From anadromy to full marine life in Clupeids: how ichthyoplankton can provide useful insights for the evolution of the fish migration strategy.

PROGRAMMA DI RICERCA STM

Il Fruitore: **Dott. Marco Torri**

Istituto di afferenza: **Istituto per l'Ambiente Marino Costiero SS di Capo Granitola**

con qualifica di **Assegnista di Ricerca**

Istituto ospitante: **Woods Hole Oceanographic Institution (WHOI)**, Massachusetts, USA

Periodo finanziato dal programma di ricerca: **29 Marzo – 23 Aprile 2019**

Contents

Introduzione 2

Attività svolte durante la permanenza presso il WHOI 4

Campionamento degli stadi planctonici di *river herring* e raccolta di dati biotici e abiotici relativi agli ambienti di *spawning*. 5

Determinazione delle performance di crescita larvale nelle *river herring* in relazione alle condizioni ambientali esistenti nelle acque interne del New England 6

Risultati ottenuti 8

Determinazione delle performance di crescita larvale nelle river herrings 8

Comparazione delle caratteristiche del ciclo vitale delle *river herrings* (Clupeidae) con la specie mediterranea *Sardinella aurita* (Clupeidae). 12

Ricerca bibliografica delle caratteristiche del ciclo vitali di altre specie di clupeidi 14

Conclusioni 15

Introduzione

La presente relazione è il risultato di una ricerca finanziata dal Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) nell'ambito del programma di ricerca Short-Term Mobility (STM). Questo programma ha reso possibile una permanenza di 21 giorni presso il Woods Hole Oceanographic Institution (WHOI) al fine portare avanti una cooperazione già esistente tra i due centri di ricerca riguardante studi di tipo ecologico di focalizzati sulle prime fasi del ciclo vitale dei pesci.

Il Woods Hole Oceanographic Institution (WHOI) è un'organizzazione privata e nonprofit di ricerca, di studio e di educazione dedicata alle scienze marine e alla produzione di relative opere ingegneristiche. La sua sede è a Woods Hole in Massachusetts, USA.

Il WHOI fu fondato nel 1930 come la più grande istituzione di ricerca oceanografica degli USA con un numero di partecipanti, tra staff e studenti, di circa 1000 unità. L'istituzione è organizzata in sei dipartimenti:

- Applied Ocean Physics & Engineering
- Biology
- Geology & Geophysics
- Marine Chemistry & Geochemistry
- Physical Oceanography

• Marine Policy Center

La missione del Woods Hole Oceanographic Institution è dedicata alla ricerca e alla comprensione a livello avanzato degli oceani e delle loro interazioni con il sistema Terra al fine di comunicare queste conoscenze per il beneficio della società.

In particolare, il Dipartimento di Biologia svolge studi indirizzati verso la comprensione dei meccanismi ecosistemici che coinvolgono organismi marini e non, dalla scala dei batteri e virus a quella dei grandi cetacei. Gli aspetti della biodiversità marina vengono investigati attraverso le più innovative tecniche nei campi della biologia molecolare, biochimica, biologia cellulare, genomica, proteomica, acustica e ottica sofisticata, comportamento, informatica e modellistica matematica dei processi molecolari e della dinamica delle popolazioni.

Tra le più importanti aree di forza che il Dipartimento si pone come scenario di ricerca vi è l'ecologia del fitoplancton, dello zooplancton e dei pesci. Essa viene condotta a tutti gli stadi del ciclo vitale degli organismi e particolare attenzione viene rivolta ai primi stadi di vita dei pesci, ovvero uova e larve, nel Fisheries Oceanography and Larval Fish Ecology Lab, sotto la supervisione del Dr. Joel K. Llopiz. In questo laboratorio vengono portati avanti diversi progetti volti alla comprensione delle interazioni tra le larve e l'ambiente che le circonda, in termini di rapporti preda-predatore, rete trofica planctonica e cambiamenti globali che influenzano tali meccanismi. Si possono ottenere ulteriori informazioni visionano il sito web http://www.whoi.edu/science/B/FOLFElab/FOLFE_Lab_at_WHOI/Welcome.html.

La collaborazione tra il CNR e questo prestigioso ente di ricerca è iniziata nel 2016 grazie a dei finanziamenti messi in campo dal WHOI a sostegno della mia permanenza negli USA per un periodo di 3,5 mesi. In quell'occasione è iniziato uno studio sull'ecologia dei primi stadi del ciclo vitale di alcune specie di Clupeidae anadrome, ovvero che spendono la loro vita adulta in mare e migrano nelle acque interne durante il periodo riproduttivo. In particolare il progetto "River Herring" mira a identificare le condizioni di sviluppo degli individui dallo stadio di uovo a quello di giovanile nelle acque interne del Massachusetts, le quali sono sottoposte a diversi tipi di impatti antropici. Essendo le prime fasi del ciclo vitale il periodo più critico per la sopravvivenza degli individui, impatti antropici significativi a questo livello, molto comuni nelle acque interne, potrebbero essere alla base del declino della popolazione adulta osservato nelle ultime decadi di due specie di *river herring*, *Alosa aestivalis* (blueback herring) e *Alosa pseudoarenghus* (alewife herring). Attraverso quindi studi volti alla determinazione della densità di uova e larve delle due specie, delle performance di crescita e mortalità a livello larvale in relazione a fattori biotici e abiotici in diversi siti del New England caratterizzati da diversi gradi e tipologie di impatto antropico, lo studio mira a definire l'effetto che questi ultimi posso esercitare sul ciclo riproduttivo di queste due importanti specie dal punto di vista ecologico e commerciale.

