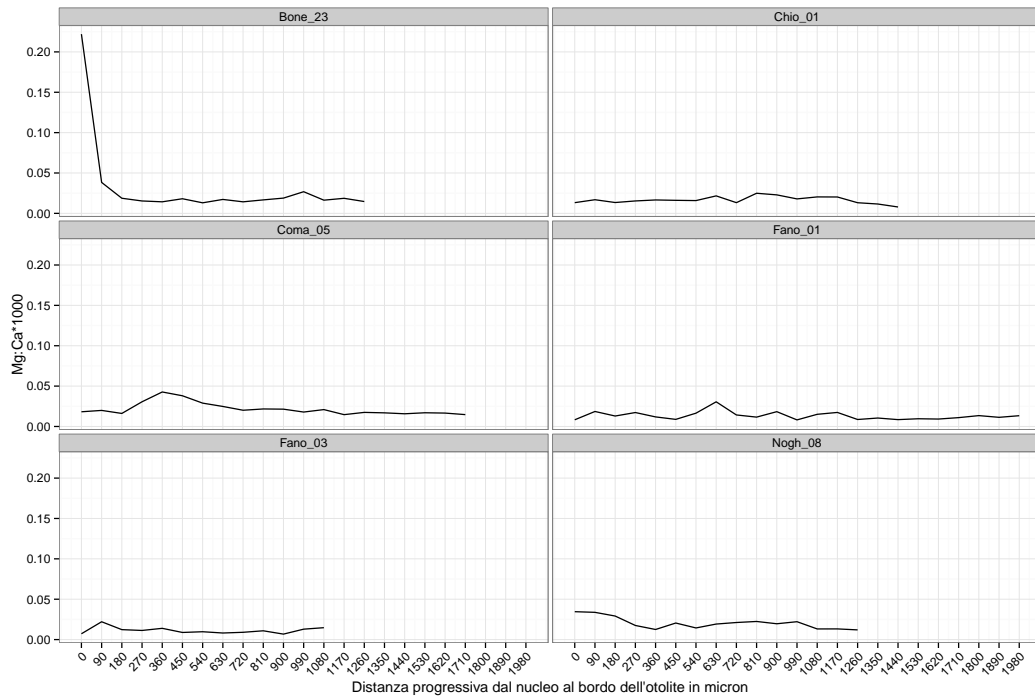


Figura 4.25: Profili di concentrazione di ^{25}Mg lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)

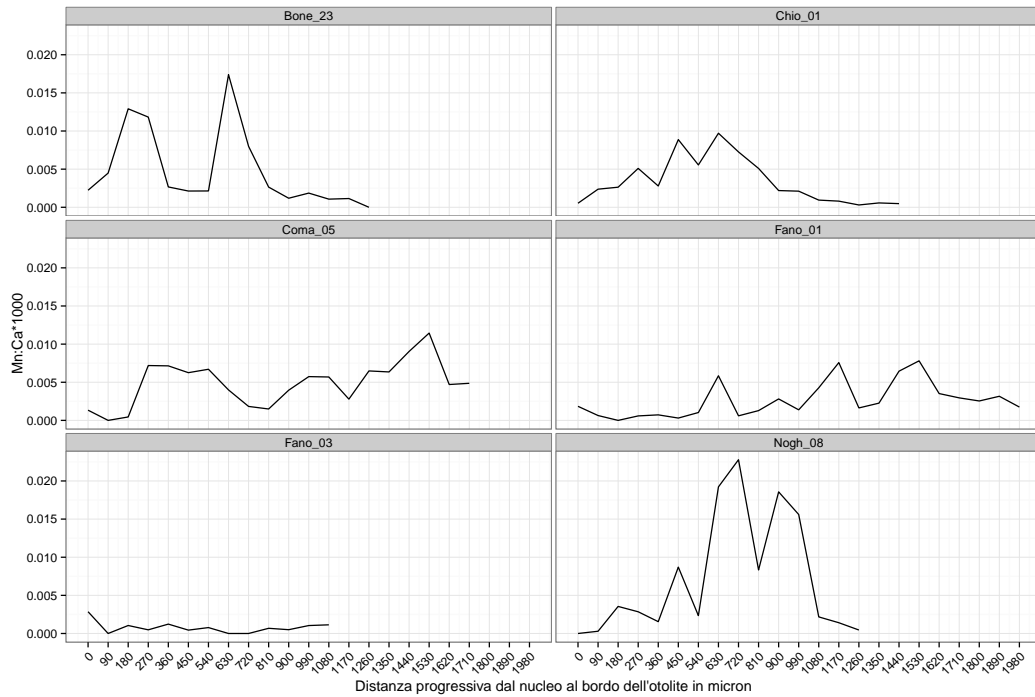


Figura 4.26: Profili di concentrazione di ^{55}Mn lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)

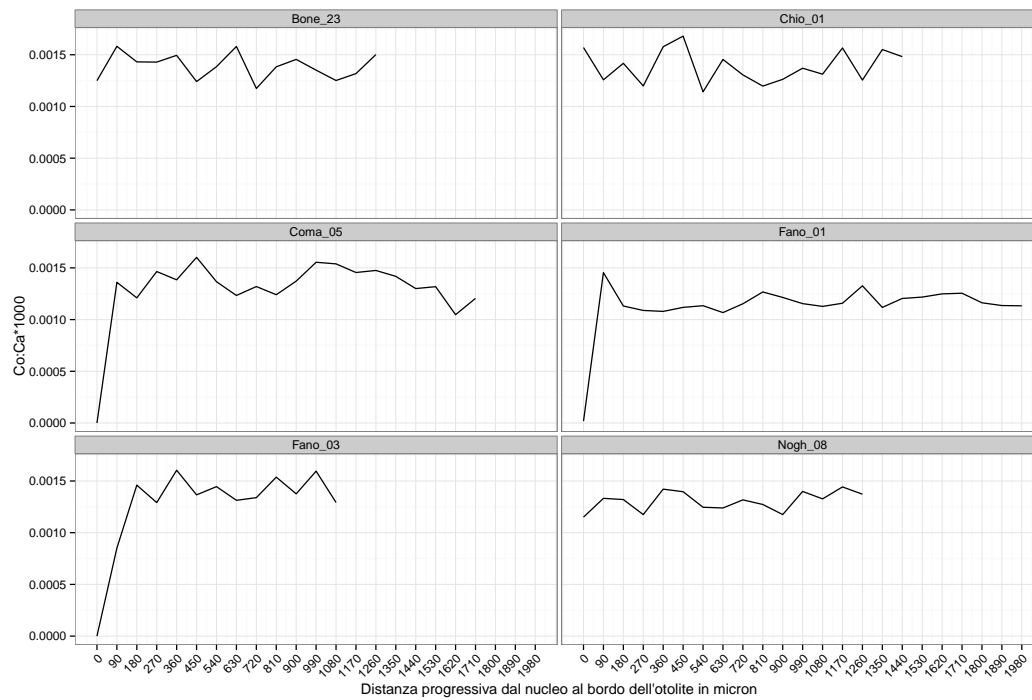


Figura 4.27: Profili di concentrazione di ^{59}Co lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)

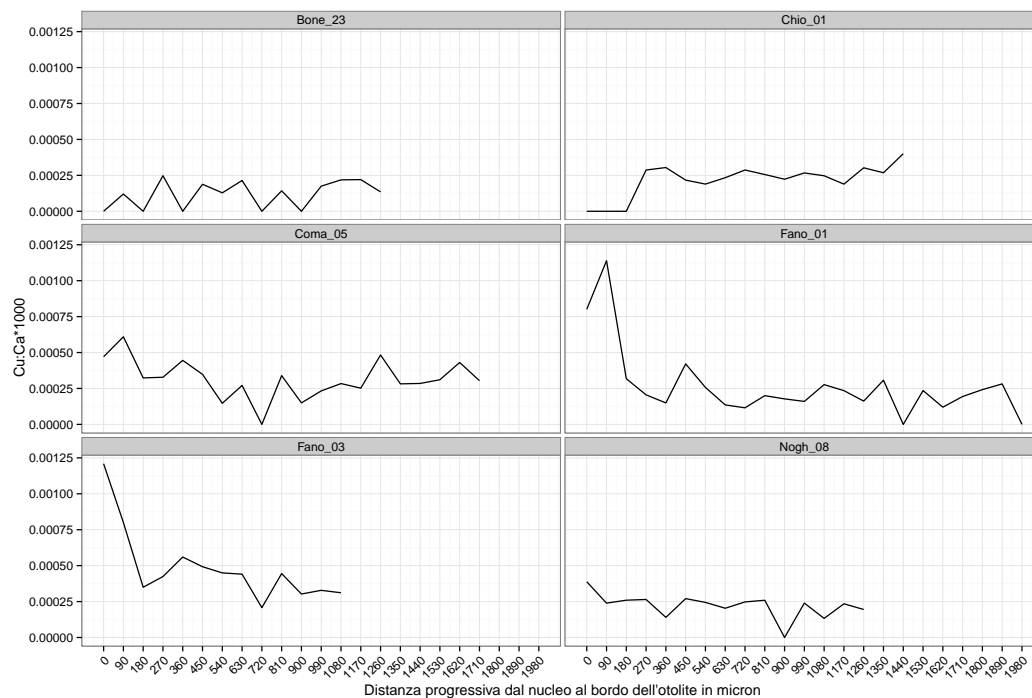


Figura 4.28: Profili di concentrazione di ^{63}Cu lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)

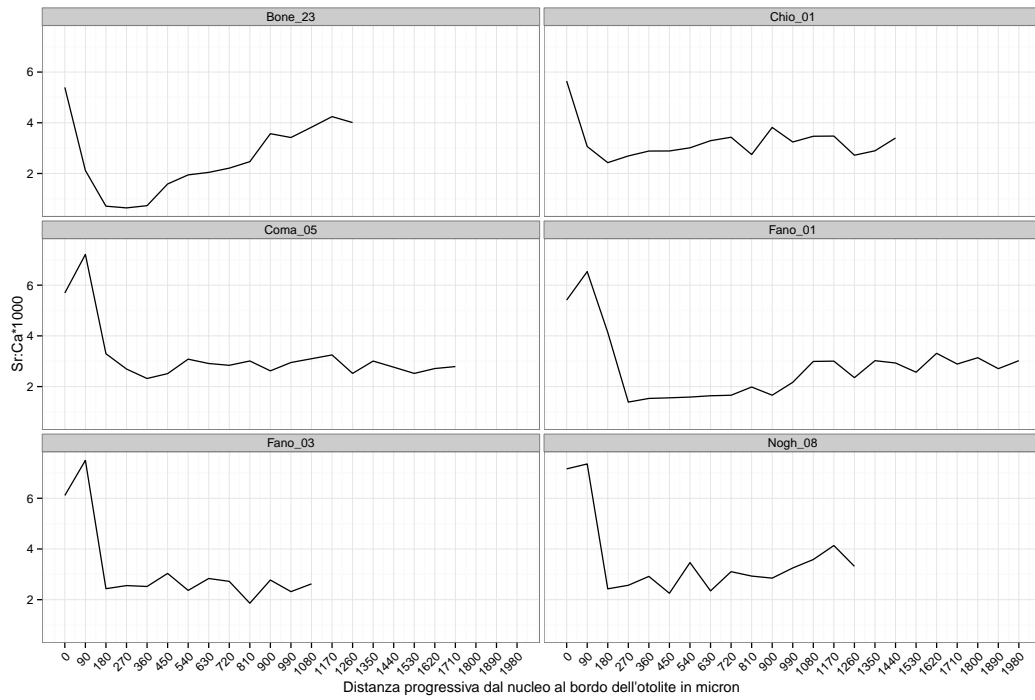


Figura 4.29: Profili di concentrazione di ^{88}Sr lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)

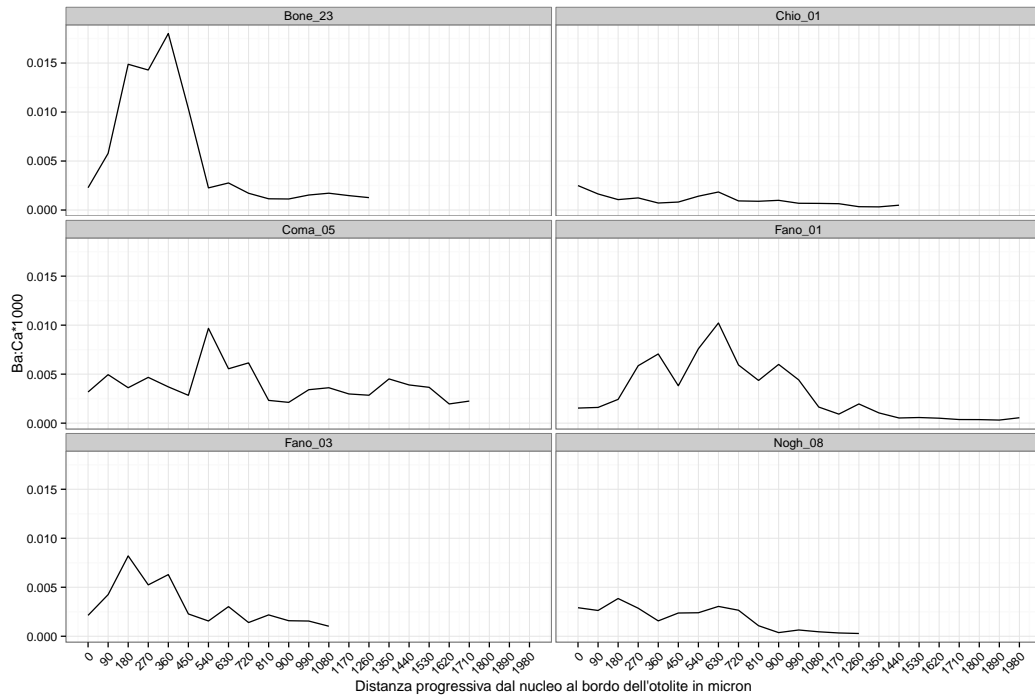


Figura 4.30: Profili di concentrazione di ^{138}Ba lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)

