



Università di Trieste
Ecologia dei cambiamenti Globali
Corso di EcoFisiologia Animale

M. Perosa

Morphological analysis of erythrocytes of an Antarctic teleost under heat stress: Bias of the stabling effect

*D. Rizzotti, C. Manfrin, M. Gerdol, S. Greco, G. Santovito, P. G. Giulianini
2021*



Trematomus Bernacchii



*STUDIO del 2017
pubblicato nel 2021*

*per investigare gli effetti dello stress dovuto ad aumento di temperatura,
che possono portare a
stress respiratori ed anomalie morfologiche di eritrociti e nuclei*

*L'analisi della morfologia degli eritrociti è un buon indicatore dello stress
(Spasić et al., 2020)*

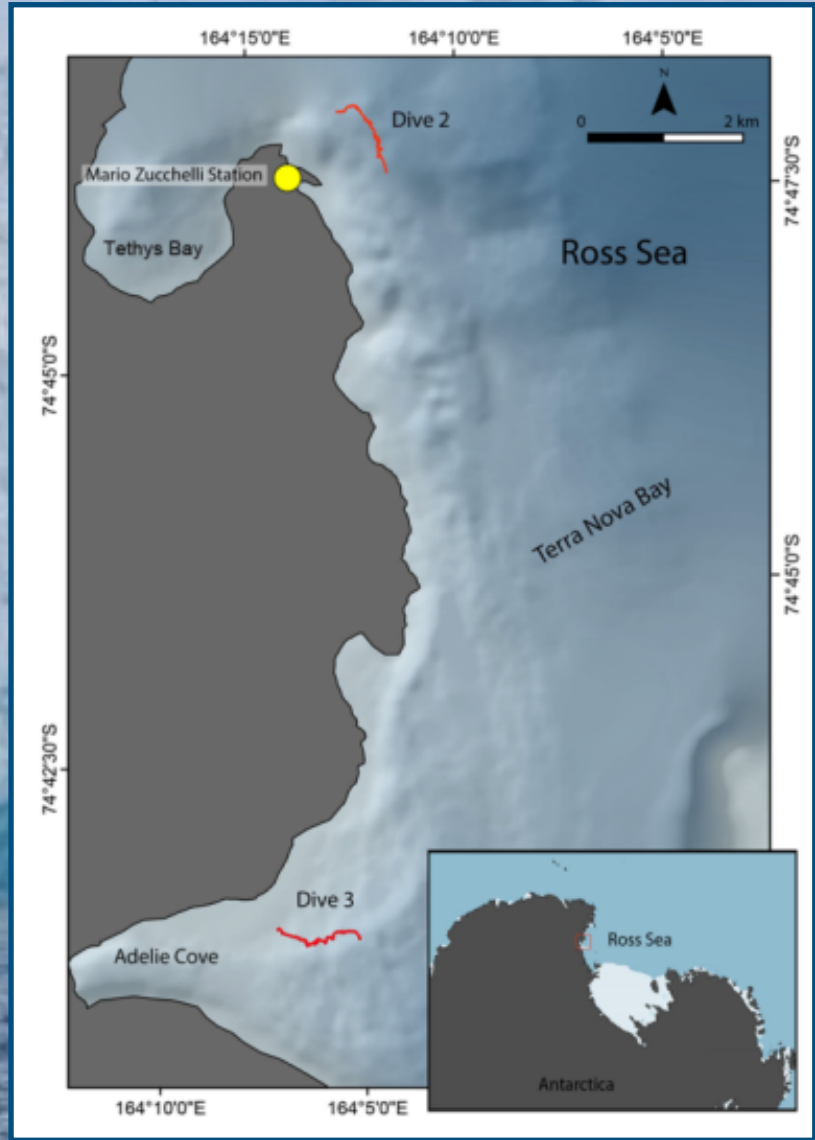
*Anomalie nucleiche sono biomarker per lo stress termico
(Zafalon-Silva et al., 2017)*

