

I.A.M.C.-CNR di Capo Granitola



Ottenimento di larve da uova pelagiche di specie ittiche ai fini del riconoscimento tassonomico.

Bennici C.^A, Cuttitta A.^A, Armeri G.M.^A, Maneiro I.^A, Torri M.^B, Biondo G.^A, Patti C.^A, Patti B.^b, Mazzola S.^c.

a - Laboratory of Molecular Ecology and Biotechnology, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia;

b - Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

c - Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), Calata Porta di Massa, Napoli, Italia.

Premessa

Nel corso della campagna oceanografica BANSIC 2014 (22 Luglio - 9 Agosto 2014) sono state attuate tecniche di stabulazione di uova di specie ittiche raccolte con retini zooplanctonici, in particolare reti Bongo 40, al fine di definire le chiavi tassonomiche per il riconoscimento delle stesse a partire dalle larve ottenute (delle quali esistono maggiori informazioni concernenti la morfologia), e seguirne lo sviluppo embrionale, così da definire i vari stadi embrionali di specie ittiche della quali non si ha ancora un quadro completo. Questo lavoro è inoltre utile per integrare i dati e le conoscenze sulle uova di specie ittiche mesopelagiche presenti nel canale di Sicilia nel periodo estivo, con una più precisa identificazione delle specie.

Descrizione

Nelle numerose campagne oceanografiche Bansic, condotte dall'IAMC, volte al monitoraggio di specie ittiche ad elevato interesse biologico e commerciale, la raccolta di campioni di zooplancton è una delle attività principali. L'elaborazione dei dati di abbondanza in relazione ai parametri chimico-fisici della colonna d'acqua, permettono di effettuare stime sulle abbondanze delle specie ittiche oggetto di studio.

I metodi di reperimento dei campioni prevedono la raccolta dello zooplancton in maniera non selettiva, di conseguenza parte del campione pescato, è formato da uova pelagiche di pesci, con differenti stadi di sviluppo. La possibilità di aggiungere, per la stima della biomassa in funzione delle singole specie, anche le uova, ci ha indotto a ricercare delle metodiche di studio più caratterizzanti rispetto al riconoscimento per chiavi, il quale risulta essere complesso, considerati i molteplici cambiamenti effettuati dalle uova nelle fasi di sviluppo.

La creazione di un protocollo che permetta di seguire le diverse fasi dello sviluppo embrionale delle uova pelagiche, può essere utile per conoscere aspetti, che a causa della brevità di alcune specifiche fasi vitali dei pesci, sono ancora poco conosciuti.



Figura 1: Nave oceanografica Urania

Descrizione delle attrezzature

Le campagne oceanografiche denominate Basic vengono condotte dal 1997 con l'ausilio della nave oceanografica Urania. (fig1).

Le attività di raccolta dello zooplancton sono al centro di moltissime altre attività tutte incentrate sul monitoraggio delle specie target *Engraulis encrasicolus* e *Sardinella aurita*.

La raccolta dello zooplancton viene effettuata tramite speciali retini: Calvet, Bongo, Multi Plankton Sampler (MPS).(fig2).



Figura 2: Campionatori planctonici.

Tutti i campionatori menzionati hanno lo scopo di prelevare porzioni di mesozooplancton da un massimo di 100 m fino alla superficie, poiché le uova di pesci planctonici hanno una galleggibilità tale che nonostante le turbolenze superficiali dell'acqua, un campionamento entro i primi 20 m restituisce un dato affidabile della distribuzione anche se alcune uova possono trovarsi a maggiore profondità (Ahlstrom 1959).

La differenza sostanziale tra questi tipi di campionatori zooplanctonici consiste nella modalità di reperimento del campione e nella frazione di zooplancton catturata. In particolare: il campionatore Calvet effettua il campionamento a nave ferma, monta reti con maglia da 150 μ ed è utilizzato principalmente per reperire uova di specie ittiche; il bongo che può essere 40, 60 o 90, a seconda del diametro della bocca, effettua il campionamento con nave in movimento, monta reti con maglia da 200 μ , 250 μ o 300 μ , rispettivamente, ed è utilizzato per reperire principalmente individui larvali di specie ittiche; il Multi Plankton Sampler (MPS), invece, è progettato per campionare con tre diverse modalità: orizzontale, verticale ed obliquo; di conseguenza può essere usato a nave ferma o in movimento. Monta reti con maglia da 200 μ e la particolarità di questo campionatore che è costituito da 5 retini indipendenti che campionano a 5 profondità stabilite, è che permette di campionare in continuo da 100 m in superficie, con il vantaggio di ottenere una stratificazione delle specie presenti lungo la colonna d'acqua (Armeri et al., 2015 - rapporto tecnico MPS).

