

Report Short Term Mobility (STM)

Rosalia Ferreri

Applicazione di metodi di analisi di immagine per la determinazione della fecondità in specie ittiche pelagiche.

INTRODUZIONE

Il mio tirocinio, finanziato dal progetto “Short Mobility Term” del CNR per l’anno 2013, si è svolto dal 26/09/2013 al 16/10/2013 presso la Scuola di Biologia, dell’università Aristotele di Salonicco, con la supervisione del Prof. K. Gantias.

L’obiettivo del mio stage era quello di apprendere il metodo *whole mount*, una tecnica di analisi di immagine, che risulta più economica e di più facile applicazione delle consuete analisi istologiche, nonché più accurata, per la determinazione della fecondità. La fecondità rappresenta il numero di uova che verranno deposte durante una stagione riproduttiva. Essa è il fattore principale per le stime quantitative di uova e larve e la stima della biomassa dello stock riproduttore, attraverso applicazione di metodi diretti, quali il metodo di produzione giornaliera delle uova (DEPM; Parker, 1980). Per calcolare la biomassa riproduttrice, è necessario per prima cosa calcolare la fecondità specifica, determinando il numero di uova deposto per femmina adulta in un anno. Questo parametro, inoltre, risulta fondamentale per lo studio del potenziale riproduttivo, elementi chiave per una gestione sostenibile di specie ittiche di interesse commerciale. La fecondità si utilizza anche per stimare la sopravvivenza, per determinare il numero di individui necessari per mantenere uno stock a livello sostenibile e come criterio per identificare stock unitari. Per questi fini, oltre alla stima della fecondità, è necessaria anche una serie di altre informazioni che risultano associate allo sviluppo degli ovociti, per esempio il diametro delle uova e la relativa distribuzione di frequenza, il tasso di riproduzione, sia che le specie siano o meno deposizione multipla (Witthames et al., 2009). Generalmente il metodo più utilizzato per la stima della fecondità è il “metodo degli ovociti idratati” (Hunter et al., 1985). Tuttavia l’applicazione di tale metodo risulta il più delle volte affetta da limitazioni legate alla scarsità di femmine idratate che vengono catturate, sia per l’effimera durata di questa particolare fase riproduttiva, sia per via del comportamento segregativo tipico delle femmine che stanno per deporre (Macewicz et al., 1996; Gantias et al., 2004; Gantias 2008). Da qui la necessità di applicare metodi di analisi che permettano di stimare la fecondità a partire da ovociti maturi ma non idratati, molto più facili da campionare e anche in numero maggiore, in modo anche da rendere le stime più accurate. Tra questi, il metodo *whole mount* ovvero un metodo di conteggio semi-automatico delle particelle, che consiste nel conteggio del numero di uova (particelle) in una porzione di peso noto tessuto ovarico (Witthames et al., 2009).

MATERIALI E METODI

Campioni di adulti di acciuga (*Engraulis encrasioclus*) sono stati raccolti durante echosurvey, organizzati dall’IAMC-CNR UOS di Capo Granitola e mirati al monitoraggio delle popolazioni di piccoli pelagici nel Canale di Sicilia. Gli esemplari sono stati misurati (lunghezza totale, 1 mm) e ne sono stati rilevati il peso totale e somatico (0.01 g). Da ciascuna femmina adulta della specie bersaglio venivano estratte le gonadi, che venivano fissate in formalina tamponata al 4% per le successive analisi di laboratorio.

Analogamente, ovari di femmine adulte di sardina (*Sardina pilchardus*) erano stati campionati dall'equipe del Prof. Ganius nelle acque del mare Egeo e con il medesimo protocollo, ma conservate in acqua distillata.

Primo esperimento.

L'obiettivo del primo esperimento condotto è stato quello di identificare il peso ideale di subcampione da analizzare, in relazione al valore di indice gonadosomatico dell'esemplare e per un'accuratezza maggiore possibile.

L'indice gonadosomatico (GSI) è determinato dal rapporto in % tra peso dell'ovario e peso totale del pesce:

$$GSI = (GW/SW) * 100$$

Dove: GW è il peso della gonade e SW il peso somatico dell'individuo.