INTRODUZIONE



Terra Nova Bay

*Italian Station
Mario Zucchelli
74.694206°S
164.113869°E*



Le temperature nei siti di latitudine più alta, come nel Mare di Ross, variano ogni anno di meno di 1,5°C al di sopra di un minimo di -1,9°C, il punto di congelamento dell'acqua di mare
(*Hunt et al., 2003*)

La stagionalità della luce, e la temperatura sono rimaste pressoché invariate nella regione Antartica per almeno 15 e probabili 25 milioni di anni.
(*Clarke and Johnston, 1996*)

Queste condizioni hanno portato ad una **fauna stenoterma** con poche capacità di resistere ad elevate temperature
(*Somero and DeVries, 1967; Peck, 2002*)

La regione intorno alla penisola Antartica è una delle zone più velocemente riscaldate della Terra
+3°C temperatura dell'aria
+1°C temperatura superficie mare
negli ultimi 50 anni
(*Meredith and King, 2005*)

Trematomus bernacchii

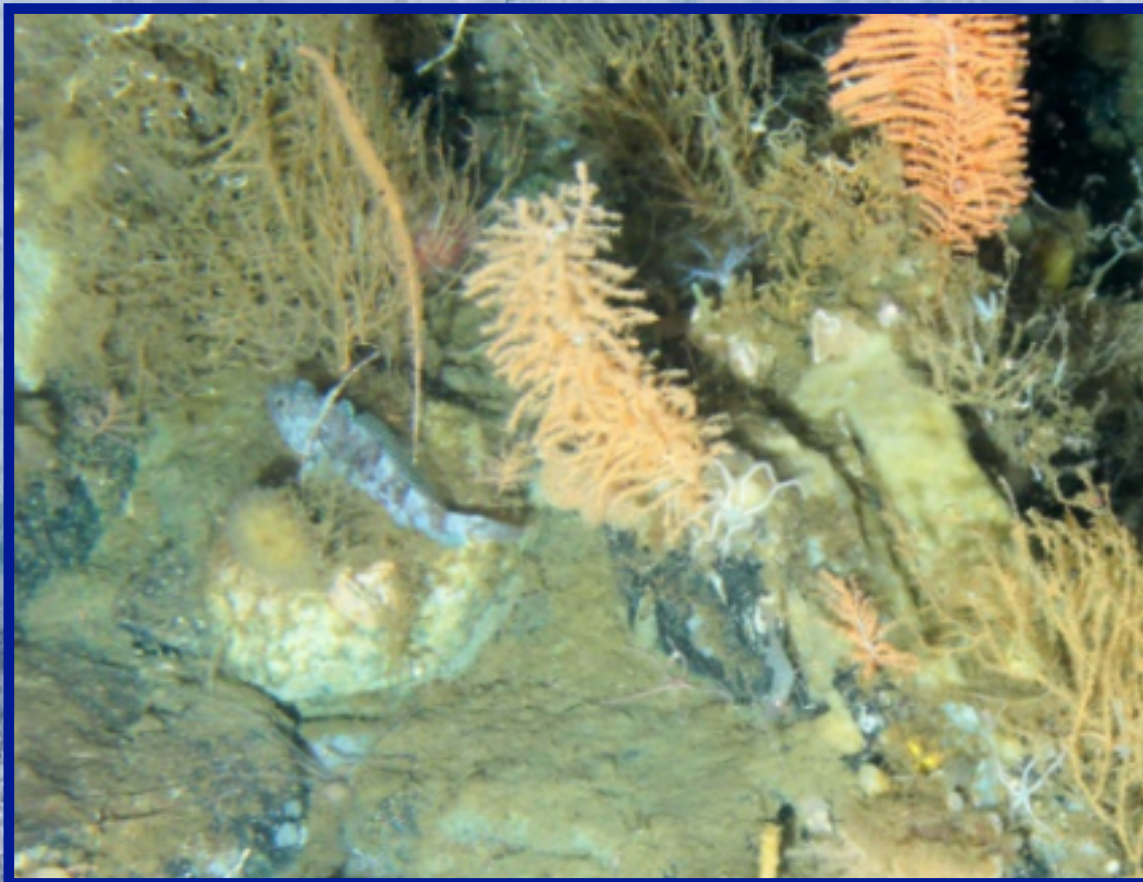


Classificazione scientifica

Dominio	Eukaryota
Regno	Animalia
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Classe	Actinopterygii
Ordine	Perciformes
Famiglia	Nototheniidae
Genere	<i>Trematomus</i>
Specie	<i>T. bernacchii</i>