In questo contesto, lo studio e la comparazione delle caratteristiche del ciclo vitale di queste specie di Clupeidae con altre specie mediterranee prettamente marine oggetto di miei studi pregressi hanno posto in essere l'ipotesi che l'evoluzione delle differenti strategie di riproduzione marina (diadromia, potamodromia, oceanodromia) possano essere degli adattamenti volti ad ottimizzare le probabilità di sopravvivenza durante la fase particolarmente vulnerabile tipica degli stadi planctonici, ossia quelli di uovo e larva. La scelta del focus sulla famiglia dei Clupeidae in particolare risulta di interesse per questa tematica non solo in quanto raggruppa specie comunemente commerciali ma bensì rappresenta un *unicum* nel raggruppare al suo interno specie che adottano strategie di migrazione molto differenti tra di loro durante il periodo riproduttivo nonostante una vicinanza filogenetica.

Traendo vantaggio dalla grande rete di collaborazioni del WHOI e comparando i principali *findings* riguardanti le caratteristiche biologiche dei primi stadi del ciclo vitale di specie di Clupeidae mediterranee e del New England, lo scopo ultimo di questa STM è stato quello di portare avanti la ricerca verso la comprensione delle motivazioni biologiche alla base delle differenti strategie riproduttive presenti in questa famiglia.

Attività svolte durante la permanenza presso il WHOI

La mia esperienza di 21 giorni presso l'Istituto americano ha permesso quindi di svolgere le seguenti attività:

- di continuare presso i laboratori del WHOI la raccolta dati iniziata nel 2016 sulle *river herring* e sulle condizioni ambientali in cui le larve si accrescono.
- Di effettuare l'analisi dati sui dati raccolti.
- Di incrociare i nuovi risultati con quelli derivanti dalla ricerca che sto svolgendo presso il CNR su *Sardinella aurita*, specie ittica mediterranea di interesse ecologico e commerciale.
- Di raccogliere informazioni sul ciclo vitale di differenti specie ittiche appartenenti alla famiglia dei Clupeidi distribuite lungo l'atlantico e in altri oceani, sfruttando le conoscenze in letteratura e la rete di collaborazioni del WHOI.
- Di testare in maniera preliminare l'ipotesi di connessione tra l'ottimizzazione dei tassi di sopravvivenza a livello larvale e l'adottamento di determinate strategie migratorie riproduttive.
- Di rafforzare le collaborazioni tra il CNR e il WHOI.

Di seguito vengono descritte le principali metodologie adottate per questo studio.

Campionamento degli stadi planctonici di *river herring* e raccolta di dati biotici e abiotici relativi agli ambienti di *spawning*.

Le specie ittioplanctoniche (uova e larve) sono state campionate prendendo in considerazione 4 laghi del New England in cui è nota la presenza di *Alosa aestivalis* (blueback herring) e *Alosa pseudoharengus* (alewife herring): il Great Herring Pond (GHP), il Nippenicket Lake (NPN), Whitman's Pond (WHT) and Upper Mill Pond (UMP) (Fig. 1).

