

I.A.M.C.-C.N.R. di Capo Granitola



Report Tecnico: metodologia di editing immagini per analisi dati morfometrici dei primi stadi di sviluppo di *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758)

R. Graci^A, S. Russo^A, G. M. Armeri^A, I. Maneiro^A, C. Pattì^A, B. De Luca^A, M. Torri^A, C. Bennici^{AB}, G. Biondo^{AB}, G. Cangemi^A, M. Musco^A, T. Masullo^{AB}, E. Quinci^A, C. Monastero^A, F. Mangiaracina^C, F. Cali^C, S. Gianni^C, A. Nicosia^B, M. Tagliavia^B, S. Mazzola^C, A. Cuttitta^{AB}

- A. Laboratorio Creativo di Divulgazione Scientifica EDU Lab, 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. Laboratorio di Ecologia Molecolare e Biotecnologie, 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), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

Sommario

1. Introduzione	3
1.1 Biologia della specie <i>Engraulis encrasicolus</i>	4
2. Materiali e metodi	5
2.1 Acquisizione delle immagini	5
2.2 Elaborazione grafica delle immagini.....	6
2.3 Analisi delle immagini.....	10
BIBLIOGRAFIA	12

Indice Figure

Figura 1: Morfologia di larva di <i>Engraulis encrasicolus</i>	4
Figura 2 Area di distribuzione di <i>Engraulis encrasicolus</i>	5
Figura 3 Stereo-microscopio Zeissstemi 200-C, fotocamera AxioCamERc 5s	5
Figura 4 Originale.....	7
Figura 5 Punti di ancoraggio	7
Figura 6 Selezione del contorno da eliminare	8
Figura 7 Negativo dell'immagine.....	9
Figura 8 Finale.....	9
Figura 9 Aggiunta canale alfa.....	9
Figura 10 Zoom immagine finale	10
Figura 11 Zoom immagine iniziale.....	10
Figura 12 Parametri morfometrici.....	10
Figura 13 Lunghezza mascella	11
Figura 14 Lunghezza bocca.....	11

1. Introduzione

Tra le più importanti risorse alieutiche di molte regioni del Mar Mediterraneo vi sono le acciughe (*Engraulis encrasicolus*, Linnaeus, 1758), piccoli pesci pelagici appartenenti alle famiglie degli Engraulidae. Dati IREPA del 2009, hanno di fatto reso noto che in Italia, la pesca di *E. encrasicolus* rappresenta in media il 26% circa del pescato totale.

Questa specie viene continuamente monitorata e grazie a tali programmi è stato evidenziato che vi sono delle fluttuazioni inter-annuali molto pronunciate (Cergole et al., 2002; Cingolani, 2004), le cui cause possono essere molteplici, da fattori antropici come l'elevato sforzo di pesca a fattori naturali (Borjia et al., 1996). Va però posta molta attenzione sulle dinamiche biologiche ed ambientali che influiscono sulla sopravvivenza dei primi stadi di vita di questa specie, che ricadendo sul successivo reclutamento, possono essere una delle cause fondamentali delle contrazioni e degli incrementi annuali dello stock adulto (Thikonova et al., 2000; James et al., 2003; Cuttitta et al., 2003, 2006). Lo studio delle fasi ittioplanctoniche e delle sue relazioni con l'ambiente e gli altri organismi, risulta quindi di primaria importanza nell'ambito delle conoscenze necessarie per il corretto sfruttamento delle risorse alieutiche.

In questo contesto l'estrazione e l'analisi dei contenuti del tratto digerente, rappresenta una delle metodologie fondamentali per la caratterizzazione della dieta dei primi stadi larvali, per determinare a quali risorse fanno affidamento ed eventualmente poter confrontare tali richieste con quelle di altre specie, per poter così determinare se vi possa essere competizione.

Tale tecnica viene preceduta dall'analisi dei dati morfometrici (Blackith e Reyment, 1971; Marcus, 1990), ovvero l'acquisizione di variabili quantitative misurate a partire dalla morfologia dell'oggetto di studio, come distanze lineari, conte, angoli e rapporti. La successiva applicazione di metodi statistici multivariati, mira a quantificare le variazioni delle misure morfologiche tra i gruppi, metterle in relazione con tipo e taglia delle prede e verificare se vi sono cambiamenti nella scelta dell'alimento lungo l'accrescimento delle larve. L'obiettivo di questo elaborato è quindi di fornire un'adeguata metodologia di estrazione dei contenuti del tratto digerente di *E. encrasicolus* allo stadio larvale.