Al fine di ottenere una migliore conoscenza dei parametri chimico-fisici dell'ambiente indagato, in ogni stazione, prima del campionamento mediante sonda multiparametrica CTD, sono stati acquisiti i profili relativi a conducibilità temperatura e profondità. I sensori della sonda multiparametrica (CTD) della SEABIRD mod. 9 plus e modulo SBE 11plus V2 della SEA-BIRD ELECTRONICS, Inc., acquisiscono inoltre i profili di pressione, ossigeno disciolto, pH e fluorescenza e, come parametri derivati, anche i valori di salinità e di densità.

Effettuata la retinata, il campione viene immediatamente visionato da un operatore tramite stereomicroscopio Leica modello MZ6 (fig3), e se ne controlla la positività di larve e uova delle specie target. I campioni privati dell'acqua vengono posti in cartel in materiale plastico da 100 ml e vengono riportati sia esternamente che internamente i dati relativi alla stazione di campionamento (nome della campagna e anno, N. stazione, attrezzo di campionamento, data, profondità nel caso di campioni provenienti da MPS) e conservati in fissanti organici, quali etanolo al 70% e formalina al 4% tamponata in acqua di mare con borace per preservarli nel tempo. (fig4). i campioni così allestiti vengono conservati in frigo alla temperatura di 4°C.



Figura 3: Stereomicroscopio

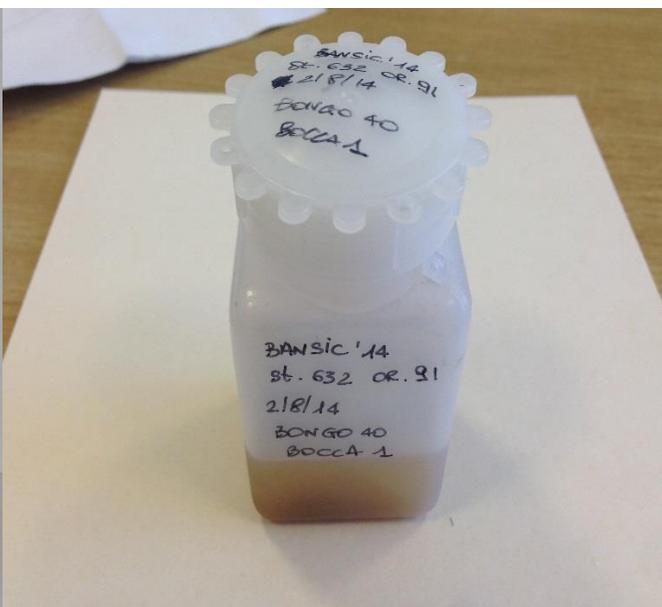


Figura 4: Cartel per la conservazione dei campioni

Per seguire lo sviluppo embrionale delle uova di specie ittiche, catturate principalmente con i retini bongo 40 e calvet, ci siamo dotati oltre alle attrezzature utilizzate da tempo durante le campagne Bansic, di un incubatore da laboratorio e di contenitori in plexiglass di 2 cm³. (Fig5).

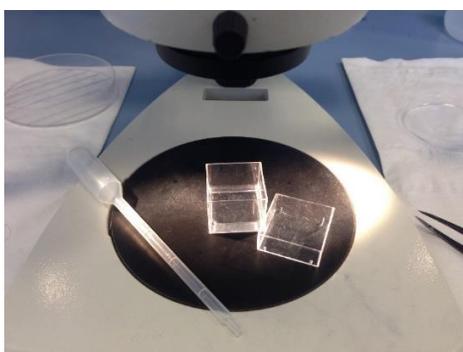


Figura 5: Contenitori di incubazione

All'interno di ogni cubo in plexiglass è stato posizionato un uovo con un volume di acqua filtrata di 8 ml e mantenuto in incubatore per un numero di giorni variabile che dipende principalmente dallo stadio di sviluppo dell'uovo in questione e dalla temperatura che è stata mantenuta stabile a 22.5 °C grazie all'incubatore e simile alla temperatura delle acque mediterranee nel periodo estivo.