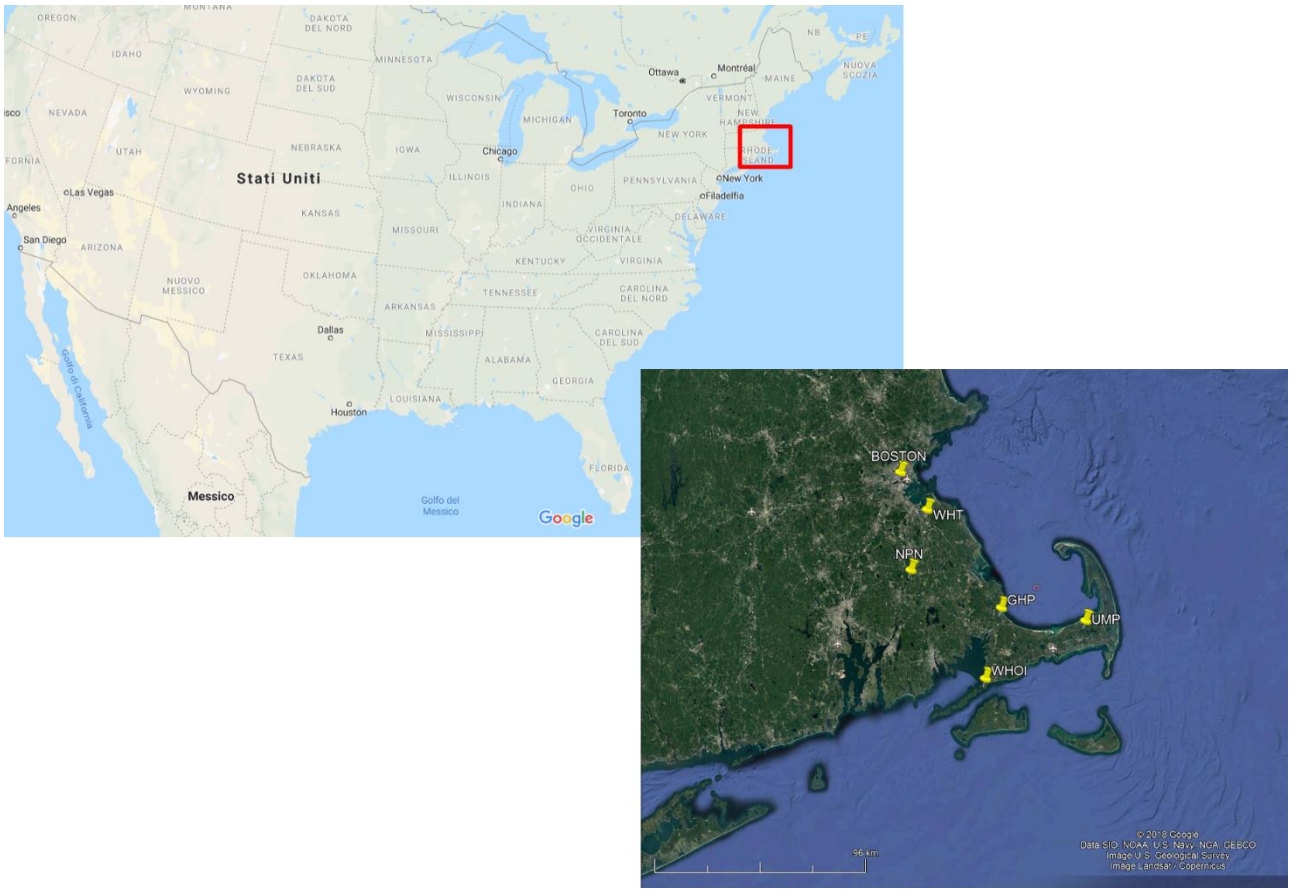


Fig. 1 – Quattro siti di campionamento nell'ambito del progetto "River Herring": Great Herring Pond (GHP), il Nippenicket Lake (NPN), Whitman's Pond (WHT) and Upper Mill Pond (UMP). Nella Mappa sono indicate anche la città di BOSTON e la posizione geografica dell'istituto ospitante WHOI

La raccolta di mesozooplanctoon è stata effettuata attraverso l'uso di una rete da plancton con bocca di 1 metro di diametro ed equipaggiata con rete di maglia 200µm. La rete viene trainata imbarcazione per 3-5 minuti. Sulla bocca del retino è installato un flussimetro al fine di stimare il volume d'acqua filtrato ed ottenere delle stime di densità delle specie presenti nel mesozooplancton. Il campione intrappolato nel collettore del retino viene raccolto (es in Fig. 2), filtrato nuovamente ed infine preservato in etanolo 70%. Il

campione viene in seguito trasportato in laboratorio per il riconoscimento delle specie ittiche target a livello larvale tramite microscopio ottico.

I campioni utilizzati per questo studio sono stati raccolti nel periodo Aprile-Giugno 2016, in occasione del primo evento di collaborazione finanziato dall'Istituto americano. Le analisi qui mostrate sono state portate avanti durante il periodo del presente programma di ricerca.

Fig. 2 – Campione di mesoozooplancton raccolto in acque interne del Massachusetts. Gli individui in bianco sono larve di *river herrings*.

Determinazione delle performance di crescita larvale nelle *river herring* in relazione alle condizioni ambientali esistenti nelle acque interne del New England

Al fine di ottenere parametri morfometrici (e.g. lunghezza totale e lunghezza standard) le specie ittioplanctoniche individuate vengono dapprima fotografate tramite stereomicroscopio con fotocamera integrata (fig. 3). Attraverso un software opportunamente calibrato (Image Pro Plus) è possibile operare un'analisi d'immagine volta ad ottenere le misure desiderate.

Attraverso lo stesso microscopio è possibile inoltre effettuare l'estrazione degli otoliti larvali (fig. 3), i quali dopo opportuna lettura permettono di stimare l'età dell'individuo (espressa in numero di giorni). Per mezzo

di aghi sottilissimi, una coppia di otoliti (*sagittae*) è stata estratta da ogni individuo analizzato e immersa in olio da microscopia su un vetrino di vetro. Attraverso il microscopio ottico ad ingrandimento 800x o 1000x è possibile operare la lettura degli anelli giornalieri a partire dal primo check di schiusa (fig. 3).

Fig. 3 – Foto superiore: larva di *alewife* dal quale è possibile operare le misure morfometriche (e.g. lunghezza totale). Foto in basso a sinistra: estrazione degli otoliti larvali. Foto in basso a sinistra: analisi degli otoliti giornalieri al microscopio ottico, da quale è possibile notare la deposizione degli anelli giornalieri.

Poiché Sismour (1994) ha determinato che la formazione del primo anello giornaliero in questa specie inizia dopo due giorni dalla schiusa, l'età dell'individuo è stata stimata come il numero di anelli +2. Ogni otolite è stato letto in maniera *blindly* (i.e. senza informazioni riguardanti la lunghezza e il sito di provenienza dell'individuo) da un singolo lettore. Sono stati misurati anche le seguenti lunghezze:

- La misura dal *primordium* alla prima marcatura (check);
- la larghezza di ciascun incremento (identificativo del tasso di crescita giornaliero medio)
- il diametro massimo di ciascun otolite

Sottraendo i giorni stimati alla data di campionamento dell'individuo è stato inoltre possibile stimare il giorno di schiusa per ciascun individuo.

Le performance di crescita sono state invece stimate mettendo in relazione l'età con la lunghezza totale per ogni individuo in esame.