Quattro esemplari di sardina e quattro di acciuga sono stati selezionati in base al valore di GSI, in modo da avere un esemplare con GSI basso ($GSI \approx 3$) che indica l'inizio della vitellogenesi e quindi del processo di maturazione; due individui sono stati selezionati con valori intermedi di GSI ($4 < GSI < 5$), corrispondenti a pesci che hanno già completato il processo di maturazione sessuale; infine un quarto individuo per specie è stato scelto per valori alti di GSI (5+), propri di femmine idratate, pronte per deporre.

Presso il laboratorio di ittiologia dell'università di Salonicco, le gonadi sono state pesate (0.001 gr) e da ciascun ovario sono state prelevate tre porzioni di peso noto: la porzione più piccola aveva un peso compreso tra 0.015 e 0.020 gr, mentre la più grande pesava circa 0.050gr.

I subcampioni vengono posti in piccole capsule di Petri con acqua distillata, per evitare la disidratazione dell'ovocita. Una piccola ancoretta magnetica è posizionata all'interno della soluzione e la soluzione viene sottoposta ad agitazione moderata (a temperatura ambiente) per circa 10 minuti. Successivamente, i subcampioni sono esaminati usando uno stereomicroscopio ed eventualmente sottoposti nuovamente ad agitazione per qualche altro minuto o, comunque, fino a quando il tessuto non appare completamente disgregato e gli ovociti ben separati. Quando la separazione degli ovociti è completa, i subcampioni vengono riportati allo stereomicroscopio e trattati manualmente con le pinze per rimuovere membrane, vasi sanguigni e aggregazioni di ovociti immaturi. Infine, ogni subcampione è stato fotografato (ad ingrandimenti di 0.8 x o 1x), utilizzando una fotocamera collegata allo stereomicroscopio e ad un computer, con l'ausilio del software Axio Vision per l'acquisizione delle immagini (fig. 1).

Le immagini sono state analizzate mediante il software Image J (Image Processing and Analysis in Java; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Ogni immagine è stata utilizzata per stimare la fecondità del lotto deponente, cioè il numero di ovociti pronti per essere depositi. Il software fornisce informazioni sul numero, l'area e il diametro degli ovociti target per la stima della maturità, vitellogenici o idratati nel nostro esperimento. Per essere analizzata, la foto viene prima convertita in immagine a 8-bit. Poi sono state applicate opportune correzioni per contrasto e luminosità (fig. 2). Il software Image J è in grado di riconoscere le singole cellule, inoltre consente di applicare una correzione per separare 2 o più particelle a contatto e che quindi potrebbero apparire come un unico oggetto. Infine, viene effettuata l'analisi vera e propria delle particelle, che fornisce tutti i dati riguardanti il numero e la dimensione delle uova. Per una maggiore accuratezza possibile, tale analisi è stata effettuata introducendo un fattore di correzione per la forma ellittica dell'ovocita acciuga, impostando il valore circolarità 0.3-1.0 (da 0.0 a 1.0 per le sardine).

Poi i risultati ottenuti da Image J sono stati plottati usando il software FISAT II (FAO-ICLARM Fish Stock Assessment Tools; <http://www.fao.org/fishery/topic/16072/en>) e una distribuzione modale delle

frequenze di taglia (Bhattacharya's method; Bhattacharya, 1967) è stata effettuata al fine di stimare il numero di cellule, che rappresentano la fecondità lotto del subcampione.

Secondo esperimento

I risultati del primo esperimento rappresentano il punto di partenza per un'ulteriore indagine: testare il migliore fissativo più opportuno per l'applicazione del metodo *whole mount*, senza che venga alterata la dimensione degli ovociti, per disidratazione o aumento del volume.

Per ciascun campione, il peso del subcampione è stato selezionato in base al valore di GSI dell'individuo. Sono stati presi 7 campioni per specie, da ciascun ovario sono state prelevate due porzioni di tessuto per ogni campione di acciuga e due per ogni ovario di sardina, per un totale di 28 campioni. Una porzione per esemplare è stata immersa in acqua distillata, mentre la seconda replica è stata immersa in una soluzione isotonica (Cloridrato di sodio 0.9%). Le procedure di agitazione per la separazione degli ovociti; di eliminazione di residui tissutali e di produzione delle immagini sono le stesse adoperate per il primo esperimento.