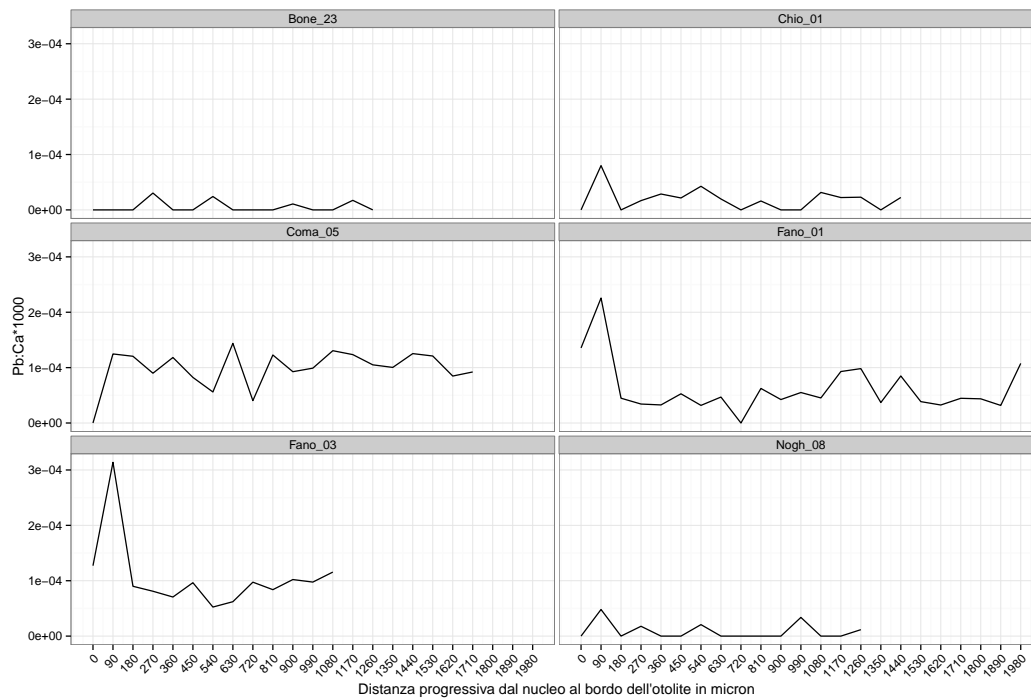


Figura 4.31: Profili di concentrazione di ^{208}Pb lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)

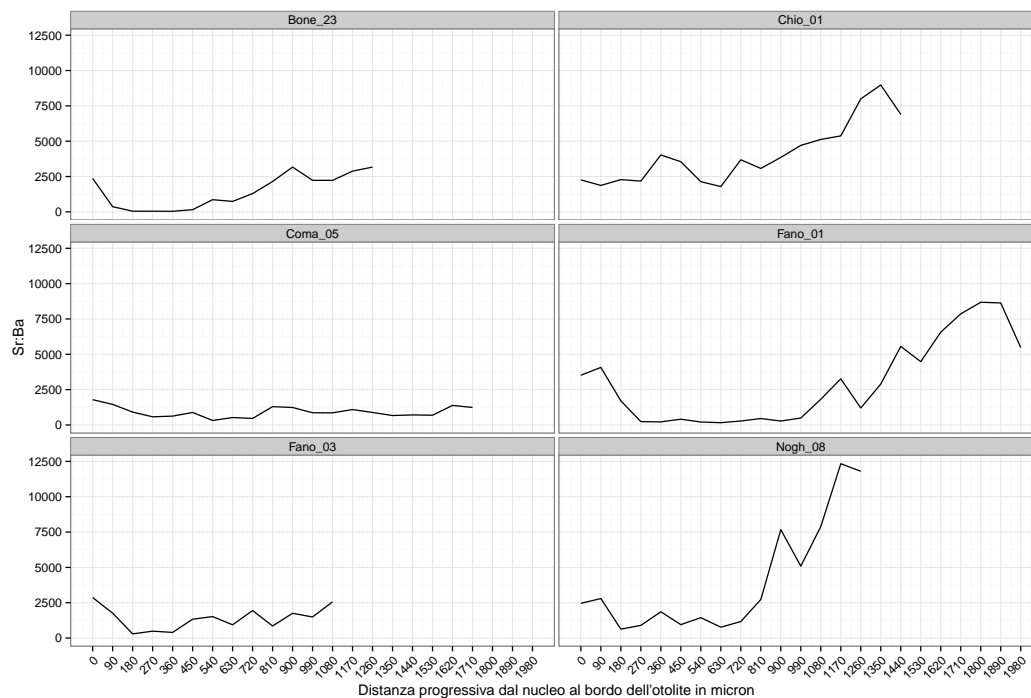


Figura 4.32: Profili di concentrazione di Sr/Ba lungo transetto nucleo – bordo (nascita – cattura)

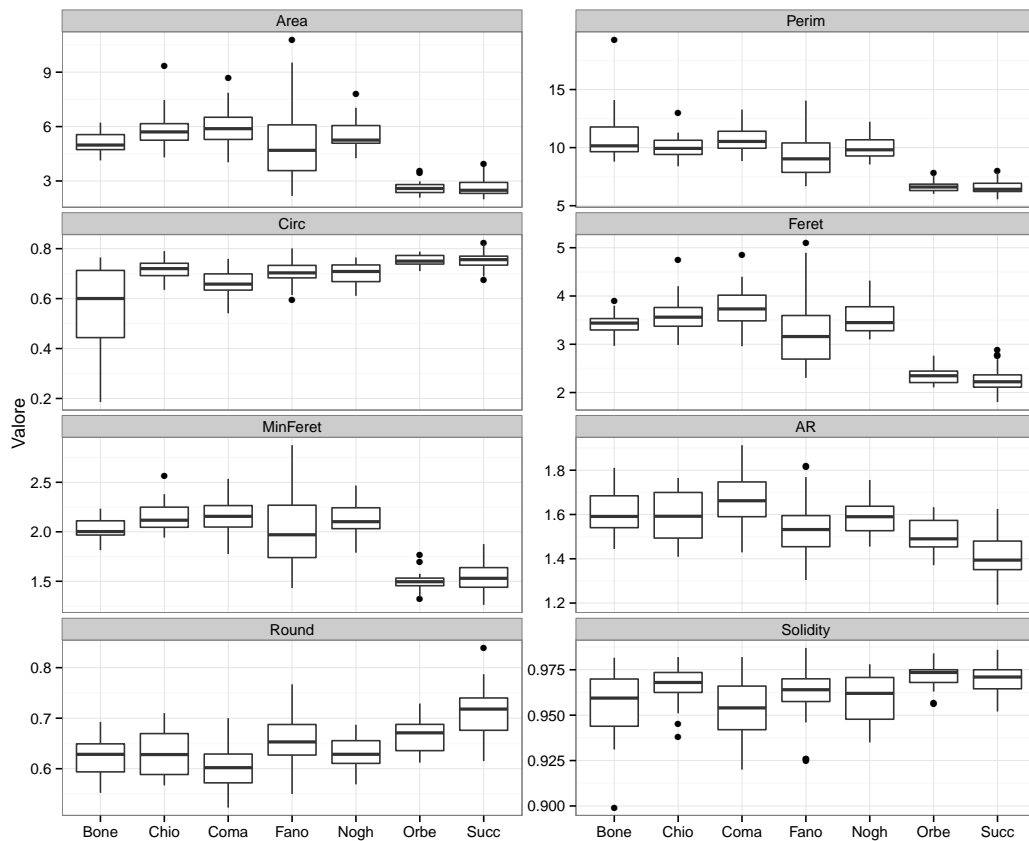


Figura 4.33: Boxplot della distribuzione dei valori dei principali parametri ottenuti dall'analisi morfometrica classica sul contorno degli otoliti.

4.8 Morfometria

L'analisi morfologica classica sul contorno ha restituito i dati mostrati nella figura 4.33. Come si può notare i parametri correlati alla taglia dell'otolite come Feret, MinFeret, Perimetro e Area mostrano un pattern simile, caratterizzato da significativi bassi valori dei parametri per i siti Orbe e Succ a causa della taglia media degli individui minore (figura 4.4 a pagina 51) e della correlazione positiva tra lunghezza degli individui e taglia degli otoliti (figura 4.34 nella pagina successiva).

Gli altri parametri, dato che non sono correlati alla dimensione degli otoliti, ci danno un'informazione indipendente dal fattore taglia degli individui. L'AR mostra valori più bassi (meno elongazione) per i siti Orbe e Succ in accordo al pattern generale che otoliti di individui giovani hanno forma più rotondeggiante. La Circolarità è invece costante fra i vari siti per quanto riguarda il valore medio anche se il sito Bone mostra una variabilità maggiore rispetto agli altri. La Rotondità mostra un pattern speculare rispetto all'AR a conferma della sua definizione (reciproco dell'AR). La solidità non mostra pattern evidenti. La dimensione degli otoliti cresce al crescere degli individui ma a taglie superiori a 600 mm la variabilità aumenta e per i siti Bone, Coma, Nogh abbiamo otoliti più piccoli rispetto a Fano. Nelle taglie più piccole, gli individui del sito Succ hanno otoliti più piccoli di Orbe a parità di taglia. Per poter effettuare l'analisi EFA i contorni degli otoliti acquisiti sono stati

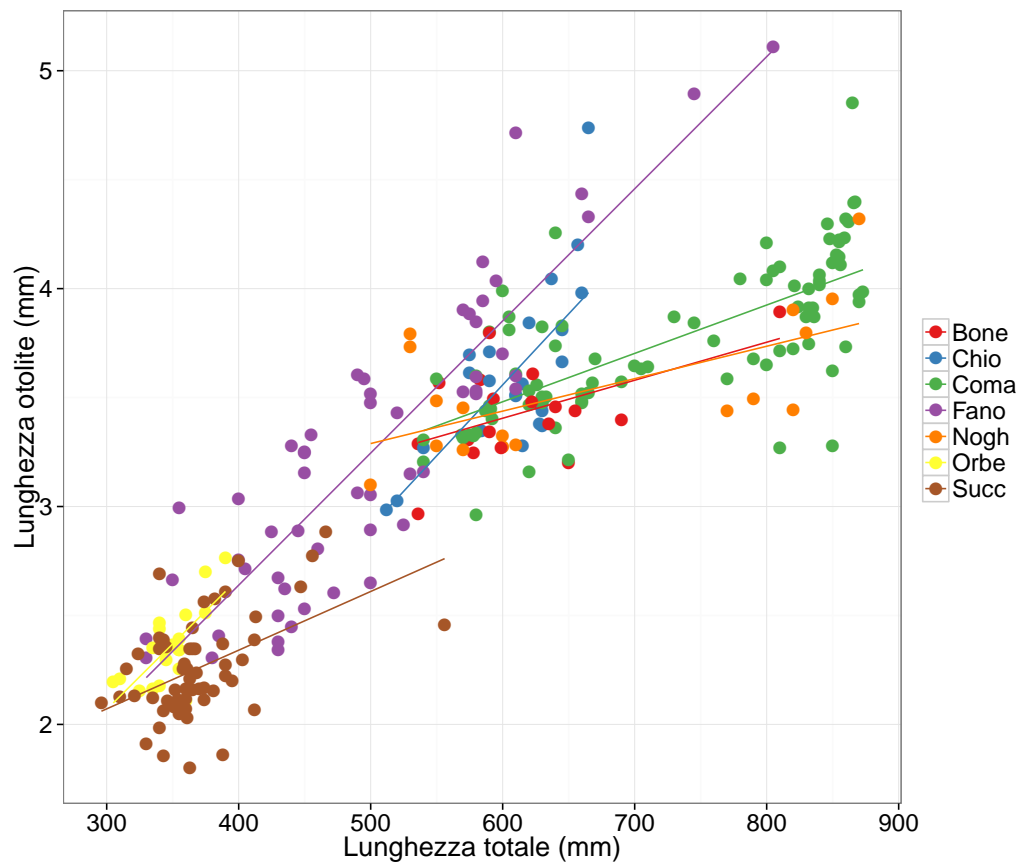


Figura 4.34: Relazione tra lunghezza degli individui e Feret degli otoliti per sito di campionamento.

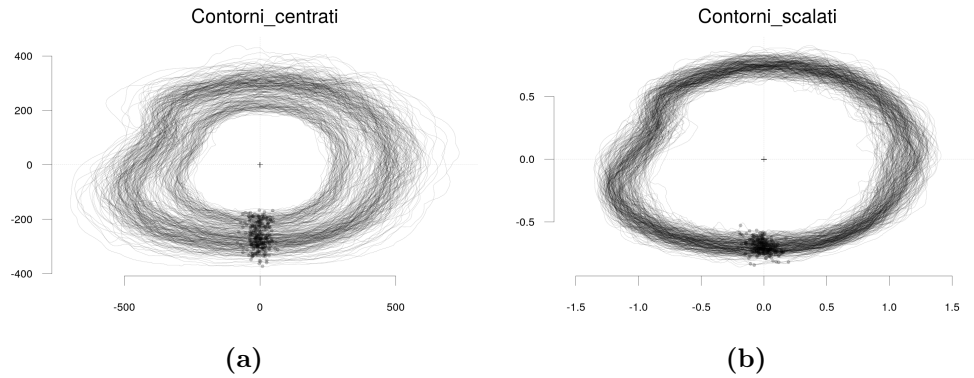


Figura 4.35: Contorni acquisiti dalle immagini degli otoliti: (a) contorni centrati sui baricentri, (b) contorni centrati e scalati alla stessa dimensione media.

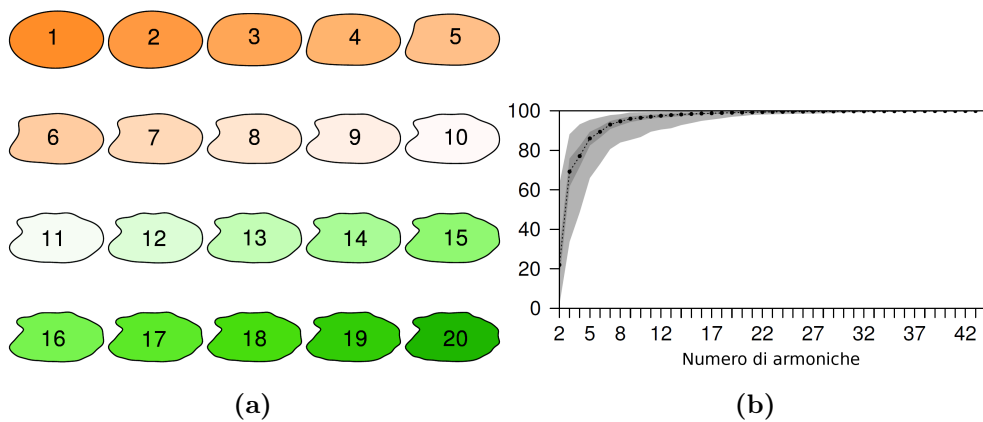


Figura 4.36: Stima del numero ottimale delle armoniche: (a) per via grafica, (b) mediante potenza cumulata dei coefficienti armonici: esprime la bontà di adattamento della forma riparametrizzata rispetto all'originale.

prima centrati e poi scalati per poter effettuare le analisi anche indipendentemente dal fattore taglia (figura 4.35).

Il numero ottimale di armoniche con cui riparametrizzare i contorni è stato ottenuto in prima istanza per via grafica (figura 4.36). Successivamente si è verificato anche per via analitica (figura 4.36 e 4.37 nella pagina successiva) e corrisponde a 20.

I singoli contorni sovrapposti ricostruiti mediante EFA sono mostrati in figura 4.38 a fronte.

In figura 4.39 a pagina 82 si possono vedere le forme medie riparametrizzate secondo l'algoritmo EFA per sito di campionamento sia taglia dipendenti che invarianti (immagini scalate): si nota la forma più rotondeggiante e la piccola taglia dei siti Orbe e Succi.

La correlazione tra forma media degli otoliti ed età degli individui è mostrata in figura 4.40 a pagina 82. È evidente come la forma cambi durante l'ontogenesi diventando progressivamente sempre più elongata e incisa e tale pattern rimane anche nel caso dei contorni scalati.