In aggiunta, per ogni sito di campionamento sono state raccolte informazioni relative alle variabili ambientali tramite sonda multiparametrica che permettere di raccogliere dati lungo la colonna d'acqua. In particolare sono stati indagati i seguenti parametri: temperatura, pH e ossigeno disciolto.

Tutti i grafici e le analisi statistiche sono stati effettuati attraverso l'uso del software R.

Risultati ottenuti

Determinazione delle performance di crescita larvale nelle river herrings

L'analisi degli otoliti ha permesso di determinare le curve di crescita larvale di *A. pseudoharengus* nelle differenti zone di campionamento.

Per quanto riguarda le zone umide Upper Mill Pond (UMP) e Whitman's lake (WHT), i modelli lineari e di Gopertz sono stati applicati ai dati lunghezza/età al fine di determinare le curve di accrescimento (Fig. 4). L'output numerico del modello di Gompertz è riportato in Tabella 1.

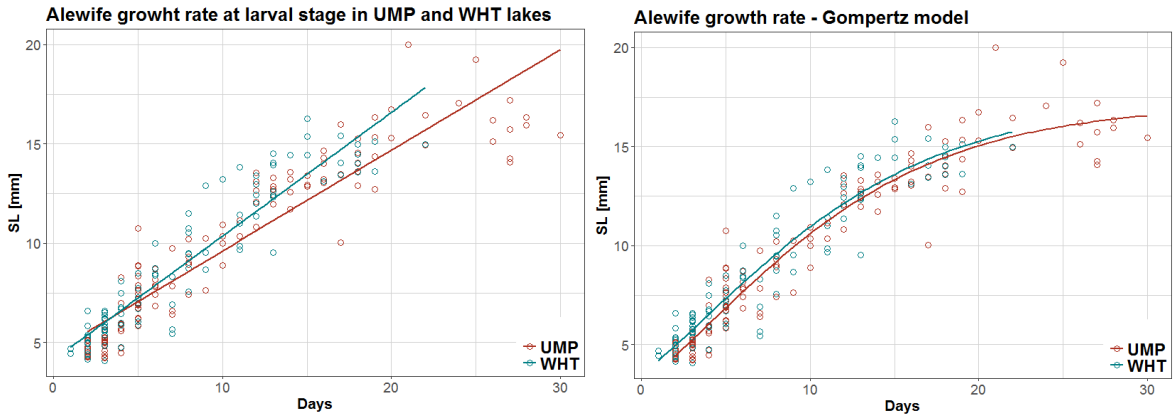


Fig. 4 – Modello lineare (sinistra) e di Gompertz (destra) al fine di stimare le curve di accrescimento larvale nelle zone umide Upper Mill Pond (UMP) e Whitman's lake (WHT).

UMP

```
Parameters:
   Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
k  17.18925    0.53938   31.87   <2e-16 ***
y0  3.00335    0.25705   11.68   <2e-16 ***
r   0.12852    0.01097   11.72   <2e-16 ***
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Residual standard error: 1.186 on 118 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 7
Achieved convergence tolerance: 5.426e-07
```

WHT

```
   Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
k  17.51809    1.26852  13.810  < 2e-16 ***
y0  3.48879    0.30766  11.340  < 2e-16 ***
r   0.12346    0.01801   6.855  7.7e-10 ***
---
Signif. codes:  0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’ 0.05 ‘.’ 0.1 ‘ ’ 1

Residual standard error: 1.2 on 93 degrees of freedom

Number of iterations to convergence: 9
Achieved convergence tolerance: 1.538e-06
```

Tab. 1 – output numerico delle curve di accrescimento stimato dal modello di Gompertz per UMP e WHT.

Entrambi i modelli sono utili a comprendere le differenze nelle performance di crescita verificatesi nei due siti. Dal modello lineare è possibile individuare un maggiore tasso di crescita nel WHT, mentre il modello di Gopertz ha permesso di stimare una maggiore taglia alla schiusa (vd y0 in tabella 1) nel medesimo sito rispetto alla zona umida UMP.

Poiché le differenze tra i due diversi siti potrebbero essere ricondotte a differenze nelle condizioni ambientali in cui avviene l’accrescimento, sono stati presi in considerazione i parametri ambientali derivanti da sonda multiparametrica (Fig. 5).