Questa specie è oggetto di studio delle campagne oceanografiche Ansic e Bansic organizzate ogni anno (dal 1997 ad oggi) dall'IAMC-CNR di Capo Granitola nel periodo estivo e condotte a bordo della N/O Urania e finalizzate allo studio delle relazioni tra le strutture oceanografiche a mesoscala (vortici verticali ed orizzontali, upwelling, ecc.) e le strutture spaziali dei fenomeni biologici relativi ai primi anelli della catena trofica (fitoplancton, zooplancton, distribuzione e abbondanza dei piccoli pelagici). Questa specie, oltre al valore economico, risulta interessante dal punto di vista biologico ed ecologico in quanto, condividendo periodo e zona di riproduzione con *Sardinella aurita* (Valenciennes, 1847), si possono instaurare fenomeni di competizione larvale (Palomera et al., 1990; Morote et al., 2008). In quest'ottica, l'analisi dei contenuti del tratto digerente risulta un'analisi necessaria per la determinazione della dieta e per la valutazione di una eventuale competizione con la specie affine *S.*

aurita. Lo studio delle fasi ittioplanctoniche, l'acquisizione e l'analisi dei dati morfometrici rappresenta una delle metodologie fondamentali per la caratterizzazione dimensionale e la valutazione di eventuali differenze morfologiche presenti in larve provenienti da diverse zone dell'area di studio, al fine di determinare la distribuzione e abbondanza degli stock ittici e delle performance di crescita e delle sue relazioni con altre variabili.

1.1 Biologia della specie *Engraulis encrasicolus*

Unica rappresentante della Famiglia degli Engraulidae in Mediterraneo (Tudela, 1999), l'acciuga europea *Engraulis encrasicolus* (fig. 1), appartiene all'Ordine dei Clupeiformi.

Il suo areale di distribuzione è molto ampio e va dall'Atlantico Nord Orientale e Centrale al Mar Mediterraneo, fino alle coste meridionali dell'Africa Occidentale.

È una specie gregaria e migratrice, dall'inizio della primavera alla fine dell'estate si riunisce in grandi banchi vicino alla costa per la riproduzione, per poi allontanarsi in acque più profonde in autunno (Patti et al., 2011). Tramite la valutazione dell'indice gonadosomatico e l'evoluzione degli stadi di maturità, è stato determinato che nel Canale di Sicilia il periodo riproduttivo si estende, approssimativamente, da marzo-aprile fino ad agosto-settembre, ma lo sforzo riproduttivo maggiore è nei mesi di luglio-agosto (Basilone et al., 2004, 2006). Questo periodo è coincidente con il picco di biomassa zooplanctonica (Garcia La fuente et al., 2002). I copepodi sono infatti maggiori prede per le acciughe adulte prima della deposizione ed anche le loro larve se ne nutrono. Le femmine producono circa 4.000 uova alla volta, rilasciate a piccoli lotti negli strati superficiali per lo più al tramonto (Varagnolo, 1965; Ghirardelli, 1967; Regner, 1985). Le uova emesse sono galleggianti, ellissoidali, poco più lunghe di 1 millimetro (Varagnolo, 1967; Regner, 1972; Ragusa 2000) e vengono affidate alle correnti marine.



Figura 1: Morfologia di larva di *Engraulis encrasicolus*

Le larve alla schiusa sono lunghe circa 2 mm e molte di esse sono destinate ad essere predate. Queste si nutrono principalmente di fito e zooplancton, in particolare di copepodi, cirripedi, larve di

molluschi, uova e larve di pesci (Catalan et al., 2010; Morote et al., 2010; Banarescu, 1964; Demir, 1963). Dal punto di vista morfologico sono allungate, presentano occhio subsferico e terminano tipicamente il loro intestino in corrispondenza della pinna dorsale e comunque all'incirca a $\frac{3}{4}$ della loro lunghezza totale.