Anche le successive analisi di immagine, tramite Image J, e la successiva analisi sulla distribuzione di frequenza delle classi di taglia all'interno del campione, tramite FiSAT, sono state effettuate come nel primo esperimento.

RESULTATI

Primo esperimento

L'analisi effettuata da Immagine J permesso di individuare gli ovociti maturi nel subcampione (fig. 3), isolandoli dagli altri elementi nell'ovaio (tessuto connettivo, ovociti immaturi, ecc.). Il software produce dati di taglia (area, diametro maggiore e minore, ecc.) di ogni uovo riconosciuto, come risultati dell'analisi della foto del campione. Plottando in FiSAT, i dati ottenuti da Image J si ottiene una distribuzione di frequenza del diametro medio degli ovociti, all'interno della quale è possibile identificare la popolazione di ovociti maturi: generalmente una classe piuttosto abbondante e di medie dimensioni, che rappresentano la vera e propria fecondità (figg. 4 A e B).

Una buona accuratezza nella stima fecondità si ottiene quando gli ovociti all'interno del campione sono un numero compreso tra 200 e 300. Per mezzo di questo esperimento, abbiamo individuato il peso ottimale di subcampione per ottenere il numero ovociti più appropriato per l'analisi, a partire dal GSI del campione. I risultati sono illustrati in figura 5 e in tabelle 1 e 2. I risultati hanno individuato il peso ideale di subcampione per tre diverse classi di valori di indice gonadosomatico (3-4, 4-5, 5+) per le sardine; in contrasto, per quanto riguarda le acciughe, diverse classi di GSI richiedono lo stesso peso di subcampione per ottenere il numero ideale di ovociti per il conteggio. In particolare, per quanto riguarda le acciughe, il numero ideale di ovociti si ottiene da subcampioni di peso compreso tra 0.030 e 0.040 gr, indipendentemente dal valore di GSI dell'individuo. Per le sardine, invece, i risultati suggeriscono di utilizzare subcampioni di peso inferiore a 0.020gr per bassi valori di GSI; subcampioni di 0.030 o 0.040 gr, per valori di indice gonadosomatico intermedi (tra 4 e 5); campioni di peso compreso tra 0.040 e 0.050 gr per campioni con GSI maggiore di 5.

Questa differenza tra le due specie è probabilmente dovuta alla diversa forma delle uova nelle due specie: rotonde nelle sardine ed ellittiche nelle acciughe. Questi inaspettati risultati, unitamente alla peculiare forma degli ovociti di acciuga suggerisce di utilizzare, per la distribuzione di frequenza delle classi di taglia, l'area dell'ovocita invece del diametro, per ottenere risultati più precisi. Nel caso di un oggetto di forma ellittica, infatti il diametro potrebbe variare in relazione al punto di taglio, che potrebbe essere ortogonale o parallelo all'asse maggiore.

Secondo esperimento

Per ciascuno dei sette subcampioni di acciuga e dei sette di sardina sono state prodotte stime di fecondità con le medesime procedure applicate già precedentemente. Per ogni esemplare sono state ottenute due stime differenti: una per il campione immerso in acqua distillato ed una da quello in soluzione isotonica.

Le due stime sono state confrontate per investigare quali fossero gli effetti di un differente fissativo sulle uova, ovvero se si innescassero fenomeni di alterazione della forma e dimensione degli ovociti dovuti all'osmosi e che potessero alterare la stima finale di fecondità.

I risultati sono mostrati in tabella 3 e figura 6. Come si evince dal confronto, per le acciughe le stime hanno un differenza significativa al 5% ($R^2=0.92$), di contro, per quanto riguarda le sardine, non è stata riscontrata alcuna differenza significativa. Questo risultato può essere giustificato dal fatto che le gonadi di acciuga fossero state fissate in formalina al momento del campionamento, mentre quelle di sardina erano conservate in acqua distillata, quindi queste ultime non hanno subito alcun effetto quando sono state immerse nelle due soluzioni utilizzate per l'esperimento. Questi risultati appaiono in accordo con quanto riportato in letteratura dove viene sottolineata la necessità di utilizzare una soluzione isotonica o di mantenere in soluzione di formalina i campioni già conservati in questo fissativo, per evitare fenomeni di alterazione dovuti alla pressione osmotica (es., Ganias et al., 2010; Klibansky & Juanes 2008).