I grafici delle analisi delle componenti principali (PCA) dei coefficienti armonici,

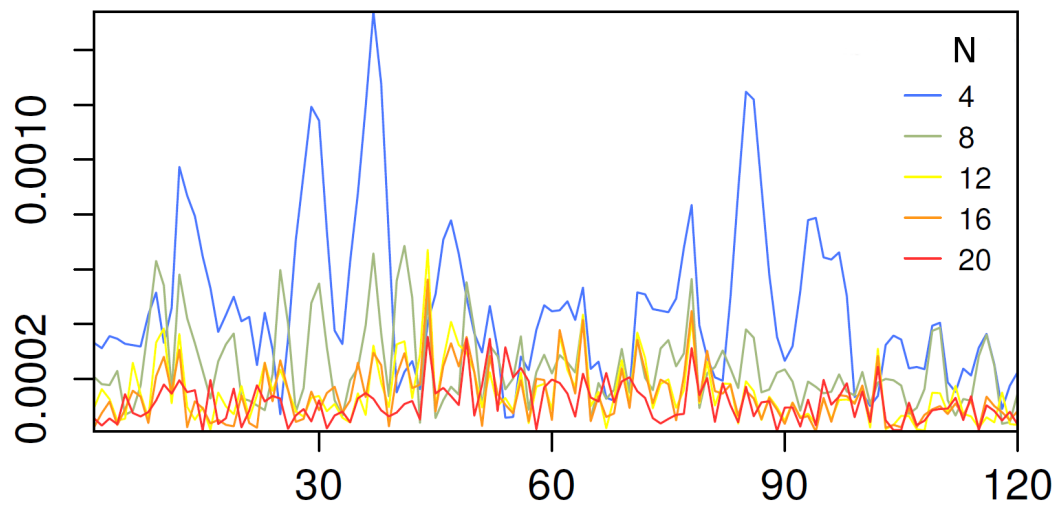


Figura 4.37: Scostamento sui singoli punti del contorno (120 scelti casualmente lungo il contorno – in ordinata) tra forma ricostruita e originale, N–numero di armoniche.

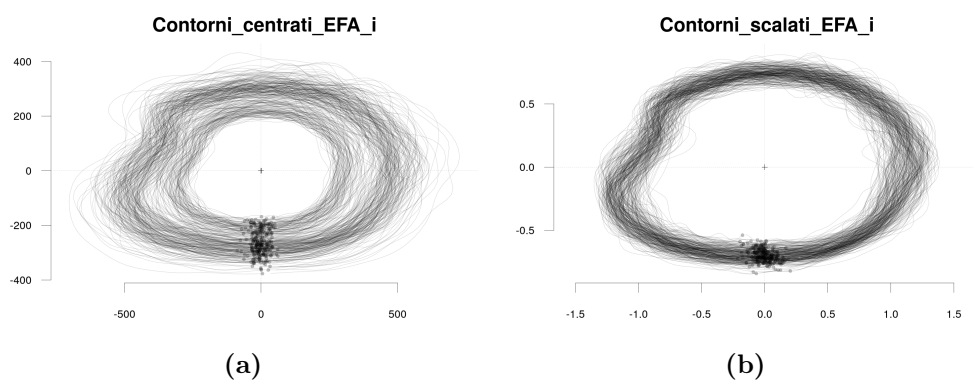


Figura 4.38: Contorni ricostruiti con EFA e 20 armoniche: (a) contorni centrati sui baricentri, (b) contorni centrati e scalati alla stessa dimensione media.

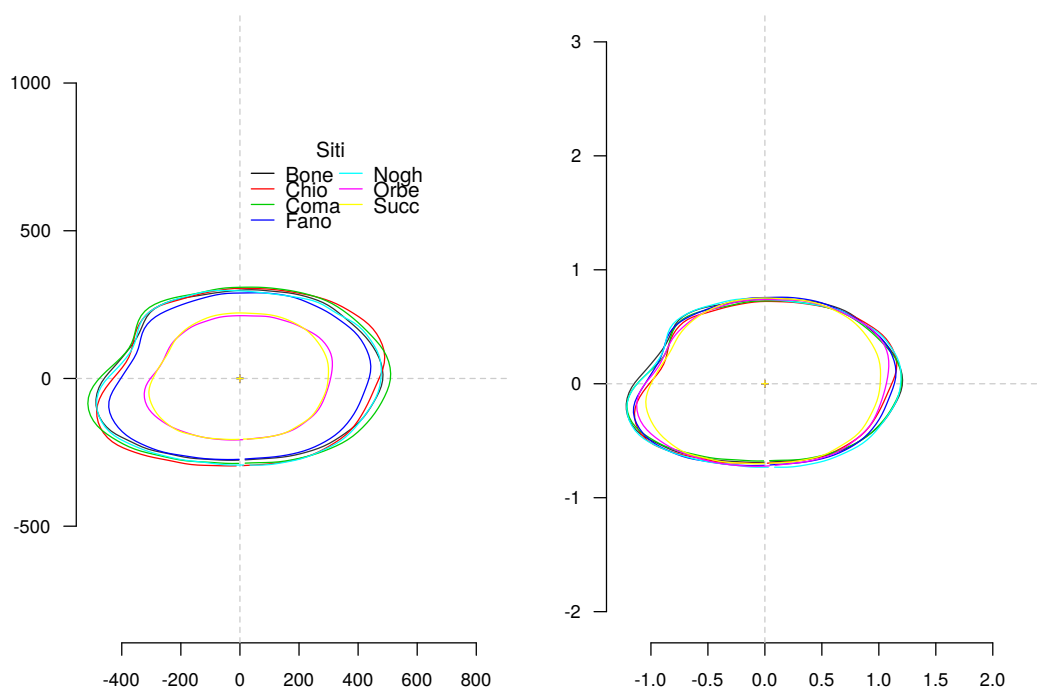


Figura 4.39: Contorni medi (EFA) per sito: a sinistra i contorni originali riparametrizzati e a destra quelli scalati (invarianti per taglia).

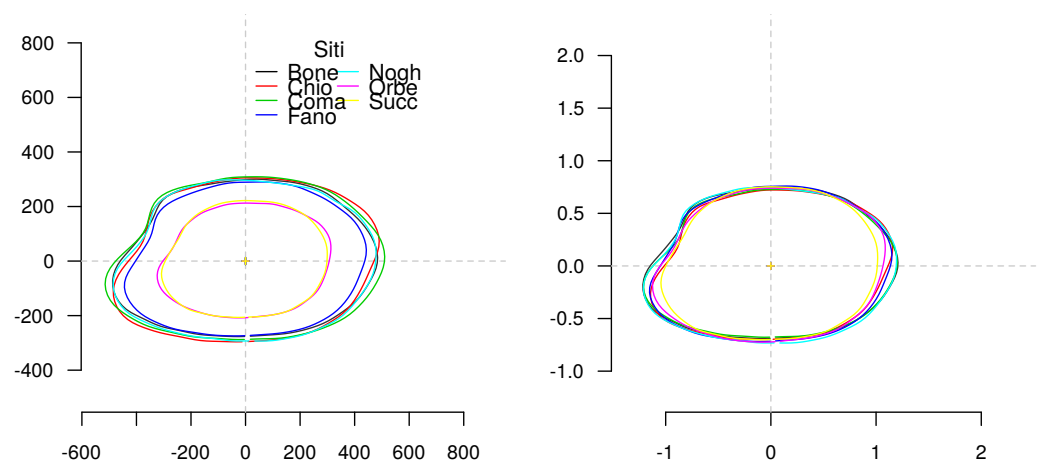


Figura 4.40: Contorni medi (EFA) per età. A sinistra i contorni originali riparametrizzati e a destra quelli scalati (invarianti per taglia).

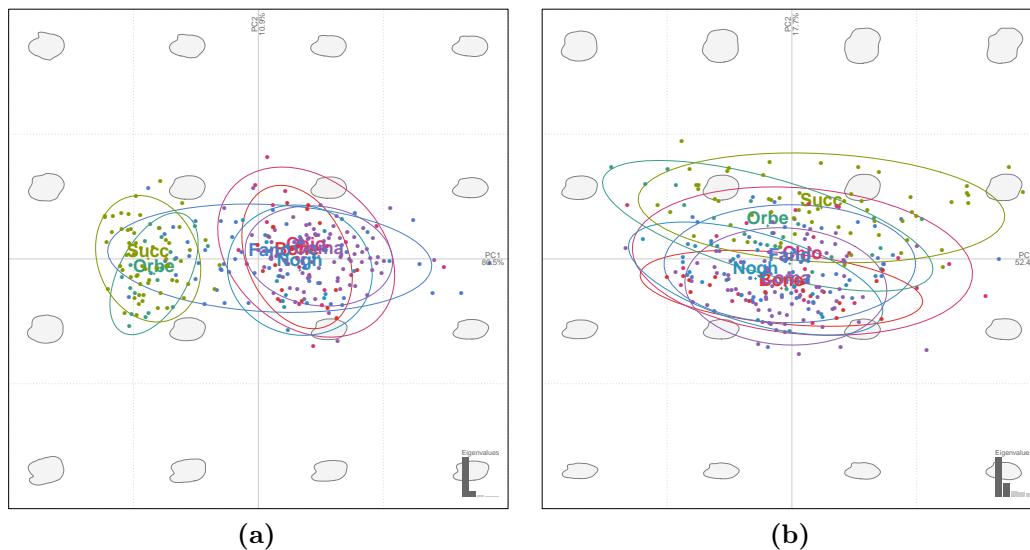


Figura 4.41: Ordinamento PCA dei contorni degli otoliti mediante analisi EFA raggruppati per sito: (a) – contorni centrati, (b) – contorni scalati.

calcolati sui contorni centrati e su quelli scalati, degli otoliti sono mostrati in figura 4.41.

I siti Orbe e Succ si differenziano dagli altri siti: dall'analisi del morfospazio (forme inserite nella griglia dell'ordinamento PCA) possiamo notare che hanno forma più rotondeggiante e assenza dell'invaginazione rostro – antirostro. Il sito di Fano che ha lo spettro di taglia più ampio è infatti trasversale agli altri gruppi e mostra un'ampia variabilità di forme. Gli altri gruppi, caratterizzati da esemplari adulti e in fase di maturazione, hanno forme simili tra loro. In figura 4.42 nella pagina seguente si può notare un gradiente di forma: da quella più rotondeggiante a quella più elongata e con invaginazione rostro – antirostro fortemente correlato all'età e quindi all'ontogenesi.

Dalla figura 4.43 nella pagina successiva possiamo vedere che il sesso non è discriminato dalla forma se non per un fattore ontogenetico: gli individui giovani si differenziano dagli adulti ma tra individui adulti non c'è differenza tra i sessi.

Eliminando il contributo della taglia dalla forma degli otoliti le differenze nel morfospazio diminuiscono ma il pattern generale e il gradiente ontogenetico permangono.

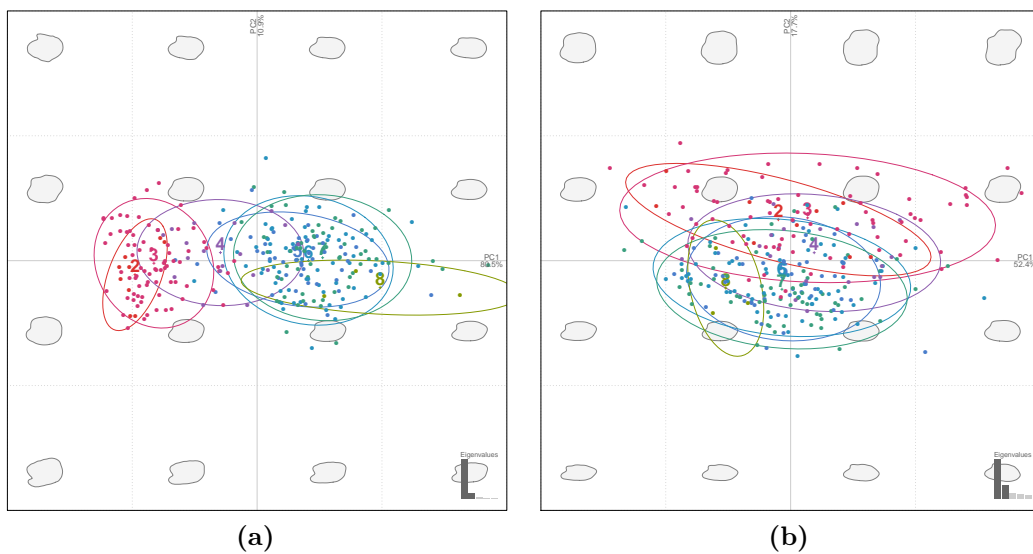


Figura 4.42: Ordinamento PCA dei contorni degli otoliti mediante analisi EFA raggruppati per età: (a) – contorni centrati, (b) – contorni scalati.

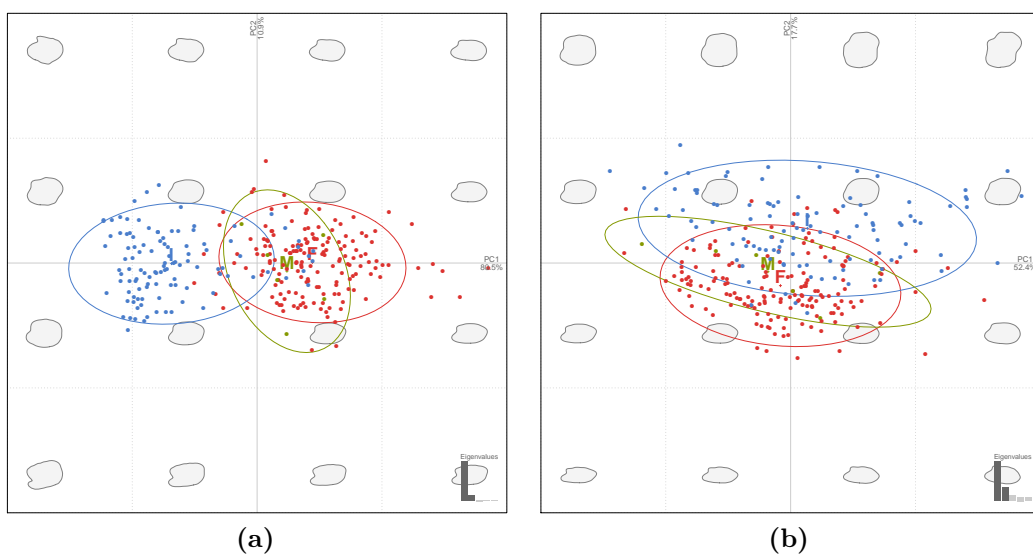


Figura 4.43: Ordinamento PCA dei contorni degli otoliti mediante analisi EFA raggruppati per sesso: (a) – contorni centrati, (b) – contorni scalati.