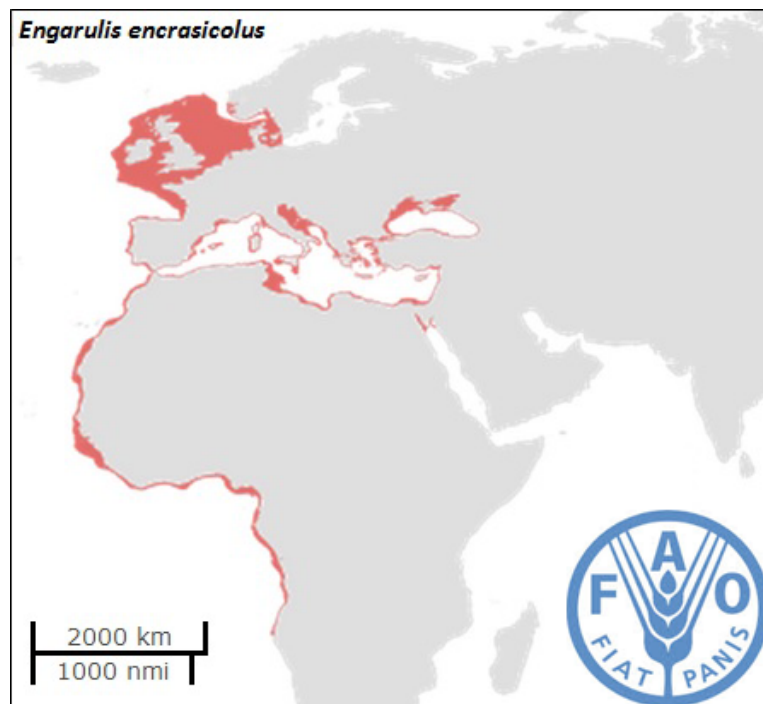


Figura 2 Area di distribuzione di *Engraulis encrasicolus*

2. Materiali e metodi

2.1 Acquisizione delle immagini

Dal punto di vista metodologico, il primo passo è ottenere dati morfometrici permettere in relazione le prede con le dimensioni della larva e con l'apertura boccale, ciò prevede l'acquisizione di immagini attraverso l'uso di stereo-microscopi con fotocamera integrata. Per questo elaborato è stato utilizzato stereo-microscopio zeissstemi 2000-C con fotocamera AxioCamERc 5s(Fig. 3).



Figura 3 Stereo-microscopio Zeissstemi 2000-C, fotocamera AxioCamERc 5s

Le foto delle larve, una volta editate, vengono acquisite mediante il software di elaborazione digitale delle immagini *AxioVision SE64 Rel.4.9*, che permette di memorizzare e gestire i file in modo strutturato.

Per facilitare l'acquisizione dell'immagine, le larve vengono prelevate dalle provette e disposte singolarmente in una capsula Petri di vetro dal diametro di 5 cm, con l'aiuto di una pipetta Pasteur, costituita da una tettarella in gomma e un tubicino sottile in vetro.

Con l'ausilio di aghetti appositi, si sistema la larva sul fianco in modo da farle assumere una posizione distesa, avendo cura di rimuovere l'eventuale liquido in eccesso utilizzato per la conservazione (alcol o acqua), che potrebbe disturbare l'immagine e impedire l'aderenza della larva sul fondo della Petri.

L'ingrandimento da utilizzare è quello tale da fare rientrare la larva nella foto nella sua interezza.

Una volta scattata la foto si assegna il nome specificando le informazioni della larva (data, punto di prelievo, specie ecc.) riportate sulla provetta, unite all'informazione relativa all'ingrandimento utilizzato in fase di acquisizione.

Per questa metodica sono necessarie anche altre due foto, una del dettaglio della testa e una che riprenda la bocca in posizione ventrale, questo, tramite le misurazioni, permetterà di mettere in relazione le dimensioni delle prede con l'apertura boccale.

Dopo lo scatto fotografico, le larve vengono conservate singolarmente in glicerolo al 50% in una provetta, su cui vengono annotati i parametri usati nel salvare la foto della larva corrispondente.

Tutte le provette vengono sistemate in un porta-provette e di ciascuna si appunta la posizione occupata, facilitandone così il recupero per la fase di apertura. Questa metodologia infatti prevede una manipolazione limitata della larva e la conservazione in glicerolo permette ai tessuti di ammorbidirsi e rendere più facile l'apertura dello stomaco e dell'intestino. I porta-provette vengono quindi conservati in frigo per evitare il deterioramento fino alla fase successiva.

2.2 Elaborazione grafica delle immagini

La prima fase dell'elaborazione dell'immagine avviene attraverso il software di fotoritocco. Il software usato, GIMP è un versatile pacchetto Open Source, utile per la manipolazione grafica e dotato di una interfaccia personalizzabile. Mediante questo software è possibile modificare le imperfezioni foto digitali, correggere la distorsione causata dalla prospettiva, modificare colori, luminosità contrasti, clonare parti di immagine, insomma, ha molte funzionalità avanzate per l'editing di immagini.

Preleviamo una immagine di larva di *Engraulis encrasicolus* acquisita mediante stereo-microscopio Zeiss stemi 200-C dotato di fotocamera AxioCamERc 5s in formato .tif a una risoluzione di 20Mpixel.



Figura 4 Originale

Passi da eseguire per l'elaborazione:

Innanzitutto viene migliorato l'aspetto dell'immagine aumentandone il contrasto e modificando la luminosità e la densità cromatica per rendere più semplice la ricognizione dei punti di interesse per la misurazione delle larve attraverso gli strumenti accessibili sotto la voce principale del menù "Colori".

A questo punto bisogna aumentare il livello di zoom della foto, mediante uno strumento situato in basso a sinistra nella finestra centrale di GIMP, per visualizzare meglio i particolari.