Nomenclatura binomiale

Trematomus bernacchii
BOULENGER, 1902



**Specie nativa dell'Oceano Antartico,
vive tra 0 e 200 m**

**quasi esclusivamente su fondi duri,
densamente ricoperti da alcyonaceans,
spugne, bryozoans, polychaete, ophiuroids,
holoturians, echinoids**

*La Mesa, M.; Canese, S.; Montagna, P.; Schiaparelli, S.
Underwater Photographic Survey of Coastal Fish Community of Terra Nova Bay,
Ross Sea. Diversity 2022, 14, 315. <https://doi.org/10.3390/d14050315>*

♀ ~ 35 cm

♂ ~ 28 cm

età massima: ~10 anni

**Spine dorsali 4-6
spine dorsali morbide 34 - 39**

**Si ciba di
policheti, gasteropodi, isopodi,
qualche alga,
con variabilità stagionale.**

E' preda di pinguini e talvolta foche

Si riproduce una volta ogni anno

*Dewitt, H.H., P.C. Heemstra and O. Gon, 1990.
Nototheniidae. p. 279-331. In O. Gon and P.C. Heemstra (eds.)
Fishes of the Southern Ocean.
J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown, South Africa.*

**Varietà adattamenti fisiologici e biochimici
degli notothenioidi antartici
necessari per mantenere la funzionalità fisiologica
in ambiente estremamente freddo:**

*alta concentrazione di soluti nel sangue
proteine antigelo
riduzione ematocrito
polimerizzazione “a freddo” e stabile di tubuli e microtubuli
enzimi con efficienza catalizzatrice elevata
maggior quantità di mitocondri
viscosità delle membrane cellulari
(Beers and Jayasundara, 2012; Peck, 2018)*

CONDIZIONI AMBIENTALI STABILI

**↑ ADATTAMENTI ↓ PRESSIONE SELETTIVA
↑ COSTI DI MANTENIMENTO TRATTI FUNZIONALI
IDONEI A CONTRASTARE
FLUTTUAZIONI DI TEMPERATURA.
*ci sono variazioni inter-specifiche***

METODO

Raccolti con esche posizionate in trappole a 20 - 25 m di profondità
45 esemplari, 255 ± 28 mm

5 esemplari letalmente anestetizzati
per ottenere il gruppo ***environmental control***

40 esemplari acclimatati per una settimana in vasche da 1500 L a -0.9°C



20 esemplari - gruppo di controllo,
acquario di vetro da 180 L, mantenuti a -0.9°C

20 esemplari - per l'esperimento,
acquario di vetro da 180 L, mantenuti a $+0.6^{\circ}\text{C}$

5 esemplari sacrificati per gruppo/ per prelievo

Time 0

6 ore

7 giorni

19 giorni

Temperature dell'acqua rilevate ogni 15 minuti



Prelievo di sangue dal cuore dei pesci,

poi preparato in due diversi tipi di resine:
LRWhite ed *Embed 812 - Araldite*;