Capitolo 5

Discussione

Il reperimento dei campioni è stato alquanto arduo. L'eterogeneità degli ambienti colonizzati, naturalmente o artificialmente, da *A. anguilla* non consente la realizzazione di un disegno di campionamento bilanciato. Ragionando in termini di lunghezza degli individui ci si scontra con un'estrema variabilità nella relazione lunghezza – età. Esemplari di anguilla gialla di 500 mm di lunghezza totale possono avere da 3 a 7 anni di età. A complicare il quadro si aggiunge il forte dimorfismo sessuale caratterizzato dalla limitata lunghezza raggiunta dai maschi che raramente superano i 500 mm di lunghezza totale, fattori densità dipendente che guidano mortalità, accrescimento e sex ratio in alcuni ambienti [Bevacqua et al., 2011; De Leo e Gatto, 1996; Holmgren e Wickstrom, 2012; Holmgren, Wickstrom et al., 1997; Melia, Bevacqua et al., 2006; Melia, Crivelli et al., 2014; Simon, 2007; Vollestad e Jonsson, 1988] ma non in altri [Aprahamian, 2000], fattori genetici [Pujolar, Maes et al., 2005] e fattori antropici come le semine [Y. J. Lin et al., 2007; Psuty e Draganik, 2008; Shiao et al., 2006]. Tra gli anni '60 e '90 sulla scia di un'ampia disponibilità (e quindi basso costo) di ceche si è assistito ad un ripopolamento "indiscriminato" che non sempre ha tenuto conto della naturalità degli interventi modificando drasticamente la composizione dello stock: questo ha portato ad una commistione di esemplari autoctoni e alloctoni indiscriminata. Negli ultimi 20 anni, complice la rarefazione della disponibilità di ceche e l'alto prezzo per ragioni di globalizzazione di mercato unita ad una maggior sensibilità conservazionistica della specie a livello europeo, gli interventi di ricolonizzazione naturale o di sostegno alla produzione a scopi acquacolturali sono stati fatti, almeno ufficialmente, con materiale autoctono. Purtroppo ci si scontra con una realtà a due facce: da un lato l'interesse nell'individuare unità di stock a fini gestionali e dall'altro l'impossibilità di sapere se questi stock sono frutto di plasticità ambientale e genetica o dell'intervento dell'uomo. Nonostante questo, l'attività di ricerca ha fornito dei risultati interessanti sia dal punto di vista metodologico sia bioecologico. L'innovativo sistema di estrazione è un'evoluzione di quelli adottati in ambito internazionale per lo studio delle anguille [ICES, 2011] e si è dimostrato di rapida esecuzione, immune da perdite o danneggiamento degli otoliti e facilmente applicabile agli individui di taglia superiore a 250 mm. Il protocollo di pulizia ha assicurato una totale rimozione dei tessuti molli eventualmente adesi sulla superficie degli otoliti, garantendo uno stoccaggio indefinito e immune da alterazioni della forma e della composizione degli otoliti stessi. Di particolare importanza si è rivelata la messa a punto del sistema di montaggio e lavorazione

degli otoliti. La singolare robustezza dell'assemblaggio vetrino-resina termoplastica-coprioggetto-resina epossidica-otolite, unita alla possibilità di trasferire l'otolite (una volta levigato e lucidato) su qualunque supporto (vetro, plastica, metallo), apre una nuova prospettiva sulle indagini analitiche possibili. La compatibilità delle resine con l'acqua ha reso possibile la lavorazione a umido, che anche se più lenta rispetto a quella a secco, garantisce risultati sicuramente migliori in termini di finitura delle superfici lavorate. Inoltre la possibilità di traslocare i campioni e di assemblarli a mosaico [Donohoe e Zimmerman, 2010] ha ridotto notevolmente i tempi e i costi di analisi. Nel caso specifico delle analisi microchimiche con tecnologia LA-ICP-MS si è raggiunto il considerevole numero di 100 spot analizzati giornalmente corrispondenti a un costo di circa 4 euro cadauno. Le indagini al SEM grazie alla completa metallizzazione del sistema stub – campione non hanno mostrato criticità nella trasmissione del fascio elettronico. Durante la lavorazione degli otoliti l'esiguità delle resine utilizzate riduce drasticamente i tempi di levigatura e lucidatura, il consumo di materie prime, l'accumulo di rifiuti da smaltire e aumenta la durata e efficienza degli abrasivi. Tutto questo si traduce nella produzione di circa 10 otoliti lucidati al giorno. La fase di acquisizione digitale delle immagini grazie al particolare sistema di illuminazione e alla perfetta pulizia delle superfici degli otoliti ha garantito un'alta efficienza del sistema automatico di riconoscimento della forma e del contorno degli otoliti riducendo al limite l'intervento manuale per il controllo qualità: solo il 2% delle immagini hanno richiesto un intervento manuale per ovviare all'errato riconoscimento automatico. L'estrema trasparenza dei materiali utilizzati per il montaggio ha facilitato le operazioni di controllo delle fasi di lavorazione al microscopio ottico in trasmissione anche ad alti ingrandimenti (400X). Inoltre la fase di lettura dell'età mediante otoliti ha beneficiato del sistema di montaggio: grazie all'elevato indice di rifrazione delle resine utilizzate, l'intero "sandwich" si comporta come un unico corpo nei confronti della luce con un ottimo contrasto tra le zone opache e trasparenti dell'otolite. La determinazione dell'età mediante scaglie è stata una delle fasi più critiche della ricerca. In un primo momento le scaglie erano state fissate in alcool ma la disidratazione che ne consegue ne ha deformato irrimediabilmente la struttura rendendo difficoltosa se non impossibile la lettura. Successivamente l'uso della formalina ha eliminato il problema. Il valore aggiunto dell'uso delle scaglie come struttura per la determinazione dell'età risiede nella possibilità di non sacrificare gli individui: all'atto pratico però si scontra con i risultati ottenuti durante la ricerca. L'alto tasso di rigenerazione delle scaglie e la grande variabilità individuale [Frost, 1945] costringono all'asportazione di numerose scaglie e quindi del muco (nell'ordine di 2 – 3 cm²) che ricopre la pelle e protegge gli individui da attacchi patogeni esterni. Una lesione così estesa se non trattata opportunamente espone gli individui a sicure infezioni batteriche e micotiche che ne pregiudicherebbero la sopravvivenza. Dal confronto ottenuto con le letture degli otoliti appare chiaro che le scaglie sottostimano in media di 2 – 3 anni e quindi sono di poco ausilio nel determinare l'età di giovani anguille. Anche la determinazione macroscopica del sesso ha mostrato forti criticità: il dimorfismo sessuale è chiaro solo oltre i 500 mm di taglia e all'approssimarsi della maturazione sessuale: al di sotto di tale taglia è estremamente difficile riconoscere il sesso se non istologicamente [Beullens, Eding, Gilson et al., 1997; Beullens, Eding, Ollevier et al., 1997; Geffroy, Fostier e Bardonnet, 2013; Geffroy, Fostier, Guiguen et al., 2012; Tesch, 2003]. Dai

dati biometrici è emersa una crescita allometrica in media positiva ($b > 3$) con alcune eccezioni dovute probabilmente al ristretto range di taglia e alta variabilità individuale riscontrata in alcuni siti (Chio, Succ e Fano). L'analisi microstrutturale ha confermato la presenza di caratteristiche formazioni all'interno dell'otolite riconducibili ad eventi particolari dell'accrescimento, ben definiti nel tempo e nello spazio [Castonguay, 1987; Lecomte-Finiger, 1992; Lecomte-Finiger e Yahyaoui, 1989, 1990]. Particolarmente critica è stata la messa a punto dell'etching: la combinazione ottimale di concentrazione, tempo di applicazione, temperatura e stato di idratazione degli otoliti non è facilmente standardizzabile e rimane una delle fonti di variabilità più difficili da risolvere [Stevenson e Campana, 1992]. Molto singolare è la natura del nucleo, il primordio di formazione dell'otolite, ricco di materiale organico (evidenziato dalla selettività dei processi di etching utilizzati), ma con una composizione di elementi in tracce molto simile a quella della zona immediatamente successiva, corrispondente ai primi mesi di vita. La prima discontinuità evidente in prossimità del nucleo dovrebbe corrispondere al riassorbimento del sacco vitellino e l'inizio dell'alimentazione attiva. Da questo punto inizia una fase di deposizione di materiale biomineralizzato costante e con evidenti discontinuità imputabili a ritmi circadiani. Questa zona corrisponde ad un periodo di circa 200 – 300 giorni, in linea con quanto riportato da altri autori [Antunes e Tesch, 1997; Lecomte-Finiger, 1992] e confina verso l'esterno con una zona di deposizione diffusa con assenza di discontinuità regolari evidenti. La presenza di questa zona, che si estende fino ad una discontinuità molto evidente e corrispondente ad un brusco cambiamento nella fisiologia degli individui, è alla base dell'incertezza sulla durata della fase migratoria che precede la trasformazione da ceca a ragano. Con le conoscenze attuali è solo possibile fare congetture sulla durata di tale fase e sui fattori che la governano: accettando l'ipotesi di origine comune dal mare dei Sargassi, la durata della migrazione è sicuramente legata a fenomeni di circolazione globale e alla sua fluttuazione nel tempo. Prove in laboratorio su altre specie hanno dimostrato che in condizioni di acque particolarmente fredde e assenza di alimentazione la deposizione degli otoliti non si arresta ma continua anche se con dinamiche diverse. Il brusco cambiamento di temperatura, salinità e regime alimentare potrebbe essere collegato alla scomparsa della deposizione giornaliera visibile e la comparsa della zona diffusa. Rimane l'incertezza sul come determinare la durata temporale di questa particolare fase. La differenza di durata della migrazione attesa tra i campioni Spag e Arbe, non è stata osservata e potrebbe essere appunto mascherata dalla presenza della zona diffusa o da un'origine diversa dato che le distanze da percorrere, provenendo da un sito comune, sono sufficientemente diverse da essere quantificabili mediante gli incrementi giornalieri. Un'altra ipotesi potrebbe essere che la formazione della zona diffusa avvenga prima dell'ingresso in Mediterraneo, dato che lo spessore della zona diffusa è paragonabile a quella degli esemplari che raggiungono le coste del nord Europa e nord Africa [Antunes e Correia, 2003; Antunes e Tesch, 1997; Arai et al., 2000; Lecomte-Finiger, 1992; McCleave, 2008; Wang e Tzeng, 2000]. Per spiegare in parte questo fenomeno potrebbero essere d'aiuto i recenti progressi nella induzione artificiale alla maturazione delle gonadi e nella riproduzione assistita che si stanno svolgendo in Italia [Mordenti, Di Biase, Bastone et al., 2013; Mordenti, Di Biase, Sirri et al., 2012]. La disponibilità di larve da svezzare e alimentare sotto determinate condizioni potrebbe fornire utili indicazioni per validare gli ac-

crescimenti giornalieri e i fattori che determinano la deposizione della zona diffusa. Successivamente poi, verificata la deposizione giornaliera, si potrebbero applicare i metodi messi a punto in questa ricerca per monitorare e migliorare le performance dell'attività di acquacoltura: questo si potrebbe tradurre sia nello studio della mortalità e accrescimento dei nuovi nati che della "life history" dei riproduttori da correlare al successo degli eventi riproduttivi e della sopravvivenza della progenia. Le misurazioni effettuate al SEM sui campioni, levigati e lucidati, hanno permesso di dimensionare l'apertura dello spot laser da utilizzare per le analisi LA-ICP-MS. Gli spot da 35 – 50 μm , scelti per ragioni conservative e di limite di rilevabilità raggiungibile, si sono dimostrati forse sovradimensionati e in prospettiva futura, alla luce dei risultati ottenuti, verrà utilizzato uno spot di dimensioni inferiori. I limiti di rilevabilità tra 35 – 50 μm sono paragonabili e probabilmente, anche se a scapito del numero di elementi rintracciabili, il minor diametro consentirebbe una risoluzione spaziale e temporale più adatta a seguire l'accrescimento di anguilla. I risultati delle analisi microchimiche hanno rivelato che la composizione chimica della regione nucleare, complice anche il diametro dello spot laser utilizzato, è simile a quella della zona degli incrementi giornalieri, sia nella quantità assoluta che relativa degli elementi indagati, a differenza delle ipotesi di alcuni autori [Martin et al., 2010]. Il rapporto Sr:Ca è l'unico valore statisticamente diverso: è meno abbondante nel nucleo, forse a causa di un contributo parentale diverso dalla composizione delle acque in cui poi schiude e si sviluppa la larva. L'elevato numero di anni di nascita dei campioni analizzati probabilmente maschera gli eventuali gruppi con caratteristiche chimiche di origine differenti: le traiettorie e la durata del tempo di migrazione potrebbero essere diverse nei vari anni e portare le larve attraverso masse d'acqua con caratteristiche sufficientemente diverse da essere rilevate con le analisi degli elementi in tracce, aumentando l'interspersione dei dati ottenuti. L'unico anno di nascita (degli esemplari campionati) con un numero sufficiente di campioni distribuiti su più siti è stato il 2010: le analisi microchimiche hanno discriminato due gruppi riconducibili a individui selvatici e di possibile ripopolamento, a riprova della complessità nella distribuzione degli esemplari e della loro origine. Il campione Albe, certamente di rimonta naturale, si discosta significativamente da quelli di Orbe e Succ. Nonostante le assicurazioni fornite sul materiale di semina del sito Orbe, sapendo che il materiale di Succ è sicuramente d'importazione pone forti dubbi sulla natura "autoctona" di Orbe. La forte richiesta di reclute per sostenere la produzione acquacolturale e la scarsa disponibilità di ceche e ragani autoctoni potrebbe essere alla base di semine di materiale alloctono. Alla fine della fase larvale marina avvengono profonde modificazioni a livello fisiologico dettate da brusche variazioni di salinità e temperatura che portano alla pigmentazione e alla trasformazione da ceca a ragano. Sia le indagini microstrutturali che microchimiche hanno confermato questa caratteristica: le immagini al SEM hanno evidenziato una netta discontinuità alla fine della regione diffusa e associata poi al primo annulo stagionale (primo inverno dopo la migrazione), mentre le analisi microchimiche hanno confermato differenze significative negli elementi associati alla salinità. Alcuni elementi come ^7Li , ^{11}B , ^{25}Mg , ^{88}Sr e ^{208}Pb sono significativamente maggiori nelle prime fasi di vita larvale, avvalorando l'ipotesi di migrazione dall'oceano. Il ^{138}Ba invece mostra un picco significativo nella fase di metamorfosi ceca-ragano per poi tornare a livelli bassi paragonabili alle prime fasi di vita [F. Capoccioni et al., 2013;