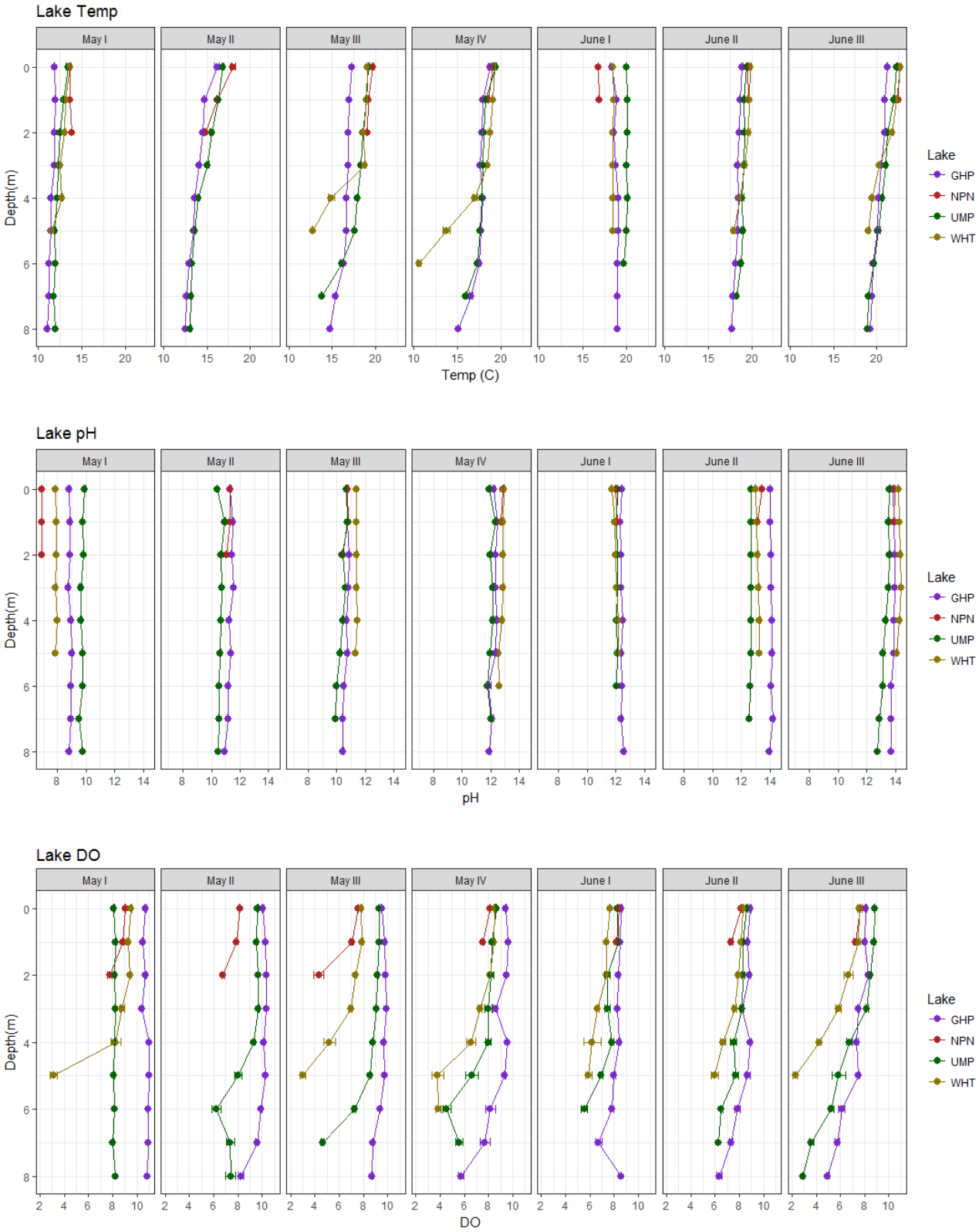


Fig. 5 – Andamenti nella colonna d'acqua dei parametri Temperatura, pH e Ossigeno disciolto (DO) nei 4 siti di campionamento.

Al fine di ottenere maggiori informazioni sugli andamenti delle performance di crescita nel tempo, è stata svolta in aggiunta un'analisi finalizzata a determinare la crescita giornaliera media. Questa può essere derivata dallo spessore degli incrementi giornalieri registrato negli otoliti larvali. Prendendo in considerazione il sito UMP, dalla figura 6 è possibile notare un incremento del tasso medio di crescita giornaliero da Aprile a Giugno.