A questo punto bisogna selezionare lo strumento "penna stilografica" per definire il tracciato dell'immagine cercando di ricalcare nella maniera più precisa possibile i bordi del soggetto da cui eliminare lo sfondo. Clicca con il tasto sinistro del mouse su tutti i bordi del soggetto generando delle ancore di collegamento distanziate l'una dall'altra. Perfeziona la selezione dell'immagine spostando i punti di ancoraggio in modo che aderiscano perfettamente al profilo del soggetto da scontornare.

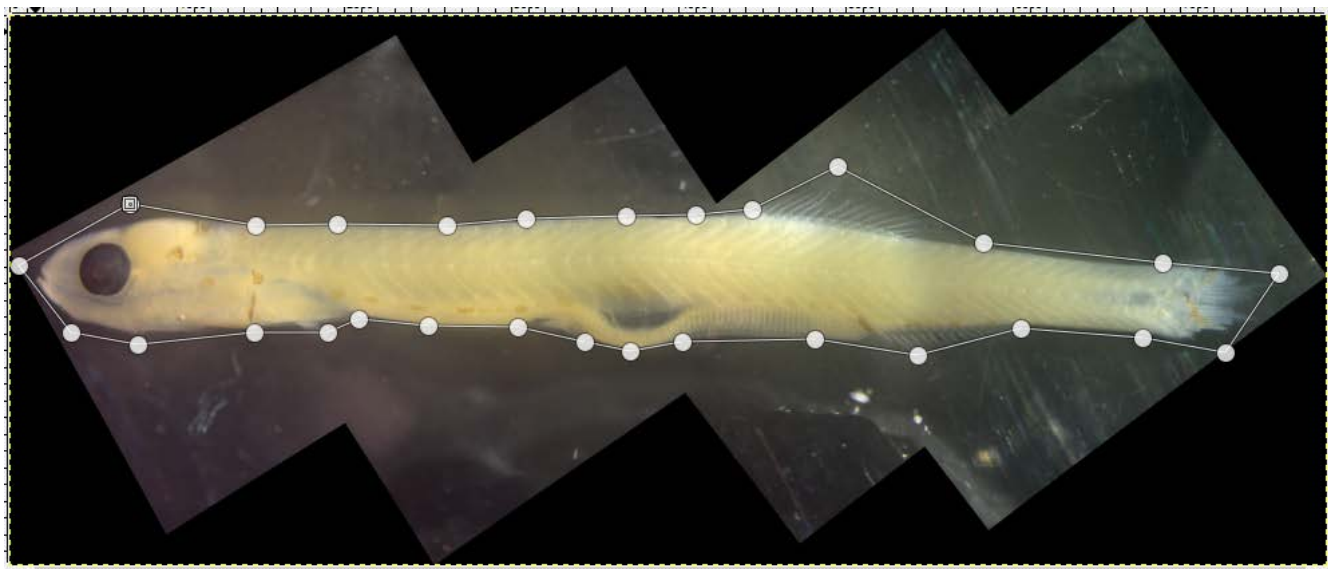


Figura 5 Punti di ancoraggio

Successivamente bisogna trasformare il tracciato in selezione, cliccando sul pulsante “Selezione dal tracciato” che si trova nella barra degli strumenti nel menù Seleziona di GIMP.



Per le aree difficili da selezionare, bisogna procedere manualmente utilizzando lo strumento “Selezione libera”.



Nell'area delle opzioni dello strumento “Selezione libera” bisogna verificare che sia selezionata l'opzione che permette di “aggiungere alla selezione corrente” che è possibile visualizzare nella figura di fianco.

Appena si è soddisfatti del lavoro effettuato, bisogna invertire la selezione: sempre dal menù “Seleziona”, basta cliccare sulla voce inverti, per permettere di selezionare solo lo sfondo della foto, che dovrà essere cancellato per scontornare del tutto l'immagine.

Di seguito è possibile vedere una immagine della selezione completa.



Figura 6 Selezione del contorno da eliminare

Prima di cancellare lo sfondo della foto, sempre utilizzando il menù Seleziona di GIMP, bisogna scegliere la voce “Sfumata” per smussare gli angoli della selezione e renderla più precisa. Nella finestra che si apre, impostare un valore adeguato alle proprie esigenze, noi abbiamo scelto il valore 100 per questa immagine, per non perdere dettagli dell'immagine, e successivamente cliccare sul pulsante OK per salvare i cambiamenti.



A questo punto, creando un livello nuovo sull'immagine, e mantenendo attiva la selezione, è possibile creare una maschera per verificare che l'immagine sia scontornata correttamente, utilizzando lo strumento “Riempimento colore” che è possibile vedere qui di fianco.

Se non si è soddisfatti della definizione dei contorni dell'immagine tornare indietro e ripetere lo strumento “Selezione sfumata” con valori differenti.

Di seguito è possibile vedere la maschera che si crea seguendo i passi sopraelencati.