McCleave, 2008; Panfili et al., 2012; Tzeng, H. R. Lin et al., 2000; Tzeng, Severin, Wang et al., 2005; Tzeng, Severin e Wickstrom, 1997; Tzeng, Severin, Wickstrom e Wang, 1999]. Confrontando invece i singoli profili rappresentativi di alcuni siti di campionamento, si vede come ^{88}Sr , ^{138}Ba e il loro rapporto indichino comportamenti diversi nel corso della vita degli individui: gli esemplari di Coma e quello di Fano, pescato alla foce del fiume Metauro, mostrano valori del rapporto Sr:Ba molto bassi e costanti e provano una residenza in ambienti di acque poco salate come appunto la laguna di Comacchio e una zona di mare con abbondante apporto fluviale. I siti Bone, Chio, Fano e Nogh sono caratterizzati da valori iniziali bassi, paragonabili ai precedenti siti, ma mostrano un trend positivo con valori finali molto alti associati a salinità importanti, caratteristici dell'ambiente di cattura e dimostrano un comportamento migratorio degli esemplari, specialmente quelli di taglia ed età maggiore. Le analisi morfometriche hanno evidenziato nel complesso una relazione lineare tra Feret dell'otolite e lunghezza totale dell'individuo: la pendenza delle rette di regressione mostrano una netta dicotomia. Nei siti Chio, Fano, Orbe la crescita dell'otolite a parità di lunghezza è maggiore rispetto ai restanti siti: questo può essere spiegato da due fattori ben distinti. Da un lato, il campione Succ a crescita lenta può essere dovuto allo stato di salute degli individui campionati: sono infatti esemplari ritenuti non idonei all'ingrasso perchè parassitati o malformati. Dall'altro, i siti Bone, Coma e Nogh sono caratterizzati da individui adulti di taglia inferiore a 700 mm paragonabili a quelli degli altri siti e da un nutrito gruppo di adulti in fase di maturazione (argentine) di taglia superiore ai 700 mm. Proprio questo gruppo caratterizzato da otoliti molto piccoli in proporzione alla taglia degli individui, sposta la retta di regressione abbassandone la pendenza. Questa caratteristica potrebbe essere spiegata con una riduzione nel tasso di crescita dell'otolite, in seguito ai profondi cambiamenti nella dieta, nell'accumulo di grasso corporeo e nello sviluppo delle gonadi durante il processo di argentinizzazione. Le analisi condotte sul contorno degli otoliti invece, hanno messo in luce la presenza di due gruppi correlati all'età: un primo gruppo è rappresentato dagli individui di 2 – 3 anni caratterizzato da otoliti di forma più circolare, mentre un secondo, composto da individui di età superiore ai 5 anni, è caratterizzato da forma più elongata in accordo con altri autori [Fabrizio Capoccioni et al., 2011]. Un terzo gruppo a cui appartengono gli esemplari di 4 anni di età, collega i due precedenti, mostrando una forma dell'otolite intermedia agli altri due gruppi. Eliminando il fattore taglia, la dicotomia permane, anche se di magnitudine inferiore e può essere collegata al MinFeret. In definitiva, l'approccio utilizzato durante l'attività di ricerca si è rivelato adeguato per rispondere alle domande che ci si è posti riguardo l'origine comune e la presenza di possibili unità di stock distinte. Nonostante le inevitabili lacune del campionamento, l'attività di ricerca ha prodotto risultati interessanti, aprendo nuove prospettive per lo studio della "life history" di anguilla europea. In definitiva non si può escludere l'origine comune delle fasi larvali e non sono emerse prove dell'esistenza di unità di stock naturali distinte. In base ai riscontri ottenuti, le future attività di ricerca saranno volte a risolvere due criticità importanti: migliorare il disegno di campionamento, focalizzandosi sulle ceche di rimonta naturale, e aumentare il potere risolutivo delle analisi in termini spaziali sulla superficie dell'otolite, per ottenere maggior dettaglio temporale relativamente alle fasi di crescita. La possibilità di lavorare su ceche arrivate nello stesso anno garantirebbe un disegno

sperimentale bilanciato ed eliminerebbe la variabilità associata al fattore tempo. Verrebbe risolto così anche il problema di campionare un gran numero di individui adulti per le considerazioni fatte precedentemente. Resta comunque interessante condurre indagini sugli individui di grossa taglia perchè, registrando negli otoliti un lasso di tempo sufficientemente lungo, possono rispondere alle domande sui fattori che determinano l'istinto a migrare o a rimanere sedentari. Inoltre, le profonde modificazioni a cui vanno incontro gli individui adulti durante la maturazione sessuale, potrebbero essere fissate anche nella struttura degli otoliti e il loro studio fornirebbe ulteriori informazioni sul "timing" di questo processo chiave. Dal punto di vista metodologico e tecnologico, invece, l'utilizzo di indagini microchimiche a più alta risoluzione spaziale, garantirebbe maggior dettaglio nel ricostruire la storia temporale degli individui. Potrebbe anche delineare meglio le fasi cruciali della migrazione e l'accrescimento nelle prime fasi di vita, che con le conoscenze attuali non possono essere spiegate. Le indagini microstrutturali su uova e larve da allevamento potrebbero infine fornire finalmente dati certi sull'accrescimento giornaliero degli otoliti.

Bibliografia

- Abramoff, M. D., P. J. Magalhães e S. J. Ram
2004 «Image Processing with ImageJ», *Biophotonics International*, vol. 11, 7, p. 36-42, <http://www.imagescience.org/meijering/publications/download/bio2004.pdf>. (Citato alle p. 40, 44.)
- Adams, D. D. C., F. J. Rohlf e D. E. Slice
2004 «Geometric morphometric: ten year of progress following the revolution», *Italian Journal of Zoology*, vol. 71, p. 5-16, DOI: [10.1080/11250000409356545](https://doi.org/10.1080/11250000409356545). (Citato alle p. 11, 12.)
- Als, Thomas D., Michael M. Hansen, Gregory E. Maes, Martin Castonguay, Lasse Riemann, Kim Aarestrup, Peter Munk, Henrik Sparholt, Reinhold Hanel e Louis Bernatchez
2011 «All roads lead to home: panmixia of European eel in the Sargasso Sea», *Molecular Ecology*, vol. 20, 7, p. 1333-1346, DOI: [10.1111/j.1365-294X.2011.05011.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05011.x). (Citato a p. 14.)
- Andrello, M., D. Bevacqua, G. A. De Leo, P. Piovani, P. Melia, A. J. Crivelli e M. Gatto
2006 «A simulation model of population genetic to unravel the panmictic nature of European eel», *The Journal of Experimental Biology*, vol. 69, p. 242-242, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2012.11.079](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.079). (Citato a p. 13.)
- Andrello, M., D. Bevacqua, G. E. Maes e G. A. De Leo
2011 «An integrated genetic demographic model to unravel the origin of genetic structure in European eel (*Anguilla anguilla* L.)» *Evolutionary Applications*, vol. 4, 4, p. 517-533, DOI: [10.1111/j.1752-4571.2010.00167.x](https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00167.x). (Citato a p. 13.)
- Andrus, C. F., D. E. Crowe, D. H. Sandweiss, E. J. reits e C. S. Romanek
2002 «Otolits delta ¹⁸O record of mid-Holocene sea surface temperature in perù», *Science*, vol. 295, p. 1508-1511, DOI: [10.1126/science.1062004](https://doi.org/10.1126/science.1062004). (Citato a p. 10.)
- Antunes, C. e A. T. Correia
2003 «Sagitta microstructure of European conger eel, *Conger conger* (L.), leptocephali compared with leptocephali of the eel, *Anguilla anguilla* (L.)» *Archive of Fishery and Marine Research*, vol. 50, 3, p. 227-237. (Citato a p. 87.)

Antunes, C. e F. W. Tesch

- 1997 «A critical consideration of the metamorphosis zone when identifying daily rings in otoliths of European eel, *Anguilla anguilla* (L)», *Ecology of Freshwater Fish*, vol. 6, 2, p. 102-107, DOI: [10.1111/j.1600-0633.1997.tb00150.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.1997.tb00150.x). (Citato a p. 87.)

Aprahamian, M. W.

- 2000 «The growth rate of eel in tributaries of the lower River Severn, England, and its relationship with stock size», *The Journal of Experimental Biology*, vol. 56, 1, p. 223-227, DOI: [10.1111/j.1095-8649.2000.tb02100.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2000.tb02100.x). (Citato a p. 85.)

Arai, T., T. Otake e K. Tsukamoto

- 2000 «Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *A. anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry», *Marine Biology*, vol. 137, 1, p. 39-45, DOI: [10.1007/s002270000326](https://doi.org/10.1007/s002270000326). (Citato a p. 87.)

Ardizzone, G., S. Cataudella e R. Rossi

- 1988 «Management of coal lagoon fisheries and aquaculture in Italy», *FAO Fisheries Technical Paper*, vol. 293, 103 pp. (Citato a p. 17.)

Ardizzone, G. e F. Corsi

- 1985 «Eel population structure, dynamics and fishing yield in a mediterranean coastal lagoon», *Oebalia*, vol. XI, 2, p. 547-560. (Citato a p. 16.)

Barrett, R. T., N. Rov, J. Loen e W. A. Montevecchi

- 1990 «Diets of shags *Phalacrocorax aristotelis* and cormorants *P. carbo* in Norway and possible implications for gadoid stock recruitment», *Marine Ecology Progress Series.*, vol. 66, p. 205-218, DOI: [10.3354/meps066205](https://doi.org/10.3354/meps066205). (Citato a p. 9.)

Begg, G. A., S. E. Campana, A. Fowler e I. M. Suthers

- 2005 «Otolith research and application: current directions in innovation and implementation», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, p. 477-483, DOI: [10.1071/MF05111](https://doi.org/10.1071/MF05111). (Citato a p. 10.)

Begg, G. A., K. D. Friedland e J. B. Pearce

- 1999 «Stock identification and its role in stock assessment and fisheries management: an overview», *Fisheries Research*, vol. 43, p. 1-8, DOI: [10.1016/S0165-](https://doi.org/10.1016/S0165-). (Citato a p. 11.)

Begg, G. A. e J. R. Waldman

- 1999 «An holistic approach to fish stock identification», *Fisheries Research*, vol. 43, p. 35-44, DOI: [10.1016/S0165-7836\(99\)00065-X](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(99)00065-X). (Citato a p. 11.)

- Beullens, K., E.H. Eding, P. Gilson, F. Ollevier, J. Komen e C.J.J. Richter
1997 «Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity», *Aquaculture*, 153, p. 135-150, DOI: [10.1016/S0044-8486\(97\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00018-5). (Citato a p. 86.)
- Beullens, K., E.H. Eding, J. Ollevier F.and Komen e C.J.J. Richter
1997 «Sex differentiation, changes in length, weight and eye size before and after metamorphosis of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity», *Aquaculture*, 153, p. 151-162, DOI: [10.1016/S0044-8486\(97\)00019-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(97)00019-7). (Citato a p. 86.)
- Bevacqua, D., Paco Melia, Giulio A. De Leo e Marino Gatto
2011 «Intra-specific scaling of natural mortality in fish: the paradigmatic case of the European eel», *Oecologia*, vol. 165, 2, p. 333-339, DOI: [10.1007/s00442-010-1727-9](https://doi.org/10.1007/s00442-010-1727-9). (Citato a p. 85.)
- Bird, J. L., D. T. Eppler e Jr. D. M. Checkley
1986 «Comparison of herring otoliths using fourier series shape analysis», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 43, p. 1228-1234, DOI: [10.1139/f86-152](https://doi.org/10.1139/f86-152). (Citato a p. 12.)
- Bonhomme, V., P. Picq, C. Gaucherel e J. Claude
2014 «Momocs: Outline Analysis Using R», *Journal of Statistical Software*, vol. 56, 13, p. 1-24, <http://www.jstatsoft.org/v56/i13/paper>. (Citato a p. 45.)
- Bonhommeau, S., B. Blanke, A. M. Treguier, N. Grima, E. Rivot, Y. Vermard, E. Greiner e O. Le Pape
2009 «How fast can the European eel (*Anguilla anguilla*) larvae cross the Atlantic Ocean?», *Fish Oceanogr*, vol. 18, 6, p. 371-385, DOI: [10.1111/j.1365-2419.2009.00517.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2419.2009.00517.x). (Citato a p. 13.)
- Bonhommeau, S., M. Castonguay, E. Rivot, R. Sabatie e O. Le Pape
2010 «The duration of migration of Atlantic *Anguilla* larvae», *Fish and Fisheries*, vol. 11, 3, p. 289-306, DOI: [10.1111/j.1467-2979.2010.00362.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2010.00362.x). (Citato a p. 14.)
- Bonhommeau, S., O. Le Pape, D. Gascuel, B. Blanke, A. M. Treguier, N. Grima, Y. Vermard, M. Castonguay e E. Rivot
2009 «Estimates of the mortality and the duration of the trans-Atlantic migration of European eel *Anguilla anguilla* leptocephali using a particle tracking model», *The Journal of Experimental Biology*, vol. 74, 9, p. 1891-1914, DOI: [10.1111/j.1095-8649.2009.02298.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02298.x). (Citato a p. 14.)

- Botsford, L. W., D.R. Brumbaugh, C. Grimes, J. B. Kellner, J. Largier, M. R. OFarell, S. Ralston, E. Soulanille e V. Wespestad
 2009 «Connectivity, sustainability and yield: bridging the gap between conventional fisheries management and marine protected areas», *Review of fish Biology and Fisheries*, 19, p. 69-95, DOI: [10.1007/s11160-008-9092-z](https://doi.org/10.1007/s11160-008-9092-z). (Citato a p. 12.)
- Bowen, W. D.
 2000 «Reconstruction of pinniped diets: accounting for complete digestion of otoliths and cephalopod beaks», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 57, p. 898-905, DOI: [10.1139/f00-032](https://doi.org/10.1139/f00-032). (Citato a p. 9.)
- Bowen, W. D., J. W. Lawson e B. Beck
 1993 «Seasonal and geographic variation in the species composition and size of prey consumed by grey seals (*Halicoerus prypus*) on the Scotian shelf», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 50, p. 1768-1778, DOI: [10.1139/f93-198](https://doi.org/10.1139/f93-198). (Citato a p. 9.)
- Burns, J. M., S. J. Trumble, M. A. Castellini e J. W. Testa
 1998 «The diet of Weddel seals in McMurdo sound, Antarctica as determined from scat collections and stable isotope analysis», *Polar Biology*, vol. 19, p. 272-282, DOI: [10.1007/s003000050245](https://doi.org/10.1007/s003000050245). (Citato a p. 9.)
- Cadrin, S. X., L. A. Kerr e S. Mariani
 2014 *Stock identification methods*, a cura di S. X. Cadrin, L. A. Kerr e S. Mariani, Second Edition, Academic Press, San Diego, ISBN: 978-0-12-397003-9, DOI: [10.1016/B978-0-12-397003-9.01001-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397003-9.01001-8), <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123970039010018>. (Citato alle p. 3, 11.)
- Campana, S. E.
 1989 «Otolith microstructure of three larval gadids in the Gulf of Maine, with Intintere on early life history», *Canadian Journal of Zoology*, vol. 67, p. 1401-1410, DOI: [10.1139/z89-199](https://doi.org/10.1139/z89-199). (Citato a p. 7.)
 1990 «How Atlantic are growth back-calculations based on otoliths?», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 47, p. 2219-2227, DOI: [10.1139/f90-246](https://doi.org/10.1139/f90-246). (Citato a p. 7.)
 1999 «Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications», *Marine Ecology Progress Series*, vol. 188, p. 263-297, DOI: [10.3354/meps188263](https://doi.org/10.3354/meps188263). (Citato alle p. 3, 4.)
 2004 *Photographic Atlas of Fish Otoliths of the Northwest Atlantic Ocean*, a cura di NRC Research Press, Ottawa, Ontario, ISBN: 978-0-660-19108-9. (Citato alle p. 5, 6, 8-10.)
 2005 «Otolith science entering the 21th century», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, p. 485-495, DOI: [10.1071/MF04147](https://doi.org/10.1071/MF04147). (Citato a p. 10.)