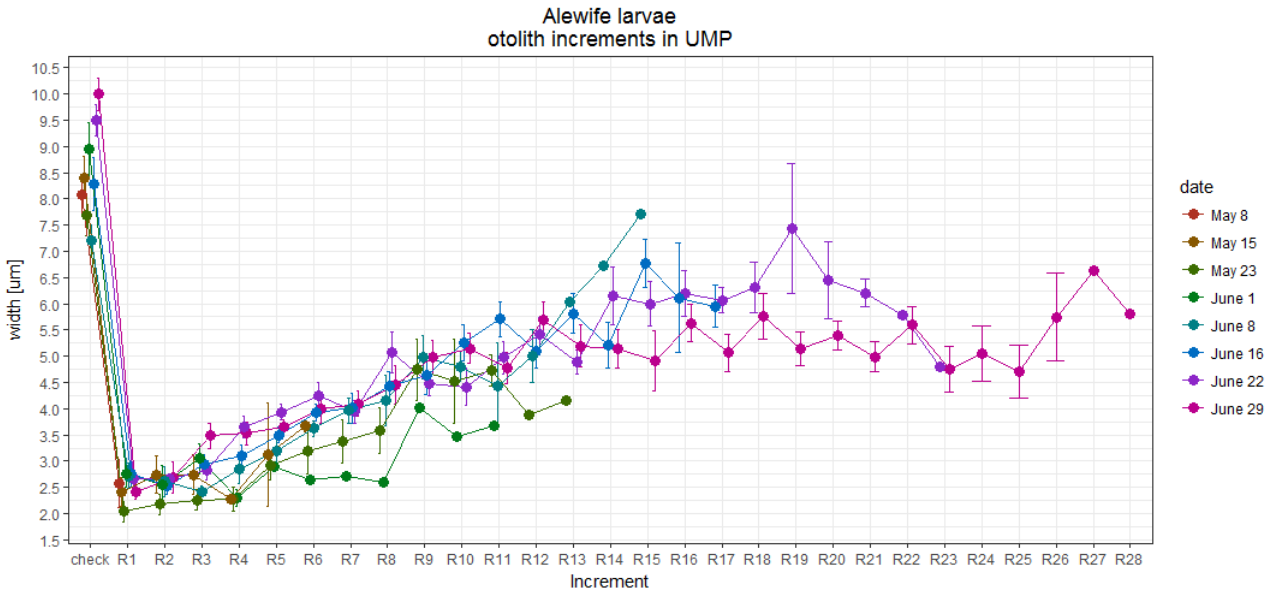


Fig. 6 – Analisi dello spessore degli incrementi utilizzato come proxy della crescita larvale giornaliera media. Sulle ascisse sono riportati gli incrementi progressivamente ordinati dal centro dell'otolite (check di schiusa, *check*) agli incrementi verso il bordo dell'otolite (R1, R2, R3 etc…). Sulle ordinate, il tasso di crescita giornaliero medio derivato dall'analisi dello spessore di tali incrementi. Le date fanno riferimento al periodo di campionamento.

Tale incremento potrebbe quindi essere legato all'aumento della temperatura dell'acqua con il progredire della stagione calda. Le misurazioni ripetute di temperatura hanno permesso di stimare, attraverso un processo di interpolazione, il valore giornaliero di questo parametro nel sito di campionamento. Questi valori sono stati quindi associati al valore di crescita giornaliero medio attraverso una tecnica di *backcalculation*. Tale metodologia di analisi ha permesso di legare ogni incremento misurato ad un giorno dell'anno ricadente tra la schiusa e la data di campionamento. È stato quindi possibile mettere in relazione il valore dell'incremento con il valore di temperatura interpolato. Da questa comparazione è emersa una relazione lineare positiva (Fig. 7) la quale conferma il legame del fattore crescita con questo importante parametro ambientale.

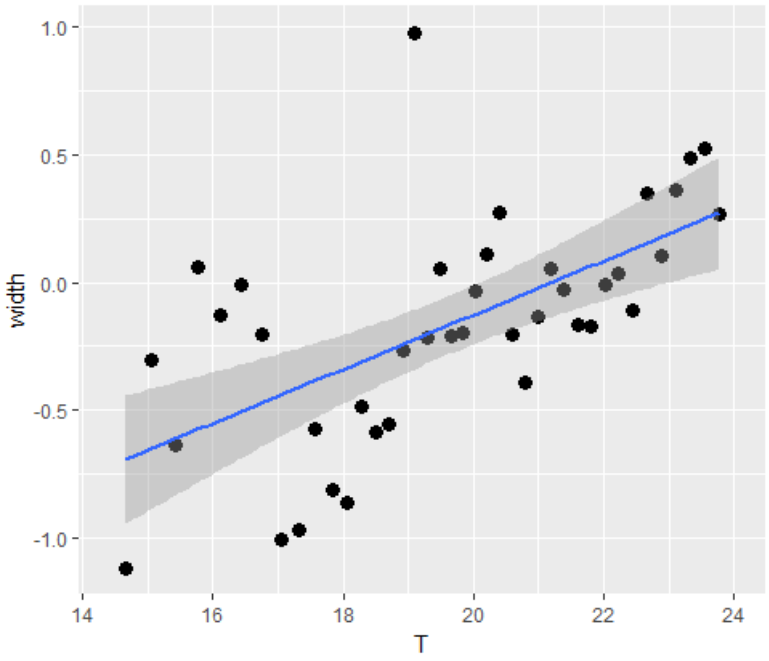


Figura 7 – Relazione tra la temperatura dell'acqua (ascisse) e il tasso di crescita giornaliero medio derivato dall'analisi dello spessore di tali incrementi (ordinate). La linea blue indica l'andamento della regressione lineare mentre in grigio, l'intervallo di confidenza al 95%.

L'analisi è stata inoltre indirizzata verso lo studio di ulteriori parametri dell'otolite, quale il diametro massimo, il raggio e le relazioni di questi parametri con l'età e la lunghezza. Poiché queste ulteriori analisi hanno mostrato risultati in linea con quanto già presentato in questa sezione, tali ritrovamenti non sono stati inseriti nella presente relazione.

Comparazione delle caratteristiche del ciclo vitale delle *river herrings* (Clupeidae) con la specie mediterranea *Sardinella aurita* (Clupeidae).

Lo step successivo è stato quello di confrontare i risultati ottenuti dall'analisi degli individui larvali delle specie del New England con i medesimi derivanti dal lavoro di ricerca svolto presso il CNR nel Canale di Sicilia. Le campagne oceanografiche estive effettuate negli anni 2010-2013 hanno permesso di raccogliere dati sulla distribuzione spaziale delle larve di *Sardinella aurita* nel Canale di Sicilia (Fig. 8).