Taglio delle sezioni ed esame delle immagini

Analisi delle immagini

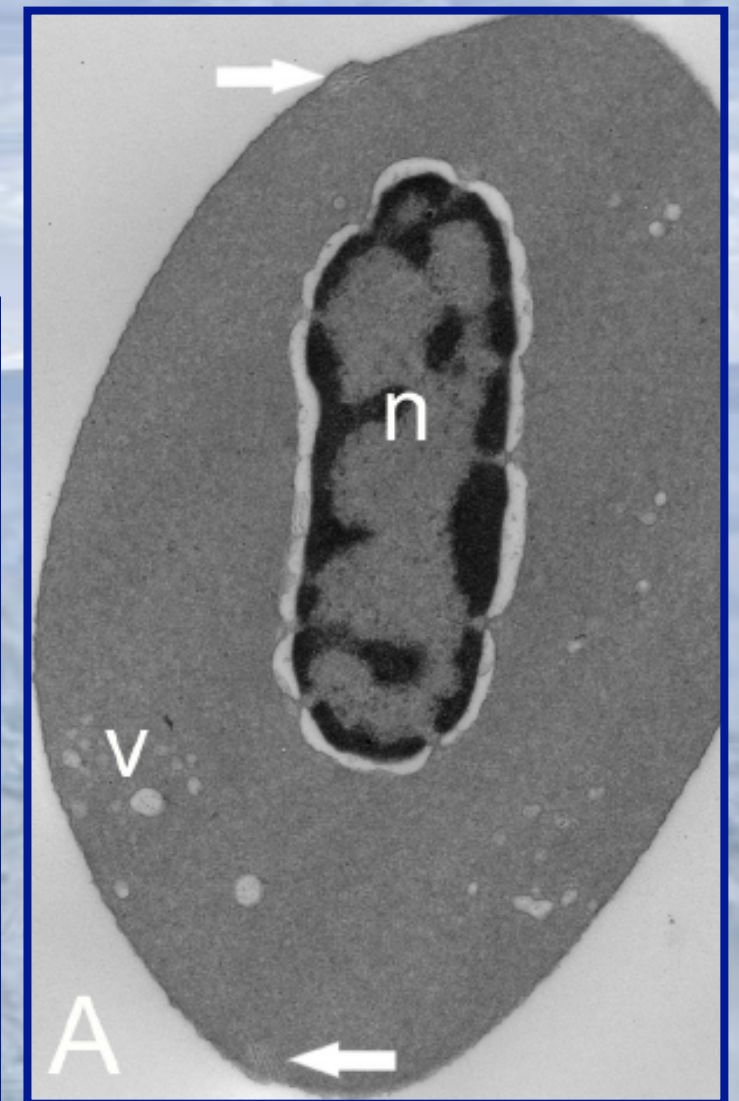
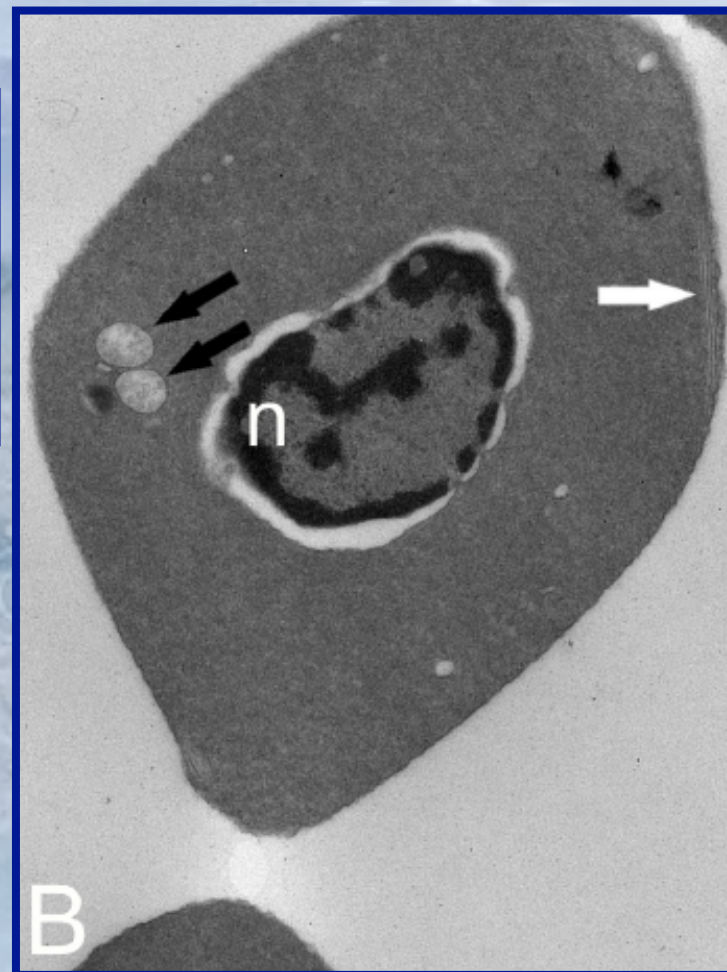