CONCLUSIONI

Questo tirocinio presso la scuola di biologia dell'università di Aristotele (Salonico, Grecia), mi ha permesso di apprendere una metodologia efficace per la determinazione della fecondità. Sebbene gli esperimenti fossero preliminari e volti esclusivamente all'apprendimento della metodologia di indagine, piuttosto che alla determinazione finale della fecondità degli individui analizzati, le stime di fecondità ottenute appaiono confrontabili con quelle determinate per l'acciuga nelle medesime aree (Somarakis et al., 2004).

Gli esperimenti condotti mi hanno permesso di stabilire quali siano i criteri e le metodiche di analisi da adottare, in modo da ottenere una stima più accurata possibile. Tale tirocinio risulta particolarmente utile in considerazione dell'importanza che il parametro fecondità riveste nelle valutazioni di biomassa deponente e potenziale riproduttivo, soprattutto nell'ottica di una gestione sostenibile di stock ittici altamente sfruttati da marinerie commerciali, come nel caso degli stock di sardine ed acciughe.

L'ulteriore vantaggio derivante dall'applicazione del metodo *whole mount* consiste nella possibilità di stimare il numero di uova deposte, non facendo ricorso all'uso di ovociti idratati come nelle caso delle tecniche tradizionali (Hunter et al., 1985). Il fenomeno della idratazione delle uova, infatti, essendo piuttosto effimero ed inducendo fenomeni di segregazione nelle femmine che devono deporre (Macewicz et al., 1996; Ganias et al., 2004), rende difficile il campionamento di esemplari in questo particolare stato.

Infine, va sottolineata l'importanza della collaborazione creata e rafforzata da questa esperienza con il professore Ganias, che sicuramente darà frutti anche in futuro permettendo di accrescere le competenze e le opportunità di studio, legate all'approfondimento delle conoscenze della biologia riproduttiva di importanti specie ittiche.

BIBLIOGRAFIA

- Bhattacharya, C.G., 1967. A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components. *Biometrics*, 23: 115-135.
- Ganias, K., S. Somarakis, A. Machias, and A. Theodorou. 2004. Pattern of oocyte development and batch fecundity in the Mediterranean sardine. *Fisheries Research (Tokyo)* 67:13–23.
- Ganias K., 2008. Ephemeral spawning aggregations in the Mediterranean sardine, *Sardina pilchardus*: a comparison with other multiple-spawning Clupeoids. *Mar Biol*, 155:293– 301.
- Ganias K., Rakka M., Vavalidis T., Nunes C., 2010. Measuring batch fecundity using automated particle counting. *Fisheries Research* 106: 570–574
- Hunter J.R., Lo N.C.H. e Leong R.H.J., 1985. Batch fecundity in multiple spawning fishes. In: Lasker, R. (Ed.), *An Egg Production Method for Estimating Spawning Biomass of Pelagic Fish: Application to the Northern Anchovy, *Engraulis mordax**. NOAA Technical Report No. NMFS, 36: 67–77.
- Klibansky, N., Juanes, F., 2008. Procedures for efficiently producing high-quality fecundity data on a small budget. *Fish. Res.* 89, 84–89.
- Macewicz B.J., Castro-Gonzalez J.J., Cotero-Altamirano C.E. e Hunter J.R., 1996. Adult reproductive parameters of Pacific sardine (*Sardinops sagax*) during 1994. *Calif. Coop. Oceanic Fish. Invest. Rep.*, 37: 140–151.
- Parker K., 1980. A direct method for estimating northern anchovy, *Engraulis mordax*, spawning biomass. *Fish. Bull. U.S.* 78: 541-544.
- Somarakis S., Palomera I., Garcia A., Quintanilla L., Koutsikopoulos C., Uriarte A. e Motos L., 2004. Daily egg production of anchovy in European waters. *ICES Journal of Marine Science*, 61: 944-958.



Fig. 1. Acquisizione dell'immagine del subcampione di ovario, tramite stereomicroscopio.



Fig. 2. Immagine del subcampione da analizzare per il conteggio degli ovociti, dopo la conversione a 8 bit e le correzioni del contrasto e della luminosità.