- Campana, S. E. e J. M. Casselman
1993 «Stock discrimination using otolith shape analysis», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 50, p. 1062-1083, DOI: [10.1139/f93-123](https://doi.org/10.1139/f93-123). (Citato alle p. [6](#), [7](#), [11](#), [12](#).)
- Campana, S. E. e J. D. Neilson
1985 «Microstructure of Fish Otoliths», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 42, 5, p. 1014-1032, DOI: [10.1139/f85-127](https://doi.org/10.1139/f85-127). (Citato alle p. [3](#), [10](#), [11](#).)
- Campana, S. E. e S. R. Thorrold
2001 «Otoliths, increments, and elements: keys to a comprehensive understanding of fish populations?», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 58, p. 30-38, DOI: [10.1139/f00-177](https://doi.org/10.1139/f00-177). (Citato a p. [10](#).)
- Capoccioni, F., D. Lin, Y. Iizuka, W. Tzeng e E. Ciccotti
2013 «Phenotypic plasticity in habitat use and growth of the European eel (*Anguilla anguilla*) in transitional waters in the Mediterranean area», *Ecology of Freshwater Fish*, DOI: [10.1111/eff.12049](https://doi.org/10.1111/eff.12049). (Citato a p. [88](#).)
- Capoccioni, Fabrizio, Corrado Costa, Jacopo Aguzzi, Paolo Menesatti, Antoni Lombarte e Eleonora Ciccotti
2011 «Ontogenetic and environmental effects on otolith shape variability in three Mediterranean European eel (*Anguilla anguilla*, L.) local stocks», *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, vol. 397, 1, p. 1-7, DOI: [10.1016/j.jembe.2010.11.011](https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.11.011). (Citato a p. [89](#).)
- Cardinale, M., P. Doering-Arjes, M. Kastawsky e H. Mosegaard
2004 «Effect of sex, stock and environment on the shape of Atlantic cod (*Gadus morhua*) otoliths», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 61, 2, p. 158-167, DOI: [10.1139/f03-151](https://doi.org/10.1139/f03-151). (Citato a p. [7](#).)
- Carlstrom, D.
1963 «A crystallographic study of vertebrate otoliths», *Biological Bulletin*, vol. 124, p. 441-463, DOI: [dx.doi.org/10.2307/1539358](https://doi.org/dx.doi.org/10.2307/1539358). (Citato a p. [4](#).)
- Casselman, J. M.
1987 «The biology of fish growth», in *The biology of fish growth*, a cura di A. H. Weatherley, H. S. Gill e J. M. Casselman, Academic Press, New York, cap. 7, p. 209-242, ISBN: 9780127390550. (Citato a p. [3](#).)
- Castonguay, M.
1987 «Growth of American and European Eel Leptocephali As Revealed By Otolith Microstructure», *Canadian Journal of Zoology*, vol. 65, 4, p. 875-878, DOI: [10.1139/z87-139](https://doi.org/10.1139/z87-139). (Citato a p. [87](#).)

Castonguay, M., P. Simard e P. Gagnon

- 1991 «Usefulness of Fourier analysis of otolith shape for Atlantic mackarel (*Scomber scombrus*) stock discrimination», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 48, p. 296-302, DOI: [10.1139/f91-041](https://doi.org/10.1139/f91-041). (Citato a p. 12.)

Chang, M. e A.J. Geffen

- 2013 «Taxonomic and geographic influence on fish otolith microchemistry», *Fish and Fisheries*, 14, p. 458-492, DOI: [10.1111/j.1467-2979.2012.00482.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2012.00482.x). (Citato a p. 11.)

Chen, S. Y. Y., P. E. Lestrel, W. J. S. Kerr e J. H. McColl

- 2000 «Describing shape changes in the human mandible using elliptical Fourier functions», *The European Journal of Orthodontics*, vol. 22, p. 205-216, DOI: [dx.doi.org/10.1093/ejo/22.3.205](https://doi.org/10.1093/ejo/22.3.205). (Citato alle p. 11, 12.)

Ciccotti, E.

- 1997 «Italy», in *Management of European eel fisheries*, a cura di C. Moriarty e W. Dekker, Irish Fisheries Bulletin, Marine Institute, vol. 15, p. 91-100, <http://hdl.handle.net/10793/197>. (Citato a p. 16.)
- 2005 «Interactions between capture fisheries and aquaculture: the case of the eel (*Anguilla anguilla* L. 1758)», in *Interactions between aquaculture and capture fisheries: a methodological perspective*, a cura di S. Cataudella, F. D. Massa e D. Crosetti, Studies and Reviews, General Fisheries Commission for the Mediterranean, vol. 78, p. 190-203, <http://www.fao.org/docrep/009/a0141e/a0141e00.htm>. (Citato a p. 18.)

Ciccotti, E., S. Busilacchi e S. Cataudella

- 2000 «Eel, *Anguilla anguilla* (L.), in Italy: recruitment, fisheries and aquaculture», *Dana*, vol. 12, p. 7-15, https://www.google.it/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=6&cad=rja&uact=8&ved=0CEwQFjAF&url=http://www.aqua.dtu.dk/~media/Institutter/Aqua/Publikationer/Dana/dana_vol_12_pp_7_15.ashx?la=da&ei=m2UFVfi4Csv_ywOMkoKQCg&usg=AFQjCNFkS369o3DyhtW-UW6jW_7oEPy1ZQ&sig2=UcjNgR3jhZWFTJhyILnwkG. (Citato alle p. 15, 17, 18.)

Ciccotti, E. e G. Fontenelle

- 2001 «A review of eel, *Anguilla anguilla*, aquaculture in Europe: Perspectives for its sustainability», *Journal of Taiwan Fisheries Research*, vol. 9, 1-2, p. 27-43, <http://www.tfrin.gov.tw/ct.asp?xItem=251562&ctNode=835&mp=3>. (Citato a p. 17.)

Commission, of the European Community

2003 «Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. Development of a Community Action Plan for the Management of European Eel», *COM (2003)*, vol. 573 Final, 15 pp, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52003DC0573>. (Citato a p. 23.)

2005 «Proposal for a Council Regulation establishing measures for the recovery of the stock of European Eel (Presented by the Commission)», *COM (2005)*, vol. 472 Final, 11 pp. (Citato a p. 24.)

Cottrell, P. E., A. W. Trites e E. H. Miller

1996 «Assessing the use of hard parts in faeces to identify harbour seal prey: results of captive feeding trials», *Canadian Journal of Zoology*, vol. 74, p. 875-880, DOI: [10.1139/z96-101](https://doi.org/10.1139/z96-101). (Citato a p. 9.)

Daemen, E., T. Cross, F. Ollevier e F. A. M. Volckaert

2001 «Analysis of the genetic structure of European eel (*Anguilla anguilla*) using microsatellite DNA and mtDNA markers», *Marine Biology*, vol. 139, 4, p. 755-764, DOI: [10.1007/s002270100616](https://doi.org/10.1007/s002270100616). (Citato a p. 13.)

Dannewitz, J., G. E. Maes, L. Johansson, H. Wickstrom, F. A. M. Volckaert e T. Jarvi

2005 «Panmixia in the European eel: a matter of time», *Proceedings B*, vol. 272, 1568, p. 1129-1137, DOI: [10.1098/rspb.2005.3064](https://doi.org/10.1098/rspb.2005.3064). (Citato alle p. 13, 14.)

Daverat, F., J. Tomas, M. Lahaye, M. Palmer e P. Elie

2005 «Tracking continental habit shifts of eels using Sr/Ca ratios: validation and application to the coastal, estuarine and riverine eels of the Gironde-Garonne-Dordogne watershed», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, p. 619-627, DOI: [10.1071/MF04175](https://doi.org/10.1071/MF04175). (Citato a p. 11.)

Dauidsen, J. G., B. Finstad, F. Okland, E. B. Thorstad, T. A. Mo e A. H. Rikardsen

2011 «Early marine migration of European silver eel *Anguilla anguilla* in northern Norway», *The Journal of Experimental Biology*, vol. 78, 5, p. 1390-1404, DOI: [10.1111/j.1095-8649.2011.02943.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2011.02943.x). (Citato a p. 14.)

De Leo, G. A. e M. Gatto

1996 «Trend in vital rates of the european eel: evidence for density dependence?», *Ecological Applications*, 6 (4 1996), p. 1281-1294, DOI: [dx.doi.org/10.2307/2269607](https://doi.org/10.2307/2269607). (Citato a p. 85.)

Dekker, W.

2000a «A Procrustean assessment of the European eel stock», *Ices Journal of Marine Science*, vol. 57, 4, p. 938-947, DOI: [10.1006/jmsc.2000.0581](https://doi.org/10.1006/jmsc.2000.0581). (Citato a p. 18.)

Dekker, W.

- 2000b «The fractal geometry of the European eel stock», *Ices Journal of Marine Science*, vol. 57, 1, p. 109-121, DOI: [10.1006/jmsc.1999.0562](https://doi.org/10.1006/jmsc.1999.0562). (Citato alle p. 15, 18.)
- 2002 *Monitoring of glass eel recruitment. Report C007/02-WD*, rapp. tecn., Netherlands Institute of Fisheries Research, IJuiden, http://www.rivo.wag-ur.nl/FTP_DIR/Biology_Ecology/Willem/Volume-1.pdf. (Citato a p. 17.)
- 2003a «Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*?», *Fisheries Management and Ecology*, vol. 10, 6, p. 365-376, DOI: [10.1111/j.1365-2400.2003.00352.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2400.2003.00352.x). (Citato alle p. 13, 18.)
- 2003b «On the distribution of the European eel (*Anguilla anguilla*) and its fisheries», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 60, 7, p. 787-799, DOI: [10.1139/F03-066](https://doi.org/10.1139/F03-066). (Citato a p. 13.)
- 2003c «Status of the European eel stock and fisheries», *Eel Biology*, vol. 1, p. 237-254, ISSN: 978-4-431-65909-9, DOI: [10.1007/978-4-431-65907-5_17](https://doi.org/10.1007/978-4-431-65907-5_17), eprint: [978-4-431-65909-9](https://doi.org/978-4-431-65909-9). (Citato a p. 13.)
- 2004 «What caused the decline of the Lake IJsselmeer eel stock after 1960?», *Ices Journal of Marine Science*, vol. 61, 3, p. 394-404, DOI: [10.1016/j.icesjms.2004.01.003](https://doi.org/10.1016/j.icesjms.2004.01.003). (Citato a p. 13.)

Dellinger, T. e F. Trillmich

- 1988 «Estimating diet composition from scat analysis in otariid seals (Otaridae): is it reliable?», *Canadian Journal of Zoology*, vol. 66, p. 1865-1870, DOI: [10.1139/z88-269](https://doi.org/10.1139/z88-269). (Citato a p. 9.)

Desaunay, Y. e D. Guerault

- 1997 «Seasonal and long-term changes in biometrics of eel larvae: a possible relationship between recruitment variation and North Atlantic ecosystem productivity», *The Journal of Experimental Biology*, vol. 51, p. 317-339, DOI: [10.1111/j.1095-8649.1997.tb06106.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1997.tb06106.x). (Citato a p. 14.)

Dolloff, C. A.

- 1993 «Predation by river otters (*Lutra canadensis*) on juveniles coho salmon (*Onchorhynchus kisutch*) and Dolly Varden (*Salvelinus malma*) in southeast Alaska», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 50, p. 312-315, DOI: [10.1139/f93-036](https://doi.org/10.1139/f93-036). (Citato a p. 9.)

Donohoe, C.J. e C.E. Zimmerman

- 2010 «A method of mounting multiple otoliths for beam-based microchemical analyses», *Environ. Biol. Fish.*, 89, p. 473-477, DOI: [10.1007/s10641-010-9680-3](https://doi.org/10.1007/s10641-010-9680-3). (Citato a p. 86.)

- Dorval, E., C. M. Jones, R. Hannigan e J. van Montfrans
2005 «Can otolith chemistry be used for identifying essential seagrass habits for juveniles spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus* in Cheasepeake Bay?», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, 56, p. 645-653, DOI: [dx.doi.org/10.1071/MF04179](https://doi.org/10.1071/MF04179). (Citato a p. 11.)
- Dray, S. e A. B. Dufour
2007 «The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists», *Journal of Statistical Software*, vol. 22, 4, p. 1-20, ISSN: 1548-7660, <http://www.jstatsoft.org/v22/i04>. (Citato a p. 46.)
- Elder, K. L., G. A. Jones e G. Bolz
1996 «Distribution of otoliths in surficial sediments of the U.S. Atlantic continental shelf and slope and potential for reconstructing Holocene fish stocks», *Paleoceanography*, vol. 11, p. 359-367, DOI: [10.1029/96PA00042](https://doi.org/10.1029/96PA00042). (Citato a p. 9.)
- Elsdon, T. S. e B. M. Gillanders
2005 «Consistency of patterns between laboratory experiments and field collected fish in otolith chemistry: an example and application for salinity reconstructions», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, p. 609-617, DOI: [10.1071/mf04146](https://doi.org/10.1071/mf04146). (Citato a p. 10.)
- Feunteun, E.
2002 «Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain», *Ecological Engineering*, vol. 18, p. 575-591, DOI: [10.1016/S0925-8574\(02\)00021-6](https://doi.org/10.1016/S0925-8574(02)00021-6). (Citato alle p. 17, 18, 22.)
- Fossum, P., J. Kalish e E. Moksness
2000 «Recent Development in Fish Otolith Research», *Fisheries Research*, vol. 46, 1-3, p. 1-373, ISSN: 0165-7836, DOI: [10.1016/S0165-7836\(00\)00126-0](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(00)00126-0). (Citato a p. 4.)
- Fowler, A. J., S. E. Campana, C. M. Jones e S. R. Thorrold
1995 «Experimental assessment of the effect of temperature and salinity on elemental composition of otoliths using solution-based», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 52, p. 1421-1430, DOI: [10.1139/f95-137](https://doi.org/10.1139/f95-137). (Citato a p. 11.)
- Fowler A. J. Gillanders, B. M. e K. C. Hall
2005 «Relationships between elemental concentration and age from otoliths of adult snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae): implications for movement and stock structure», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, p. 661-676, DOI: [10.1071/MF04157](https://doi.org/10.1071/MF04157). (Citato a p. 11.)
- Friedland, K. D., M. J. Miller e B. Knights
2007 «Oceanic changes in the Sargasso Sea and declines in recruitment of the European eel», *Ices Journal of Marine Science*, vol. 64, 3, p. 519-530, DOI: [10.1093/icesjms/fsm022](https://doi.org/10.1093/icesjms/fsm022). (Citato a p. 19.)