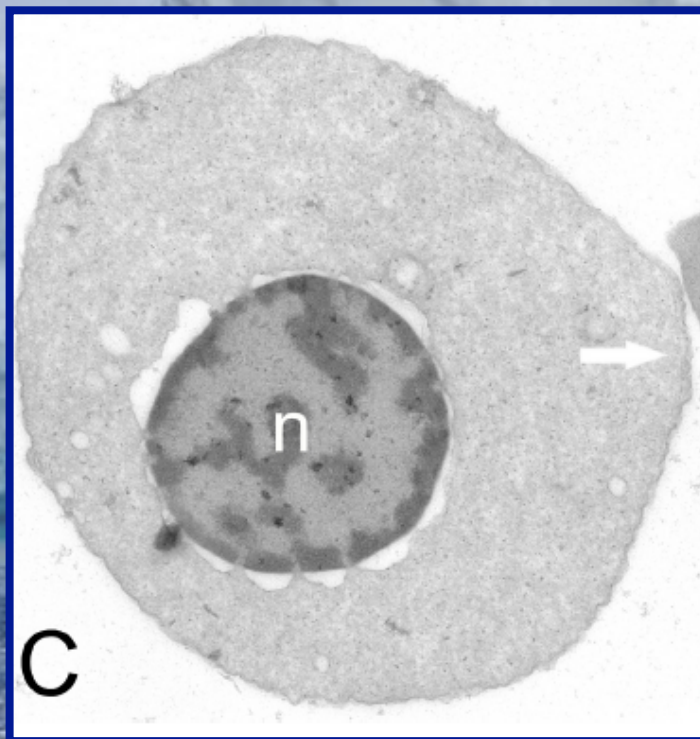
Analisi delle morfologie degli eritrociti (Polygon Selection)
area, circularity, roundness