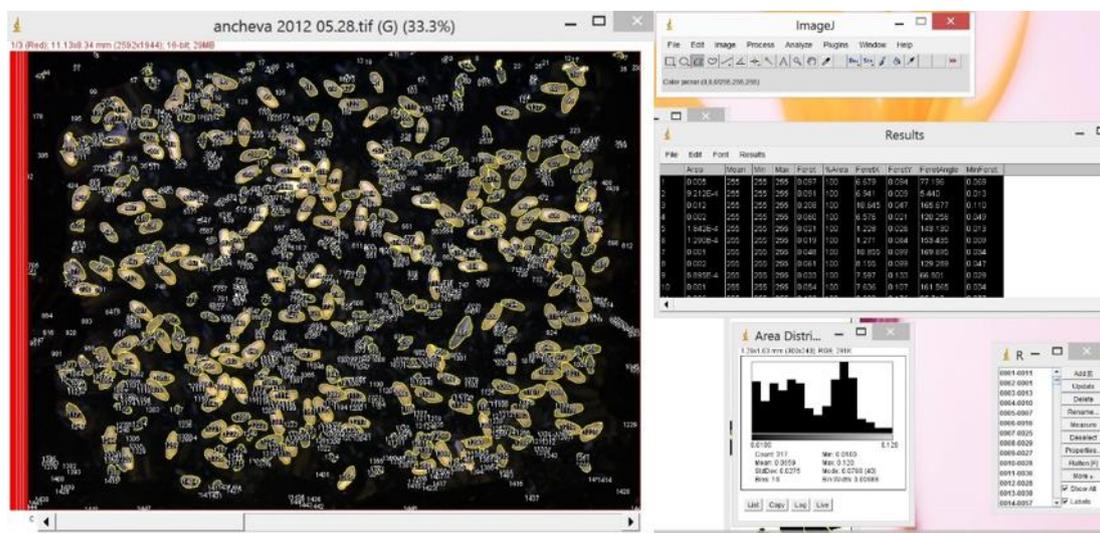


Fig. 3 Esempio di conteggio di ovociti con l'uso del software Image J.

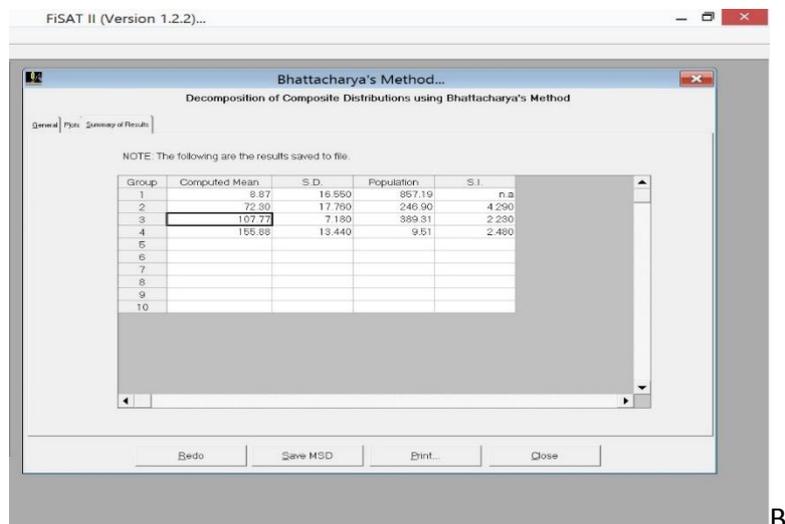
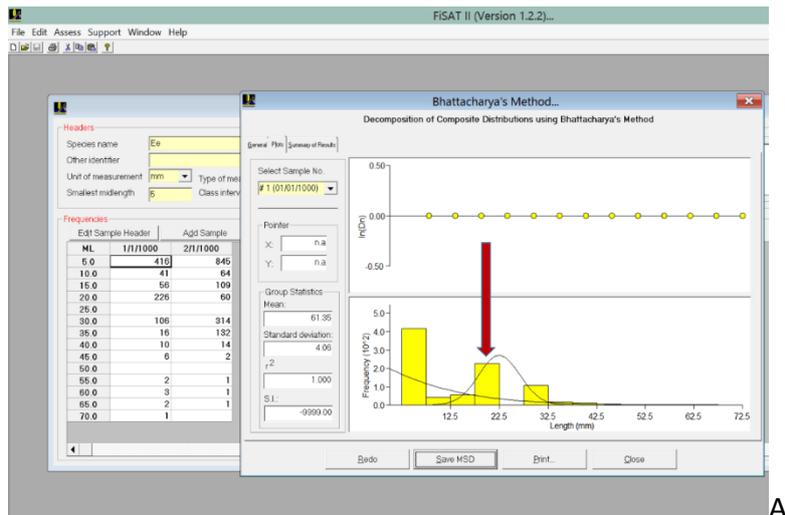