Frost, Winifred E.

- 1945 «The Age and Growth of Eels (*Anguilla anguilla*) from the Windermere Catchment Area», *Journal of Animal Ecology*, vol. 14, 1, pp.26-36, ISSN: 00218790. (Citato a p. 86.)

Gaemers, P. A. M.

- 1984 «Fish otoliths from the Bassevelde sand (Late Tongrian) of Ruisbroek, Belgium, and the stratigraphy of the early Oligocene of Belgium», *Mededelingen van der Werkgroep vor Tertiaire en Kwartaire Geologie*, vol. 21, 21, p. 13-57. (Citato a p. 10.)

Geffroy, B., A. Fostier e A. Bardonnnet

- 2013 «New insights regarding gonad development in European eel: evidence for a direct ovarian differentiation», *Fish Physiol Biochem*, 39, p. 1129-1140, DOI: [10.1007/s10695-013-9769-7](https://doi.org/10.1007/s10695-013-9769-7). (Citato a p. 86.)

Geffroy, B., A. Fostier, Y. Guiguen e A. Bardonnnet

- 2012 «Unusual Cases of Adult Intersexuality in the European Eel *Anguilla anguilla*», *Sexual development*, 6, p. 316-319, DOI: [10.1159/000343781](https://doi.org/10.1159/000343781). (Citato a p. 86.)

Gillanders, B. M. e T. C. Joyce

- 2005 «Distinguishing aquaculture and wild yellow kingfish via natural elemental signatures in otoliths», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, p. 693-704, DOI: [dx.doi.org/10.1071/MF04133](https://doi.org/10.1071/MF04133). (Citato a p. 11.)

Grassi, G. B.

- 1896 «The Reproduction and Metamorphosis of the Common Eel (*Anguilla vulgaris*)», *Proceedings of the Royal Society of London*, vol. 60, pp.260-271, ISSN: 03701662. (Citato a p. 14.)

Hales, Jr. L. S. e E. J. Reits

- 1992 «Historical changes in age and growth of Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus* (Perciformes: Sciaenidae)», *Journal of Archaeological Science*, vol. 19, p. 73-99, DOI: [10.1016/0305-4403\(92\)90008-Q](https://doi.org/10.1016/0305-4403(92)90008-Q). (Citato a p. 10.)

Hobbs, J. A., Q. Z. Yin, J. Burton e W. A. Bennett

- 2005 «Retrospective determination of natal habits for an estuarine fish with otolith strontium isotope ratios», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, p. 655-660, DOI: [dx.doi.org/10.1071/MF04136](https://doi.org/10.1071/MF04136). (Citato a p. 11.)

Holmgren, K. e H. wickstrom

- 2012 «Note on otolith growth in elvers, *Anguilla anguilla* (L.), and the relative otolith size during somatic growth», *Arch. Pol. Fish.*, 20, p. 207-214, DOI: [10.2478/v10086-012-0026-y](https://doi.org/10.2478/v10086-012-0026-y). (Citato a p. 85.)

Holmgren, K., H. Wickstrom e P. Clevestam

- 1997 «Sex-related growth of European eel, *Anguilla anguilla*, with focus on median silver eel age», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 54, 12, p. 2775-2781, DOI: [10.1139/f97-193](https://doi.org/10.1139/f97-193). (Citato a p. 85.)

Hunt, J. J.

- 1992 «Morphological characteristics of otoliths for selected fish in the Northwest Atlantic», *Journal of Northwest Atlantic Fishery Science*, vol. 13, p. 63-75, <http://journal.nafo.int/J13/hunt.pdf>. (Citato a p. 7.)

ICES

- 2001 *Report of the ICES/EIFAAC Working Group on Eel*, rapp. tecn., ICES CM 2001/ACFM:03. (Citato a p. 24.)
- 2002 *Report of the ICES/EIFAAC Working Group on Eel*, rapp. tecn., ICES CM 2002/ACFM:03. (Citato alle p. 23, 24.)
- 2004 *Report of the ICES/EIFAAC Working Group on Eel*, rapp. tecn., ICES CM 2004/ACFM:09. (Citato a p. 24.)
- 2006 *Report of the ICES/EIFAAC Working Group on Eel*, rapp. tecn., ICES CM 2006/ACFM:16, ISRN: 0258-6096. (Citato a p. 24.)
- 2011 *Report of the Workshop on Age Reading of European and American Eel (WKAREA2). 22-24 March 2011*, rapp. tecn. 2011/ACOM:43, ICES, 35 p., ISRN: 2221-6650, Bordeaux, France. (Citato a p. 85.)
- 2014 *Report of the Joint EIFAAC/ICES/GFCM Working Group on Eel, 3-7 November 2014, Rome, Italy*, rapp. tecn. 18, ICES CM 2014/ACOM, p. 203, http://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Expert%20Group%20Report/acom/2014/WGEEL/wgeel_2014.pdf. (Citato alle p. 13, 17-20, 22.)

Ihssen, P. E., H. E. Booke, J. M. Casselman, J. M. McGlade, N. R. Payne e F. M. Utter

- 1981 «Stock identification: material and methods», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 38, p. 1838-1855, DOI: [10.1139/f81-230](https://doi.org/10.1139/f81-230). (Citato a p. 11.)

Ivany, L. C., W. P. Patterson e K. C. Lohmann

- 2000 «Cooler winter as a possible cause of mass extinctions at the Eocene-Oligocene boundary», *Nature*, vol. 407, p. 887-890, DOI: [10.1038/35038044](https://doi.org/10.1038/35038044). (Citato a p. 10.)

Jobling, M. e A. Breiby

- 1986 «The use and abuse of fish otoliths in studies of feeding habits of marine piscivores», *Sarsia*, vol. 71, p. 265-274, DOI: [10.1080/00364827.1986.10419696](https://doi.org/10.1080/00364827.1986.10419696). (Citato a p. 9.)

- Kennedy, B. D., C. L. Folt, J. D. Blum e C. P. Chamberlain
 1997 «Natural isotope markers in salmon», *Nature*, vol. 387, p. 766-767, DOI: [10.1038/42835](https://doi.org/10.1038/42835). (Citato a p. 11.)
- Kerr, L. A. e S. E. Campana
 2014 «Chemical Composition of Fish Hard Parts as a Natural Marker of Fish Stocks», in *Stock Identification Methods (Second Edition)*, a cura di S.X. Cadrin, L.A. Kerr e S. Mariani, Second Edition, Academic Press, San Diego, cap. 11, p. 205-234, ISBN: 978-0-12-397003-9, DOI: [10.1016/B978-0-12-397003-9.00011-4](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397003-9.00011-4), <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123970039000114>. (Citato a p. 11.)
- Kettle, A. J. e K. Haines
 2006 «How does the European eel (*Anguilla anguilla*) retain its population structure during its larval migration across the North Atlantic Ocean?», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 63, 1, p. 90-106, DOI: [10.1139/F05-198](https://doi.org/10.1139/F05-198). (Citato a p. 14.)
- Knights, B.
 2003 «A review of the possible impact of long-term oceanic and climate changes and fishing mortality on recruitment of anguillid eels of the Northern Hemisphere», *The science of the Total Environment*, vol. 310, p. 237-244, DOI: [10.1016/S0048-9697\(02\)00644-7](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00644-7). (Citato a p. 19.)
- Kuhl, F. P. e C. R. Giardina
 1982 «Elliptic Fourier features of a closed contour», *Computer Graphics and Image Processing*, vol. 18, 3, p. 236-258, ISSN: 0146-664X, DOI: [10.1016/0146-664X\(82\)90034-X](https://doi.org/10.1016/0146-664X(82)90034-X). (Citato alle p. 12, 45.)
- Kuroki, M., M. Kawai, B. Jonsson, J. Aoyama, M. J. Miller, D. L. G. Noakes e K. Tsukamoto
 2008 «Inshore migration and otolith microstructure/microchemistry of anguillid glass eels recruited to Iceland», *Environmental Biology of Fishes*, vol. 83, 3, p. 309-325, DOI: [10.1007/s10641-008-9341-y](https://doi.org/10.1007/s10641-008-9341-y). (Citato a p. 14.)
- Lecomte-Finiger, R.
 1992 «Growth History and Age At Recruitment of European Glass Eels (*Anguilla anguilla*) As Revealed By Otolith Microstructure», *Marine Biology*, vol. 114, 2, p. 205-210, DOI: [10.1007/BF00349520](https://doi.org/10.1007/BF00349520). (Citato alle p. 14, 87.)
- Lecomte-Finiger, R. e A. Yahyaoui
 1989 «Otolith Microstructure Analysis In the Study of the Early Life-history of the European Eel *Anguilla anguilla*», *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie*, vol. 308, 1, p. 1-7. (Citato a p. 87.)

- 1990 «Otolith Microstructure Analysis In the Knowledge of the Early Life-history of the European Eel, *Anguilla anguilla*», *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie*, vol. 75, 6, p. 861-861, DOI: [10.1002/iroh.19900750631](https://doi.org/10.1002/iroh.19900750631). (Citato a p. 87.)
- Lestrel, P. E.
2008 *Fourier descriptors and their Application in biology*, a cura di P. E. Lestrel, Cambridge University Press, UK, 484 p., ISBN: 9780521055734. (Citato a p. 12.)
- Lin, Y. J., L. Lozys, J. C. Shiao, Y. Iizuka e W. N. Tzeng
2007 «Growth differences between naturally recruited and stocked European eel *Anguilla anguilla* from different habitats in Lithuania», *The Journal of Experimental Biology*, vol. 71, 6, p. 1773-1787, DOI: [10.1111/j.1095-8649.2007.01642.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01642.x). (Citato a p. 85.)
- Lintas, C., J. Hirano e S. Archer
1998 «Genetic variation of the European eel (*Anguilla anguilla*)», *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, vol. 7, 4, p. 263-269. (Citato a p. 13.)
- Lowe, Rosemary H.
1952 «The Influence of Light and Other Factors on the Seaward Migration of the Silver Eel (*Anguilla anguilla* L.)» *Journal of Animal Ecology*, vol. 21, 2, pp.275-309, ISSN: 00218790. (Citato a p. 14.)
- Maisey, J. G.
1987 «Notes on the structure and phylogeny of vertebrate otoliths», *Copeia*, vol. 2, p. 495-499. (Citato alle p. 4, 7.)
- Marohn, L., V. Hilge, K. Zumholz, A. Kluegel, H. Anders e R. Hanel
2011 «Temperature dependency of element incorporation into European eel (*Anguilla anguilla*) otoliths», *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 399, 6, p. 2175-2184, DOI: [10.1007/s00216-010-4412-2](https://doi.org/10.1007/s00216-010-4412-2). (Citato a p. 11.)
- Marohn, L., E. Prigge, K. Zumholz, A. Klugel, H. Anders e R. Hanel
2009 «Dietary effects on multi-element composition of European eel (*Anguilla anguilla*) otoliths», *Marine Biology*, vol. 156, 5, p. 927-933, DOI: [10.1007/s00227-009-1138-9](https://doi.org/10.1007/s00227-009-1138-9). (Citato a p. 11.)
- Martin, J., F. Daverat, C. Pecheyran, T. D. Als, E. Feunteun e E. Reveillac
2010 «An otolith microchemistry study of possible relationships between the origins of leptocephali of European eels in the Sargasso Sea and the continental destinations and relative migration success of glass eels», *Ecology of Freshwater Fish*, vol. 19, 4, p. 627-637, DOI: [10.1111/j.1600-0633.2010.00444.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0633.2010.00444.x). (Citato a p. 88.)

- McCleave, J. D.
2008 «Contrasts between spawning times of *Anguilla* species estimated from larval sampling at sea and from otolith analysis of recruiting glass eels», *Marine Biology*, vol. 155, 3, p. 249-262, DOI: [10.1007/s00227-008-1026-8](https://doi.org/10.1007/s00227-008-1026-8). (Citato alle p. 87, 88.)
- McCleave, J. D. e G. S. Wippelhauser
1982 «Behavioural aspects of selective tidal stream transport in juvenile American eels», *American Fisheries Society Symposium Series*, vol. 1, p. 138-150. (Citato a p. 14.)
- McCulloch, M., M. Cappelletti, J. Aumend e W. Muller
2005 «Tracking the life history of individual barramundi using laser ablation MC-ICP-MS Sr-isotopic and Sr/Ba ratios in otoliths», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, p. 637-644, DOI: [dx.doi.org/10.1071/MF04184](https://doi.org/10.1071/MF04184). (Citato a p. 11.)
- Melia, P., D. Bevacqua, A. J. Crivelli, G. A. De Leo, J. Panfili e M. Gatto
2006 «Age and growth of *Anguilla anguilla* in the Camargue lagoons», *The Journal of Experimental Biology*, vol. 68, 3, p. 876-890, DOI: [10.1111/j.1095-8649.2006.00975.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.00975.x). (Citato a p. 85.)
- Melia, P., A. J. Crivelli, C. Durif, R. Poole e D. Bevacqua
2014 «A simplified method to estimate body growth parameters of the European eel *Anguilla anguilla*», *Journal of Fish Biology*, 85, p. 978-984, DOI: [10.1111/jfb.12486](https://doi.org/10.1111/jfb.12486). (Citato a p. 85.)
- Morales-Nin, B., J. D. M. Swan S. C. and Gordon, M. Palmer, A. J. Geffen, T. Shimmiwld e T. Sawyer
2005 «Age-related trends in otoliths chemistry of *Merlucciu merluccius* from the north-eastern Atlantic ocean and the western Mediterranean Sea», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, p. 599-607, DOI: [10.1071/MF04151](https://doi.org/10.1071/MF04151). (Citato a p. 10.)
- Mordenti, O., A. Di Biase, G. Bastone, R. Sirri, A. Zaccaroni e A. Parmeggiani
2013 «Controlled reproduction in the wild European eel (*Anguilla anguilla*): two populations compared», *Aquaculture International*, 21, p. 1045-1063, DOI: [10.1007/s10499-012-9611-8](https://doi.org/10.1007/s10499-012-9611-8). (Citato a p. 87.)
- Mordenti, O., A. Di Biase, R. Sirri, S. Modugno e A. Tasselli
2012 «Induction of Sexual Maturation in Wild Female European Eels (*Anguilla anguilla*) in Darkness and Light», *The Israeli Journal of Aquaculture (IJA-64.2012.726 2012)*, p. 9, DOI: [IJA_64.2012.726](https://doi.org/10.1007/s10499-012-9611-8), <http://hdl.handle.net/10524/23179>. (Citato a p. 87.)
- Moriarty, C.
1996 «The European eel fishery in 1993 and 1994. first report of a working group funded by the European Union Concerted Action AIR A94-1939», *Fisheries Bulletin*, vol. 14, 52 pp, ISSN: 0332-4338. (Citato a p. 18.)