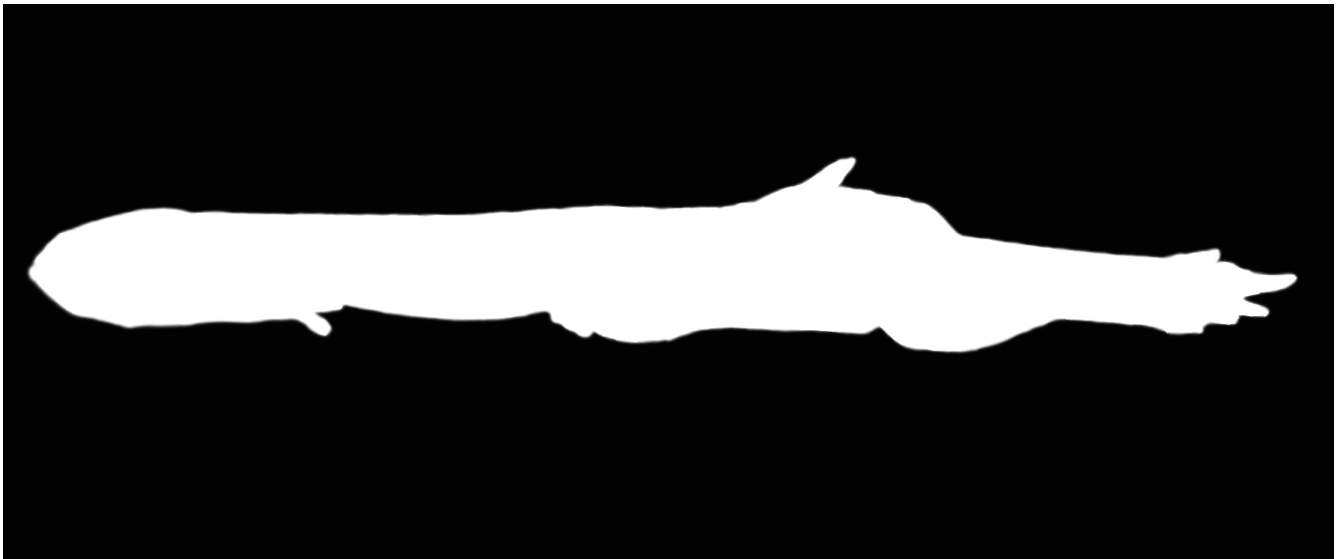


Figura 7 Negativo dell'immagine

Un' alternativa alla selezione sfumata sarebbe l'utilizzo dello strumento "Pennello", che, attraverso una visualizzazione molto zoomata dell'immagine, permette di colorare manualmente la selezione, mantenendo il più possibile intatti i contorni dell'immagine.



Figura 8 Finale

Se necessario è possibile eliminare completamente lo sfondo, mantenendo la selezione e "aggiungendo il canale alfa" all'immagine, usando lo strumento "Trasparenza" del menù "Livello", come si può vedere nella figura seguente.



Figura 9 Aggiunta canale alfa

Di seguito un confronto tra l'immagine originale e l'immagine editata:

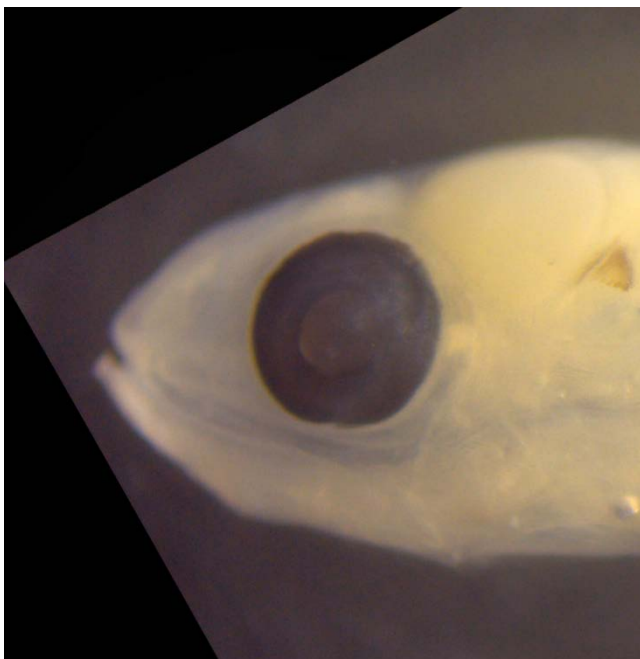


Figura 11 Zoom immagine iniziale

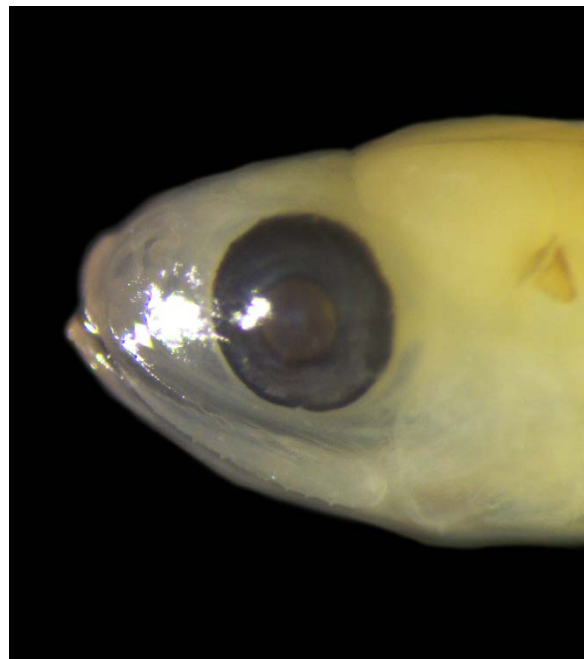


Figura 10 Zoom immagine finale

2.3 Analisi delle immagini

Per acquisire i parametri morfometrici delle larve dalle foto si utilizza il software di gestione ed elaborazione immagini Image Pro Plus© (IPP). La metodica utilizzata è quella proposta da Torri et al. (2016). I parametri morfometrici utilizzati sono quelli proposti da Diaz et al. (2009) (Fig. 11):

- Lunghezza Totale (TL): dall'estremo anteriore della mandibola superiore all'estremità della pinna caudale.
- Lunghezza Standard (SL): dall'estremo anteriore della mandibola superiore all'estremità della notocorda.
- Lunghezza della testa (HL): Dall'estremo anteriore della mandibola superiore alla pinna pettorale.
- Larghezza del corpo in direzione della pinna pettorale (BD).
- Diametro dell'occhio (ED).
- Lunghezza anale (AL): dall'estremo anteriore della mandibola superiore all'estremità del tubo digerente.

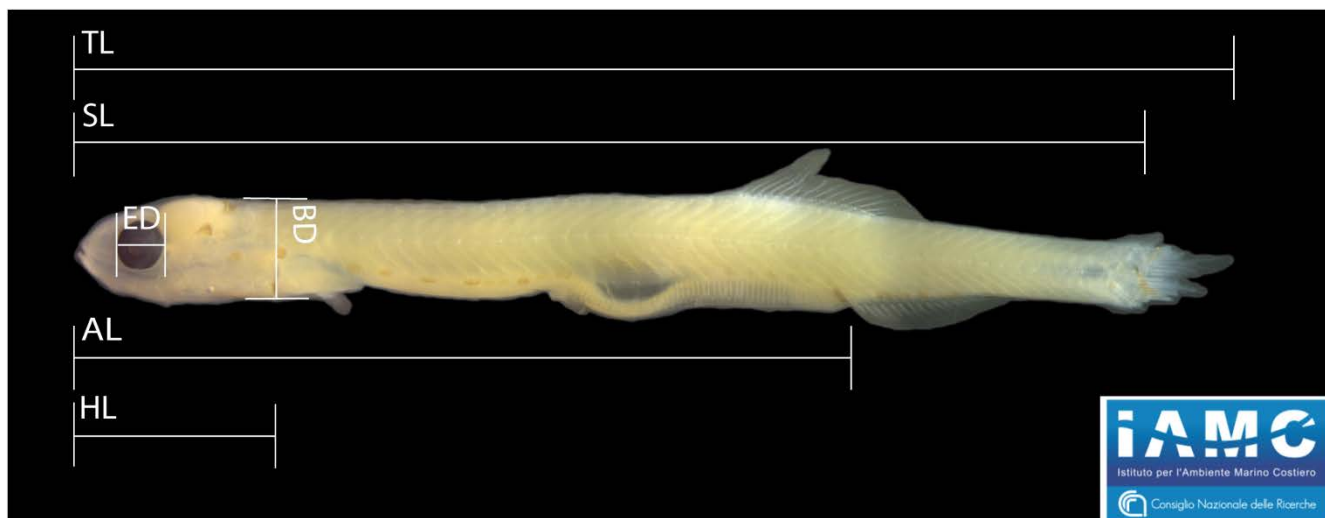


Figura 12 Parametri morfometrici

Dalle foto di dettaglio della testa e della bocca ripresa ventralmente si prendono altre due misure:

- Lunghezza della mascella (JL): dall'estremo anteriore della mandibola al punto terminale della bocca.
- Lunghezza della bocca (MW): dalla foto ventrale da un estremo all'altro della mascella.