Fig. 4 B Finestra di output dell'analisi sulla distribuzione di frequenza delle classi di taglia degli ovciti nel campione. A: La freccia indica la classe di taglia target per la determinazione della fecondità. B: il riquadro evidenzia il conteggio di ovciti appartenenti alla classe di taglia target per la determinazione della fecondità.

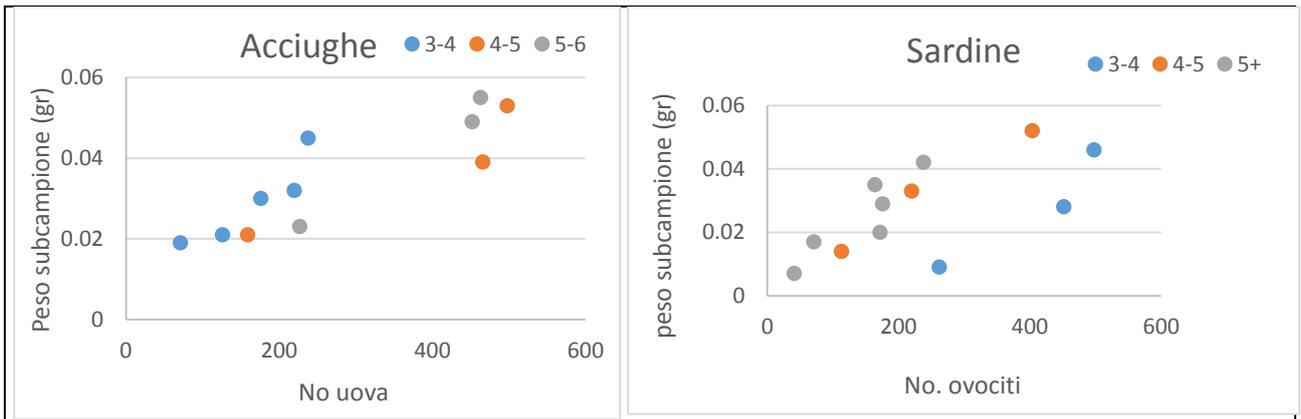


Fig. 5 Relazione tra numero di uova (No uova) e peso del subcampione, per entrambe le specie studiate.

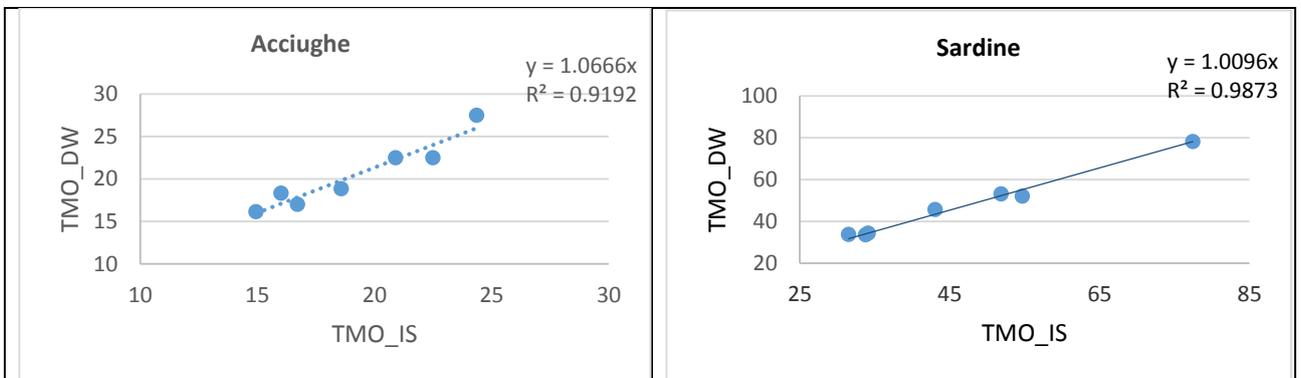


Fig. 6 Confronto tra la taglia media degli ovociti nei campioni in acqua distillata (TMO_DW) e in soluzione isotonica (TMO_IS), per entrambe le specie analizzate.