Isolamento e disinfezione delle uova

Effettuata la retinata, si è proceduto ad immagazzinare i dati relativi ai volumi d'acqua filtrata, alla stazione di campionamento, alla profondità, alla temperatura superficiale dell'acqua. I dati raccolti vengono archiviati in maniera manuale su modelli prestampati cartacei, e su supporto informatico. Per ogni metodo di campionamento si ottiene un campione in due repliche con valenza statistica praticamente identica. Il campione della bocca n.2 viene immediatamente privato dell'acqua tramite sgocciolatura, e conservato nella cartel con aggiunta di un adeguato volume di formalina tamponata al 4%, mentre il campione proveniente dalla bocca n.1 viene tenuto in un becker di vetro con acqua di mare, e visionato al binoculare da un operatore.

Durante questa operazione, le uova visionate, sono state separate dal resto del campione tramite aspirazione con una pipetta Pasteur, per limitare al minimo possibili danni dovuti alla manipolazione con l'uso delle pinzette da laboratorio. L'uovo aspirato con una parte di acqua del campione viene così passato in una capsula Petri contenente acqua di mare prefiltrata con filtri da 1 micron, alla quale è stato aggiunto iodio nella concentrazione di 50mg/L. (R. Cipriano et al., 2001). La soluzione di acqua di mare e iodio è stata utilizzata per eliminare eventuali parassiti e batteri presenti nella membrana esterna dell'uovo (corion) ed è stata fatta agire per trenta minuti, al termine dei quali le uova sono state sciacquate abbondantemente con acqua di mare filtrata e passata ad uno sterilizzatore a raggi UV.

Archiviazione dei dati e inizio della stabulazione

Terminata l'operazione di disinfezione delle uova, le stesse sono state poste singolarmente nei contenitori in plexiglass con un volume totale di acqua di mare filtrata e sterilizzata di 8 ml. Su ogni contenitore sono stati segnati la stazione, data e ora di campionamento, ed è stato assegnato un numero progressivo.

In parallelo su un prestampato cartaceo, per ogni numero corrispondente ad un uovo, sono stati annotati: stazione di campionamento, metodo di campionamento, ora e data, quando possibile lo stadio di sviluppo embrionale, e ove ritenuto opportuno sono state scritte delle note aggiuntive. (fig6).

BANSIC 14						UOVA
Numero	Stazione	Data	Ora	Specie	Stadio	NOTE

Figura 6: esempio di foglio di lavoro

Condizioni di stabulazione

I contenitori in plexiglass contenenti le uova sono stati posti nei ripiani dell'incubatore in ordine cronologico seguendo l'andamento temporale dei campionamenti alle varie stazioni.

Si è scelto di impostare la temperatura dell'incubatore sui 22.5 C°, rimanendo così molto vicini alle medie della temperatura dell'acqua superficiale nel canale di Sicilia nella stagione estiva.

Considerato il contributo positivo svolto dalla luce sullo sviluppo embrionale delle uova dei pesci (B. Blanco-Vives et al. 2011), è stata inserita una lampada a led da 3,5 watt ed un timer automatico per la regolazione dell'accensione e dello spegnimento. Il fotoperiodo è stato regolato seguendo le ore di luce e di buio del periodo.

Monitoraggio fotografico dello sviluppo embrionale

Le fasi dello sviluppo embrionale delle uova sono state seguite grazie alla visione delle stesse tramite stereoscopio Zeiss modello Stemi 2000C con fotocamera AxioCam erc5s incorporata, utilizzando varie funzioni del programma di acquisizione immagini AxioVision LE. I campioni sono stati osservati e fotografati dal momento del campionamento e a distanza di quattro ore fino alla schiusa della larva quando essa è avvenuta. L'intervallo di quattro ore è risultato essere ottimale nell'osservazione dello sviluppo embrionale delle uova che si trovano in fasi precoci di sviluppo, dandoci la possibilità di apprezzare i cambiamenti rapidi con la quale gli embrioni compiono le varie fasi che portano alla formazione dell'organismo. Di seguito riportiamo un esempio fotografico di alcune fasi di sviluppo embrionale monitorate fino ad arrivare alla schiusa della larva di alcune delle specie campionate. (fig8).