Figura 14 Lunghezza bocca

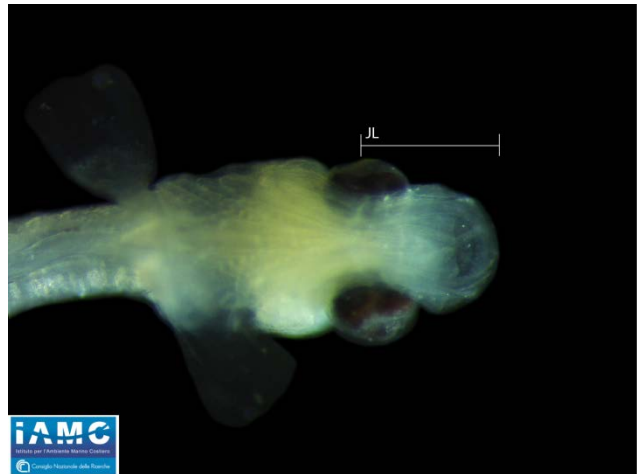


Figura 13 Lunghezza mascella

Terminata la fase di acquisizione dati dalle foto è possibile selezionare le classi di taglia di interesse per lo studio dei contenuti del tratto digerente.

Terminata questa fase tutte le foto raccolte vengono riconosciute e catalogate e le misure di ogni preda vengono riportate su un foglio di calcolo Excel utile per le analisi statistiche successive.

BIBLIOGRAFIA

- Ananiades, C. I. (1952). *Quelques considérations biométriques sur l'allache (Sardinella aurita CV) des eaux grecques*. *Prak. Hell. Hydrobiol. Inst*, 5, 5-45.
- Bănărescu P., 1964. *Fauna Republicii Populare Romine*, 13. *Pisces-Osteichthyes (Pestiganoizi si ososi)*.
Academiei Republicii Populare Romine, Bucharest, 959 pp.
- Basilone, G., Guisande, C., Patti, B., Mazzola, S., Cuttitta, A., Bonanno, A., Kallianiotis, A. 2004. *Linking habitat conditions and growth in the European anchovy (Engraulis encrasicolus)*, *FISHERIES RESEARCH (04223J0)* 68, 9- 19.
- Basilone G., Guisande C., Patti B., Mazzola S., Cuttitta A., Bonanno A., Vergara A.R., Maneiro I., *Effect of habitat conditions on reproduction of the European anchovy (Engraulis encrasicolus) in the Strait of Sicily*, *FISHERIES OCEANOGRAPHY (11620J0)*, 2006, 15:4, 271-280.
- Bauchot, M.L. (1987). *Poissons osseux*. In: W. Fischer, Schneider, M. and M.-L. Bauchot (eds.), *Fishes FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche: Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. Volume II. Vertèbres.*, pp. 861-1422. Food and Agricultural Organisation of the United Nations, Rome.
- Ben-Tuvia, A. (1960). *Synopsis of biological data on Sardinella aurita of the Mediterranean Sea and other waters*.
Fisheries Division, Biology Branch, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Bethoux, J. P., Gentili, B., Morin, P., Nicolas, E., Pierre, C., & Ruiz-Pino, D. (1999). *The Mediterranean Sea: a miniature ocean for climatic and environmental studies and a key for the climatic functioning of the North Atlantic*. *Progress in Oceanography*, 44(1), 131-146.
- Blackith, R. E., & Reyment, R. A. (1971). *Multivariate morphometrics*.
- Borja, A., A. Uriarte, V. Valencia, L. Motos & A. Uriarte, 1996. *Relationships between anchovy (Engraulis encrasicolus, L.) recruitment and the environment in the Bay of Biscay*. *Sci. mar.* 60:179–192.
- Cergole, Maria Cristina, Saccardo, Suzana Anita, & Rossi-Wongtschowski, Carmen L. D. B.. (2002). *Fluctuations in the spawning stock biomass and recruitment of the Brazilian sardine (Sardinella brasiliensis) 1977-1997*. *Revista Brasileira de Oceanografia*, 50(unico), 13-26.
- Cingolani, N., Santojanni, A., Arneri, E., Berlardinelli, A., Colella, S., Donato, F., ... & Marceta, B. (2004). *Anchovy (Engraulis encrasicolus, L.) stock assessment in the Adriatic Sea: 1975-2003*. *GFCM-SAC Working Group on Small Pelagic Species (Malaga, 6th-7th May 2004)*. *FAO-MiPAF Scientific Cooperation to Support Responsible Fisheries in the Adriatic Sea*. *GCP/RER/010/ITA/OP-14*. *AdriaMed Occasional Papers*, 14(10).
- Cury, P., & Fontana, A. (1988). *Compétition et stratégies démographiques comparées de deux espèces de sardinelles (Sardinella aurita et Sardinella maderensis) des côtes ouest-africaines*. *Aquatic living resources*, 1(03), 165-180.
- Cuttitta A., Cavalcante C., Basilone G., Buscaino G., Garcia A., Garcia Lafluyente J., Bonanno A., Patti B., Mazzola S., Avellone P. 2003. *Distribuzione di uova e larve di Sardinella aurita in relazione alle condizione oceanografiche nel canale di Sicilia*, *BIOLOGIA MARINA MEDITERRANEA*, 2003, 10(2), 990-993
- Cuttitta, A., Carini, V., Patti, B., Bonanno, A., Basilone, G., Mazzola, S. & Cavalcante, C. (2003). *Anchovy egg and larval distribution in relation to biological and physical oceanography in the Strait of Sicily*. In *Migrations and Dispersal of Marine Organisms* (pp. 117-120). Springer Netherlands.