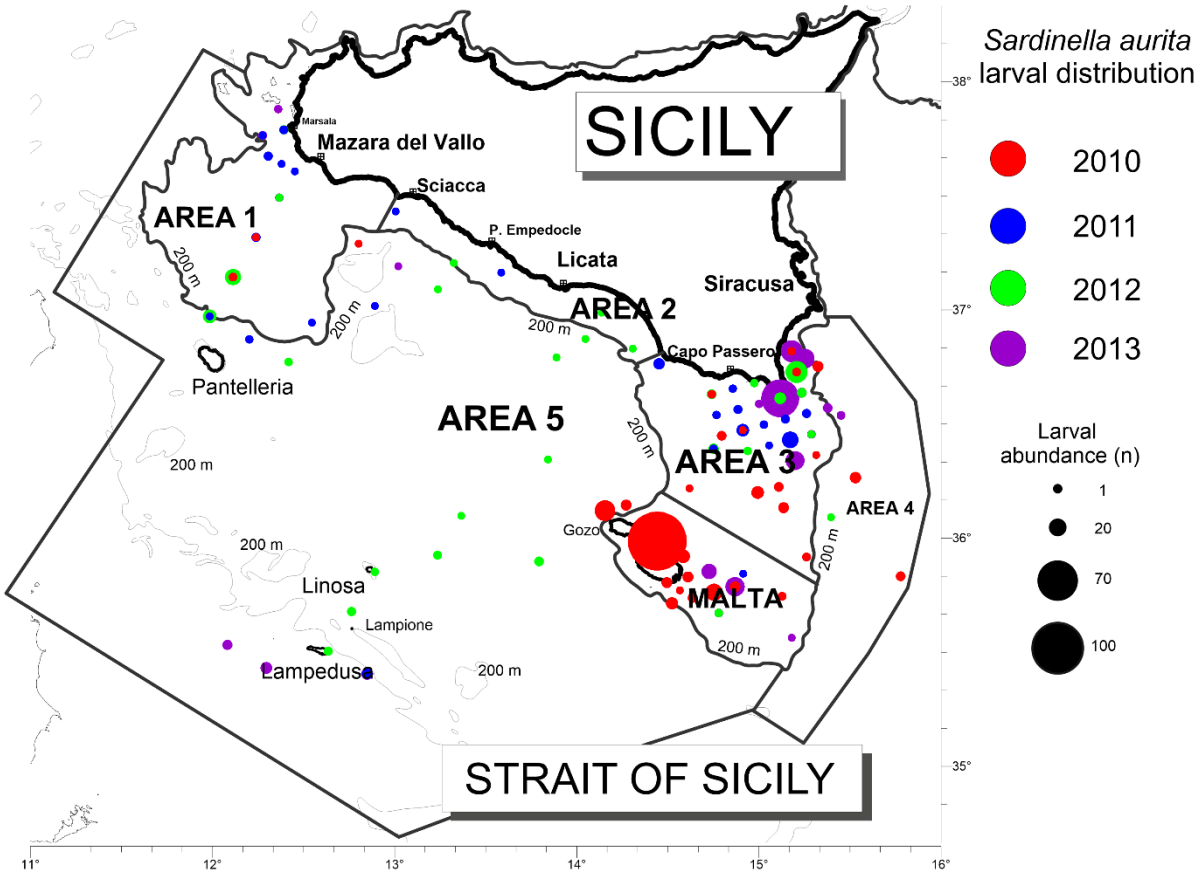


Fig. 8 – Distribuzione spaziale dell'abbondanza di larve di *Sardinella aurita* nel Canale di Sicilia risultante dalle campagne oceanografiche CNR effettuate tra il 2010 e il 2013.

Dall'analisi degli otoliti estratti dalle larve raccolte, è stato possibile determinare le perfomance di crescita di *Sardinella aurita* e confrontarle con quelle di *Alosa pseudoharengus.* Il risultato della comparazione dei modelli lineari applicati a tali dati è raffigurato in Fig. 9.

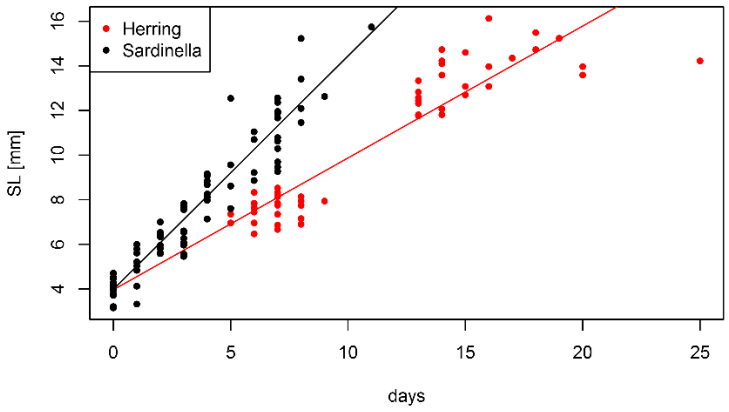


Fig. 9 – Curve di crescita di *Sardinella aurita* (in nero) e *Alosa pseudoharengus* (in rosso) allo stadio larvale a confronto.

Tale figura mette in evidenza i maggiori di tassi di crescita della specie marina mediterranea rispetto alla specie anadroma atlantica. Tuttavia, parallelamente a quanto già mostrato, bisogna tenere in considerazione che le differenti condizioni di temperatura potrebbero influire su tali performance di crescita. In particolare, *Sardinella aurita* è una specie termofila originaria del Mediterraneo meridionale che risulta essere sempre più comune a maggiori latitudini in risposta agli incrementi della temperatura media legati al *climate change*. Infatti, tale specie inizia la deposizione delle uova a temperature maggiori di 23 gradi, le quali temperature sono mediamente più alte rispetto alle condizioni proprie dei laghi del New England durante la stagione di riproduzione delle alewife. In collaborazione con il WHOI stiamo quindi procedendo a mettere a punto un processo di normalizzazione dei tassi di crescita in modo da tenere conto anche degli effetti di questo parametro ambientale.