Tabella 1. Numero di uova e peso (gr) per ciascun subcampione del primo esperimento.

Acciughe				Sardine			
No. Uova	GSI			No. Uova	GSI		
	3-5	4-5	5+		3-5	4-5	5+
Peso subcampione				Peso subcampione			
71	0.019			41			0.007
126	0.021			71			0.017
159		0.021		113		0.014	
176	0.03			164			0.035
220	0.032			172			0.02
227			0.023	176			0.029
238	0.045			220		0.033	
452			0.049	238			0.042
463			0.055	262	0.009		
466		0.039		404		0.052	
498		0.053		452	0.028		
				498	0.046		

Tabella 2. Dati e stime di fecondità relativi ai campioni usati nel primo esperimento.

Acciughe						Sardine					
Campione	Peso gonade	GSI	Peso subcampione	No. Ovociti	Fecondità	Campione	Peso gonade	GSI	Peso subcampione	No. Ovociti	Fecondità
3	0.612	4.93	0.039	466	7313	102	0.335	5.88	0.035	164	1570
19	0.57	5.25	0.023	227	5626	125	0.447	3.35	0.009	262	13013
25	0.332	3.27	0.032	220	2283	143	0.884	4.9	0.033	220	5893
40	0.324	3.19	0.045	238	1714	155	0.930	5.62	0.042	238	5270

Tabella 3. Dati e stime di fecondità relativi ai campioni utilizzati nel secondo esperimento.

Campione	Peso gonade	GSI	Acciughe				Campione	Peso gonade	GSI	Sardine			
			Peso subcampione	Taglia media ovociti	No ovociti	Fecondità				Peso subcampione	Taglia media	No ovociti	Fecondità
3w	0.422	4.023	0.033	14.95	549.01	7020.673	101w	0.323	3.05	0.023	54.72	139	1952.043
3IS	0.422	4.023	0.036	16.17	415.72	4873.162	101IS	0.323	3.05	0.025	52.11	157	2028.44
9w	0.412	3.559	0.041	20.91	335.28	3369.155	107W	0.531	3.49	0.029	31.5	111	2032.448
9IS	0.412	3.559	0.038	22.5	449.8	4876.779	107IS	0.531	3.49	0.025	33.84	125	2655
15w	0.668	5.135	0.038	16.02	425.9	7486.874	109W	0.515	4.05	0.034	51.86	79	1196.618
15IS	0.668	5.135	0.035	18.34	452.63	8638.767	109IS	0.515	4.05	0.031	53.08	43	714.3548
17w	0.389	3.023	0.032	16.71	440.48	5354.585	111W	0.569	4.47	0.044	43.08	110	1422.5
17IS	0.389	3.023	0.036	17.05	456.78	4935.762	111IS	0.569	4.47	0.04	45.7	171	2432.475
19w	0.57	5.233	0.043	22.5	397.42	5268.126	141W	0.883	5.09	0.047	77.45	111	2085.383
19IS	0.57	5.233	0.039	22.5	369.3	5397.462	141IS	0.883	5.09	0.045	78.13	101	1981.844
35w	0.219	2.255	0.041	18.58	462.49	2470.373	154W	1.245	6.35	0.049	33.78	336	8537.143
35IS	0.219	2.255	0.037	18.87	327.03	1935.664	154IS	1.245	6.35	0.052	33.57	246	5889.808
48w	0.467	4.578	0.043	24.37	413.85	4494603	169W	3.017	13.97	0.048	34.13	265	16656.35
48is	0.467	4.578	0.040	27.5	483.64	5646.497	169IS	3.017	13.97	0.05	34.37	252	15205.68