- Cuttitta, A., Guisande, C., Riveiro, I., Maneiro, I., Patti, B., Vergara, A. R. & Mazzola, S. (2006). Factors structuring reproductive habitat suitability of *Engraulis encrasicolus* in the south coast of Sicily. *Journal of fish biology*, 68(1), 264-275.
- Demir N., 1963. Synopsis of biological data on anchovy *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus) 1758 (Mediterranean and 1963 adjacent seas). FAO Fish.Synop. 26, 41.
- Díaz, M. V., Pájaro, M., & Sánchez, R. P. (2009). Employment of morphometric variables to assess nutritional condition of Argentine anchovy larvae *Engraulis anchoita* Hubbs & Marini, 1935. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr*, 44(3), 539-549.
- Froese, R., & Pauly, D. (2007). World wide web electronic publication. World Wide Web electronic publication.
- James, A., J. W. Pitchford & J. Brindley, 2003. The relationship between plankton blooms, the hatching of fish larvae, and recruitment. *Ecol. Model.* 160: 77–90.
- García Lafuente, J., García, A., Mazzola, S., Quintanilla, L., Delgado, J., Cuttitta, A., Patti, B., (2002). Hydrographic phenomena influencing early life stages of the Sicilian Channel anchovy. *Fisheries Oceanography*, 11: 31- 44.
- Ghirardelli E., 1967. I fattori che regolano la microdistribuzione superficiale del plancton: la temperatura. *Boll. Soc. Adriatica Sci.* 55, 18-86.
- Marcus L. F., 1990 - Traditional morphometrics. In Rohlf, F. J., & Bookstein, F. L. (1990). *Proceedings of the Michigan morphometrics workshop.* University of Michigan Museum of Zoology.
- Morote, E., Olivar, M. P., Villate, F., & Uriarte, I. (2008). Diet of round sardinella, *Sardinella aurita*, larvae in relation to plankton availability in the NW Mediterranean. *Journal of plankton research*, 30(7), 807-816.
- National Statistical Service of Hellas. – 1990-2002. *Statistical Yearbooks.* NSSH, Athens.
- Palomera, I., & Sabatés, A. (1990). Co-occurrence of *Engraulis encrasicolus* and *Sardinella aurita* eggs and larvae in the northwestern Mediterranean.
- Patti B., Bonanno A., D'Elia M., Quinci E., Giacalone G., Fontana I., Aronica S., Basilone G., Mazzola S., 2011. Daytime pelagic schooling behaviour and relationships with plankton patch distribution in the Sicily Strait (Mediterranean Sea). *Advances in Oceanography and Limnology* 14, 79-92.
- Regner S., 1972. Contribution to the study of the ecology of the planktonic phase in the life history of the anchovy in the Central Adriatic. *Acta Adriat.* 14 (9), 3-31.
- Regner S., 1985. Ecology of the planktonic stages of the anchovy, *Engraulis encrasicolus* (Linnaeus, 1758), in the Central Adriatic Sea. *Acta Adriat.* 26, 1-113.
- Sabates, A., Martin, P., Lloret, J., & Raya, V. (2006). Sea warming and fish distribution: the case of the small pelagic fish, *Sardinella aurita*, in the western Mediterranean. *Global Change Biology*, 12(11), 2209-2219.
- Tikhonova, I., O. Arino, G. Ivanitskij, H. Malchow & A. Medvinskij, 2000. The dependence of fish school movement and plankton spatial distributions on the phytoplankton growth rate. *Biofizika* 45: 352–359.
- Tsikliras, A. C., & Antonopoulou, E. (2006). Reproductive biology of round sardinella (*Sardinella aurita*) in north- eastern Mediterranean. *Scientia Marina*, 70(2), 281-290.
- Tudela S., 1999. Morphological variability in a Mediterranean, genetically homogeneous population of the European anchovy, *Engraulis encrasicolus*. *Fish Res* 42, 229-243.

Varagnolo S., 1965. Alcune osservazioni sulla distribuzione delle uova galleggianti di Teleostei nell'Alto Adriatico. *Boll. Zool.* 32 (2), 849-858.

Varagnolo S., 1967. Osservazioni sulla riproduzione dell'*Engraulis encrasicolus* L. (Acciuga) dell'alto Adriatico. *Arch. Oceanog. Limnol.* 15, 71-81.