Ricerca bibliografica delle caratteristiche del ciclo vitali di altre specie di clupeidi

È stata infine effettuata una raccolta delle informazioni riguardanti le caratteristiche biologiche del ciclo vitali dei Clupeidae dalla letteratura. Nella presente relazione è riportata a titolo esemplificativo parte di una tabella sintetica relativa ai risultati ottenuti (Tab. 3)

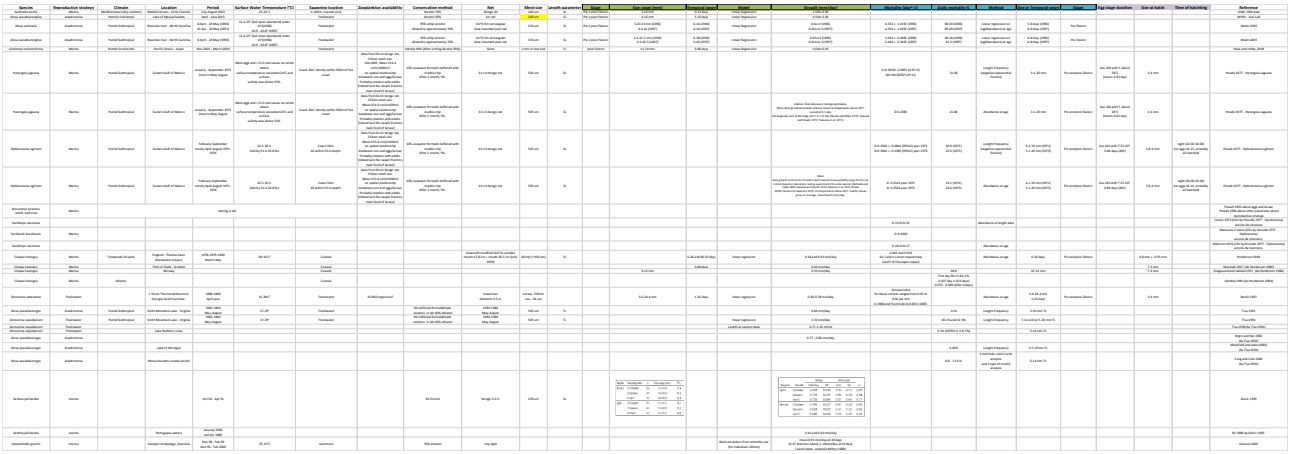


Tabella 2 – Esempio di una parte di tabella riassuntiva dei risultati ottenuti dalla ricerca bibliografica.

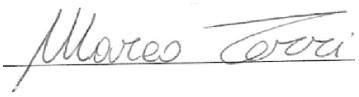
Conclusioni

L'analisi dei tassi di crescita e mortalità derivanti dal lavoro sul campo e dalle conoscenze riportate in letteratura ha permesso di quantificare l'enorme variabilità relativa alle caratteristiche biologiche dei primi stadi del ciclo vitale delle specie di pesci appartenenti alla famiglia dei Clupeidae. L'ipotesi che le diverse strategie riproduttive emerse in questa famiglia possano essere legate all'ottimizzazione dei tassi di sopravvivenza degli stadi precoci del ciclo vitale trova quindi fondamento nella grande variabilità di performance di crescita larvale a cui la mortalità è strettamente legata. In particolare dall'analisi preliminare dei dati raccolti per questo ambizioso studio emerge che le performance di crescita risultano essere maggiormente competitive nelle specie che vivono in ambiente marino durante il periodo riproduttivo. Questo risulta di grande interesse in quanto pone un ulteriore quesito circa l'evoluzione dell'anadromia nelle specie dei Clupeidae. In questo contesto, essa potrebbe quindi rappresentare una risposta evolutiva alla necessità adattativa delle specie di superare la fase più vulnerabile del ciclo vitale nonostante performance larvali svantaggiose. In linea con questo principio, la migrazione stagionale degli adulti verso le acque interne durante il periodo riproduttivo, sebbene rappresenti una notevole spesa energetica per l'adulto stesso, ripagherebbe in termini di *fitness* permettendo alle larve di accrescersi in ambienti meno competitivi (quali le acque interne, durante il periodo più critico del ciclo vitale. Infatti, rispetto agli ambienti lacustri, gli ambienti marini posso essere caratterizzati da tassi di mortalità naturale molto elevati, soprattutto nelle specie in cui i minori tassi di crescita non permettono un raggiungimento rapido dello stadio di giovanile.

Il programma di ricerca STM ha quindi permesso di svolgere importanti passi in avanti verso la costruzione e la validazione dell'ipotesi di connessione adattativa tra l'evoluzione delle strategie migratorie e l'ottimizzazione delle chance di sopravvivenza degli individui durante la fase maggiormente vulnerabile dell'intero ciclo vitale, ovvero la fase planctonica. Il programma ha permesso inoltre di stringere con

maggiore forza la collaborazione con il WHOI, il quale rappresenta uno dei più innovativi istituti di ricerca sul mare a livello globale. Questo risulterà sicuramente essenziale al fine di instaurare una rete di collaborazioni future forti, attraverso anche la creazione di progetti comuni in grado di soddisfare le crescenti richieste di conoscenza relative a questo campo di ricerca.

Ultimo ma non per importanza, il programma STM ha rappresentato un'importante crescita personale in quanto mi ha permesso un confronto altamente formativo con ricercatori di primo ordine e con delle strumentazioni e metodologie all'avanguardia nel campo delle scienze legate all'ambiente marino.

Il fruitore del programma STM

Dott. Marco Torri