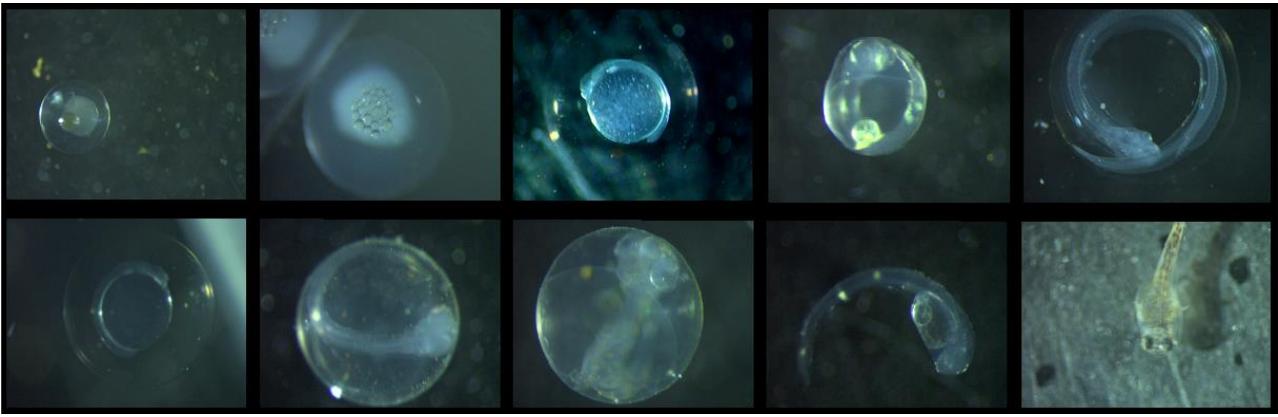


Figura 8: Esempio di uova e larve a vari stadi di sviluppo

I risultati preliminari incoraggianti ci hanno portato ad applicare tali metodologie anche fuori dai periodi in cui ricadono le campagne oceanografiche con lo scopo di supportare attività e progetti di ricerca. In particolare sono state seguite le fasi di sviluppo embrionale e larvale di *Sardina pilchardus*.

Il reperimento delle uova è stato effettuato tramite retini bongo 40 trainati dall' imbarcazione Bio4you in dotazione all'IAMC.

L'applicazione delle metodologie descritte è rimasta la stessa con la differenza se non per le temperature di incubazione e per il fatto che le fasi di incubazione sono state eseguite nei laboratori dell'IAMC-CNR di Capo Granitola, nei quali una migliore distribuzione degli spazi, e la presenza di strumentazioni di microscopia ottica con una maggior risoluzione, hanno aperto nuovi ed interessanti scenari (attualmente ancora in fase di studio) nella comprensione di alcuni aspetti riproduttivi ed ecologici della specie.

Ringraziamenti

Le attività svolte in questo lavoro sono state sostenute dal progetto bandiera Ritmare nell'ambito del SP2_WP4_AZ2.

Bibliografia

1. AHLSTROM EH, (1959) Vertical distribution of pelagic fish eggs and larvae off California and Baja California. *Fish Bull* 161:107–146
2. Armeri, G. M. and Cuttitta, A. and Bennici, C. D. and Biondo, G. and Torri, M. and Quinci, E. M. and Patti, C. and Patti, B. and De Luca, B. and Di Maria, A. and Falco, F. and Maneiro, I. and Masullo, T. and Musco, M. and Mazzola, S. (2015). Rapporto tecnico sulla valutazione della biomassa ittioplanctonica mediante l'utilizzo del Multi Plankton Sampler (MPS). Protocollo 6525TR2015 *CNR Solar*.
3. B. Blanco-Vives B, Aliaga-Guerrero M, Cañavate JP, Muñoz-Cueto JA, Sánchez-Vázquez FJ, (2011). Does lighting manipulation during incubation affect hatching rhythms and early development of sole? *Chronobiol Int* 28:300-306.
4. Cipriano, R. C., Novak, B. R., Flint, D. E. and Cutting, D. C., 2001. Reappraisal of the federal fish health recommendation for disinfection of eggs of Atlantic salmon in iodophor. *Journal of Aquatic Animal Health*, 13: 320–327.