Moriarty, C. e W. Dekker

1997 «Management of European eel fisheries», *Fisheries Bulletin (Dublin)*, vol. 15, p. 77-90. (Citato alle p. 17, 18.)

Mugiya, Y.

1972 «On aberrant sagittas of teleostean fishes», *Japanese Journal of Ichthyology*, vol. 19, p. 11-14, DOI: [dx.doi.org/10.11369/jji1950.19.11](https://doi.org/10.11369/jji1950.19.11). (Citato a p. 6.)

Murie, D. J. e D. M. Lavigne

1985 «Interpreting of otoliths in stomach content analyses of phocid seals: quantifying fish consumption», *Canadian Journal of Zoology*, vol. 64, p. 1152-1157, DOI: [10.1139/z86-174](https://doi.org/10.1139/z86-174). (Citato a p. 9.)

Niva, T., P. Keranen, J. Raitaniemi e H. M. Berger

2005 «Improved interpretation of labelled fish otoliths: cost-effective tool in sustainable fisheries management», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, p. 705-711, DOI: [10.1071/MF04143](https://doi.org/10.1071/MF04143). (Citato a p. 11.)

Nolf, D.

1985 «Otolithi piscium», in *Handbook of Paleoichthyology*, a cura di H. P. Schultze, Gustav Fisher Verlag, vol. 10, cap. Otolithi Piscium, ISBN: 3899370392. (Citato a p. 6.)

1995 «Studies on fossil otoliths-the state of the art», in *Recent development in fish otolith research*, a cura di D. H. Secor, J. M. Dean e S. E. Campana, SC, University of South Carolina Presso, cap. Studies on fossil otoliths-the state of the art, p. 513-544, DOI: [10.2307/1352534](https://doi.org/10.2307/1352534). (Citato a p. 10.)

Oliveira, A. M., M. Farina, I. P. Ludka e B. Kachar

1996 «Vaterite, calcite and aragonite in the otoliths of three species of piranha», *Naturwissenschaften*, vol. 83, p. 133-135, DOI: [10.1007/BF01142180](https://doi.org/10.1007/BF01142180). (Citato alle p. 4, 6.)

Palm, S., J. Dannewitz, T. Prestegaard e H. Wickstrom

2009 «Panmixia in European eel revisited: no genetic difference between maturing adults from southern and northern Europe», *Heredity*, vol. 103, 1, p. 82-89, DOI: [10.1038/hdy.2009.51](https://doi.org/10.1038/hdy.2009.51). (Citato alle p. 13, 14.)

Palstra, A. P., Ma Angeles Guerrero, Gerard de Laak, Jan P. G. Klein Breteler e Guido E. E. J. M. van den Thillart

2011 «Temporal progression in migratory status and sexual maturation in European silver eels during downstream migration», *Fish Physiology and Biochemistry*, vol. 37, 2, p. 285-296, DOI: [10.1007/s10695-011-9496-x](https://doi.org/10.1007/s10695-011-9496-x). (Citato a p. 14.)

Palstra, A. P., J. T. Van Ginneken, A. J. Murk e J. M. Van Den Thillart

2005 «Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama?», *Naturwissenschaften*, vol. 93, 3, p. 145-8, DOI: [10.1007/s00114-005-0080-z](https://doi.org/10.1007/s00114-005-0080-z). (Citato a p. 22.)

- Panfili, J., A. M. Darnaude, Y. J. Lin, M. Chevalley, Y. Iizuka, W. N. Tzeng e A. J. Crivelli
 2012 «Habitat residence during continental life of the European eel *Anguilla anguilla* investigated using linear discriminant analysis applied to otolith Sr:Ca ratios», *Aquatic Biology*, vol. 15, 2, p. 175-185, DOI: [10.3354/ab00414](https://doi.org/10.3354/ab00414). (Citato a p. 89.)
- Pannella, G.
 1971 «Fish otoliths: daily growth layers and periodical pattern», *Science*, 173, p. 1124-1127, DOI: [10.1126/science.173.4002.1124](https://doi.org/10.1126/science.173.4002.1124). (Citato a p. 12.)
- Pierce, G. J., P. R. Boyle e J. S. W Diack
 1991 «Identification of fish otoliths and bones in faeces and digestive tracts of seals», *Journal of Zoology*, vol. 224, p. 320-328, DOI: [10.1111/j.1469-7998.1991.tb04810.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1991.tb04810.x). (Citato a p. 9.)
- Popper, A. N. e Z. Lu
 2000 «Structure–function relationships in fish otolith organs», *Fisheries Research*, vol. 46, 1–3, p. 15-25, ISSN: 0165-7836, DOI: [10.1016/S0165-7836\(00\)00129-6](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(00)00129-6). (Citato alle p. 3, 4.)
- Popper, A. N. e C. Platt
 1993 «Physiology of fishes», in *Physiology of fishes*, a cura di E.H. Evans, CRC Press, London, UK, cap. Inner ear and lateral line, p. 99-136. (Citato a p. 4.)
- Psuty, I. e B. Draganik
 2008 «The Effectiveness of Glass Eel Stocking In the Vistula Lagoon, Poland», *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, vol. 38, 2, p. 103-111, DOI: [10.3750/AIP2008.38.2.04](https://doi.org/10.3750/AIP2008.38.2.04). (Citato a p. 85.)
- Pujolar, J. M., G. A. De Leo, E. Ciccotti e L. Zane
 2009 «Genetic composition of Atlantic and Mediterranean recruits of European eel *Anguilla anguilla* based on EST-linked microsatellite loci», *The Journal of Experimental Biology*, vol. 74, 9, p. 2034-2046, DOI: [10.1111/j.1095-8649.2009.02267.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2009.02267.x). (Citato a p. 13.)
- Pujolar, J. M., G. E. Maes, C. Vancoillie e F. A. M. Volckaert
 2005 «Growth rate correlates to individual heterozygosity in the European eel, *Anguilla anguilla* L.» *Evolution*, vol. 59, 1, p. 189-199, DOI: [10.1111/j.0014-3820.2005.tb00905.x](https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2005.tb00905.x). (Citato a p. 85.)
- R Core Team
 2014 *R: A Language and Environment for Statistical Computing*, a cura di R Core Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN: 3-900051-07-0. (Citato a p. 45.)

Ricker, W.E.

- 1981 «Changes in the Average Size and Average Age of Pacific Salmon», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 38, 12, p. 1636-1656, DOI: [10.1139/f81-213](https://doi.org/10.1139/f81-213). (Citato a p. 1.)

Schmidt, J.

- 1922 «The breeding places of the eel», *Philosophical Transactions Royal society*, vol. 211, p. 179-208. (Citato alle p. [13](#), [15](#).)

Secor, D. H., J. M. Dean e S. E. Campana

- 1995 *Recent developments in fish otolith research*, University of South Carolina Press, ISBN: 9781570030116. (Citato a p. 4.)

Shiao, J. C., L. Lozys, Y. Iizuka e W. N. Tzeng

- 2006 «Migratory patterns and contribution of stocking to the population of European eel in Lithuanian waters as indicated by otolith Sr : Ca ratios», *The Journal of Experimental Biology*, vol. 69, 3, p. 749-769, DOI: [10.1111/j.1095-8649.2006.01147.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2006.01147.x). (Citato a p. 85.)

Simon, J.

- 2007 «Age, growth, and condition of European eel (*Anguilla anguilla*) from six lakes in the River Havel system (Germany)», *Ices Journal of Marine Science*, vol. 64, 7, p. 1414-1422, DOI: [10.1093/icesjms/fsm093](https://doi.org/10.1093/icesjms/fsm093). (Citato a p. 85.)

Smale, M. J., G. Watson e T. Hecht

- 1995 *Otolith atlas of southern African marine fishes*, a cura di J.L.B., Ichthyological monographs, Smith institute of Ichthyology, vol. 1, ISBN: 0868102946. (Citato a p. 6.)

Stevenson, D. K. e S. E. Campana

- 1992 «Otolith microstructure examination and analysis», *Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 117, 117, a cura di D. K. Stevenson e S. E. Campana, 126 p. ISSN: 0706-6481. (Citato alle p. [12](#), [87](#).)

Stransky, C., C. D. Garbe-Schonberg e D. Gunther

- 2005 «Geographic variation and juveniles migration in Atlantic redfish inferred from otolith microchemistry», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, p. 677-691, DOI: [dx.doi.org/10.1071/MF04153](https://doi.org/10.1071/MF04153). (Citato a p. 11.)

Summerfelt, R. C. e G. E. Hall

- 1987 *Age and growth of fish*, a cura di R. C. Summerfelt e G. E. Hall, IA, Iowa State University Press, Ames, 544p. ISBN: 0813807336. (Citato a p. 4.)

- Szekely, C., K. Molnar, T. Muller, A. Szabo, R. Romvari, C. Hancz e M. Bercsenyi
 2003 «Comparative study of X-ray computed tomography and conventional X-ray methods in the diagnosis of swimbladder infection of eel caused by *Anguillicola crassus*», *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 58, 2-3, p. 157-164, DOI: [10.3354/dao058157](https://doi.org/10.3354/dao058157). (Citato a p. 22.)
- Szekely, C., K. Molnar e O. Racz
 2004 «Radiodiagnostic method for study the dynamics of *Anguillicola crassus* (Nematoda: Dracunculoidea) infection and pathological status of the swimbladder in Lake Balaton eels», *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 64, 1, p. 723-732, DOI: [10.3354/dao064053](https://doi.org/10.3354/dao064053). (Citato a p. 22.)
- Tesch, F. W.
 2003 *The eel book*, a cura di J. E. Thorpe, Blackwell Science, 408 p., ISBN: 978-0-632-06389-5. (Citato alle p. 14, 86.)
- Thorrold, S. R., S. E. Campana, C. M. Jones e P. K. Swart
 1997 «Factors determining delta ^{13}C and delta ^{18}O fractionation in aragonitic otoliths of marine fish», *Geochimica Cosmochimica Acta*, vol. 61, p. 2909-2919, DOI: [10.1016/S0016-7037\(97\)00141-5](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(97)00141-5). (Citato a p. 11.)
- Tollit, D.J., M.J. Steward, P.M. Thompson, G.J. Pierce, M.B. Santos e S. Hughes
 1997 «Species and size differences in the digestion of otoliths and beaks: implications for estimates of pinniped diet composition», *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, vol. 54, p. 105-119, DOI: [10.1139/f96-264](https://doi.org/10.1139/f96-264). (Citato a p. 9.)
- Torres, G. J., A. Lombarte e B. Morales-Nin
 2000 «Sagitta otolith size and shape variability to identify geographic intraspecific difference in three species of the genus *Merluccius*», *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, DOI: [dx.doi.org/10.1017/S0025315499001915](https://doi.org/10.1017/S0025315499001915). (Citato a p. 12.)
- Tzeng, W. N., H. R. Lin, C. H. Wang e S. N. Xu
 2000 «Differences in size and growth rates of male and female migrating Japanese eels in Pearl River, China», *The Journal of Experimental Biology*, vol. 57, 5, p. 1245-1253. (Citato a p. 89.)
- Tzeng, W. N., K. P. Severin, C. H. Wang e H. Wickstrom
 2005 «Elemental composition of otoliths as a discriminator of life stage and growth habitat of the European eel, *Anguilla anguilla*», *Marine & Freshwater Research*, vol. 56, 5, p. 629-635, DOI: [10.1071/MF04167](https://doi.org/10.1071/MF04167). (Citato alle p. 11, 89.)

- Tzeng, W. N., K. P. Severin e H. Wickstrom
1997 «Use of otolith microchemistry to investigate the environmental history of European eel *Anguilla anguilla*», *Marine Ecology Progress Series*, vol. 149, 1-3, p. 73-81, DOI: [10.3354/meps149073](https://doi.org/10.3354/meps149073). (Citato a p. 89.)
- Tzeng, W. N., K. P. Severin, H. Wickstrom e C. H. Wang
1999 «Strontium bands in relation to age marks in otoliths of European eel *Anguilla anguilla*», *Zoological Studies*, vol. 38, 4, p. 452-457. (Citato a p. 89.)
- Van Achterbergh, E., C.G. Ryan, S.E. Jackson e W.L. Griffin
2001 «Data reduction software for LA-ICP-MS. In: Laser-Ablation-ICPMS in the Earth Sciences», in *Laser-Ablation-ICPMS in the Earth Sciences*, a cura di P. Sylvester, Mineralogical Association of Canada, Ottawa, p. 239-243, ISBN: 0921294492. (Citato a p. 43.)
- Van Neer, W., S. Augustynen e T. Linkowski
1993 «Daily growth increments on fish otoliths as seaseasonal indicator on archeological sites: the tilapia from late palaeolithic Makhadama in Egypt», *International Journal of Osteoarchaeology*, vol. 3, 3 (4 1993), p. 241-248, DOI: [10.1002/oa.1390030403](https://doi.org/10.1002/oa.1390030403). (Citato a p. 10.)
- Van Ginneken, J. T. e G. E. Maes
2005 «The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review», *Reviews In Fish Biology and Fisheries*, vol. 15, 4, p. 367-398, DOI: [10.1007/s11160-006-0005-8](https://doi.org/10.1007/s11160-006-0005-8). (Citato a p. 14.)
- Vollestad, L. A. e B. Jonsson
1988 «A 13-Year Study of the Population Dynamics and Growth of the European Eel *Anguilla anguilla* in a Norwegian River: Evidence for Density-Dependent Mortality, and Development of a Model for Predicting Yield», *Journal of Animal Ecology*, vol. 57, 3, pp.983-997, ISSN: 00218790. (Citato a p. 85.)
- Wang, C. H. e W. N. Tzeng
2000 «The timing of metamorphosis and growth rates of American and European eel leptocephali: A mechanism of larval segregative migration», *Fisheries Research*, vol. 46, 1-3, p. 191-205, DOI: [10.1016/S0165-7836\(00\)00146-6](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(00)00146-6). (Citato alle p. 14, 87.)
- Waples, R.S. e O. Gaggiotti
2006 «What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity», *Molecular Ecology*, 15 (1419-1439 2006), DOI: [doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.02890.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02890.x). (Citato a p. 1.)

Westin, L.

- 1998 «The spawning migration of European silver eel (*Anguilla anguilla* L.) with particular reference to stocked eel in the Baltic», *Fisheries Research*, vol. 38, 3, p. 257-270, DOI: [10.1016/S0165-7836\(98\)00162-3](https://doi.org/10.1016/S0165-7836(98)00162-3). (Citato a p. 14.)

Wickham, H.

- 2009 *ggplot2: elegant graphics for data analysis*, Springer New York, ISBN: 978-0-387-98140-6. (Citato a p. 46.)

Wickham, H. e R. Francois

- 2015 *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*, a cura di H. Wickham e R. Francois, R package version 0.4.1, <http://CRAN.R-project.org/package=dplyr>. (Citato a p. 46.)

Wirth, T. e L. Bernatchez

- 2001 «Genetic evidence against panmixia in the European eel», *Nature*, vol. 409, 6823, p. 1037-1040, DOI: [10.1038/35059079](https://doi.org/10.1038/35059079). (Citato alle p. 13, 14.)