Analisi dei nuclei
area, circularity, roundness, solidity

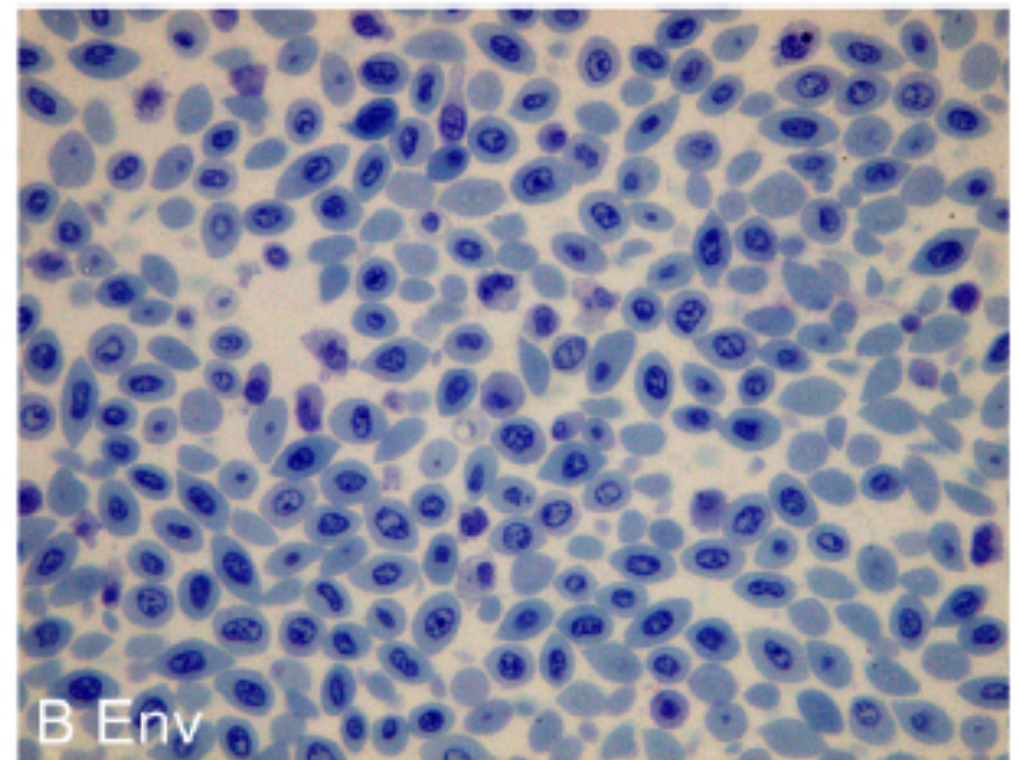
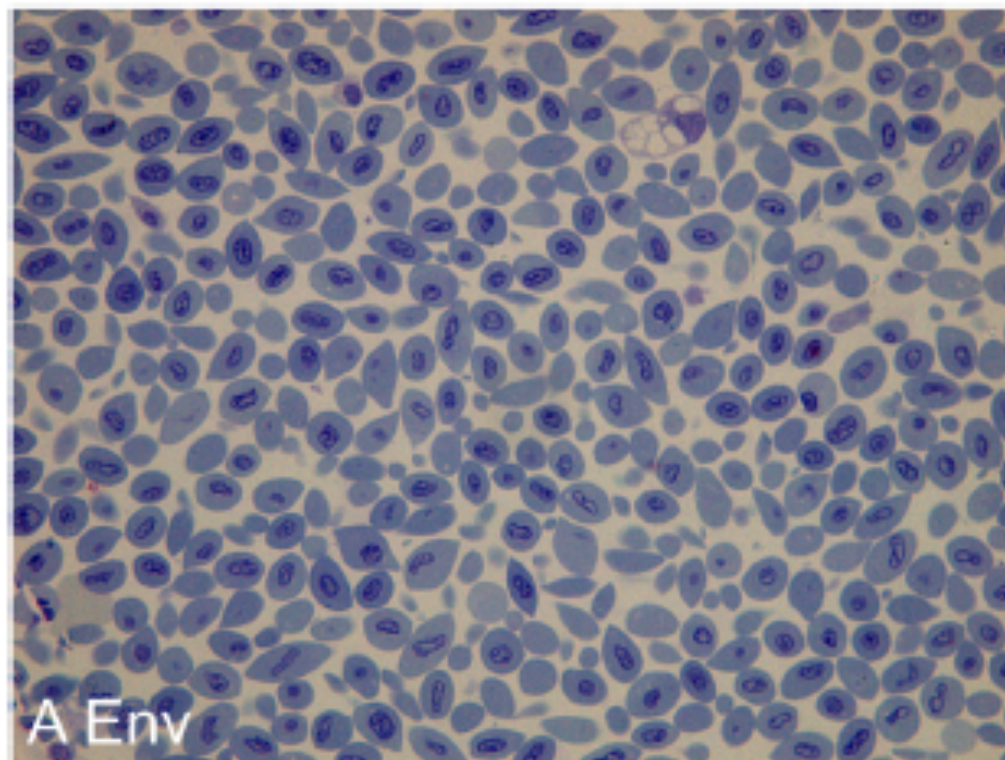
Analisi statistiche (Rversion4.0.0) e delle covarianti (ANCOVA)

RISULTATI

gruppo *Environmental control*:
eritrociti dal profilo ovale
max \varnothing $\sim 10.5\mu\text{m}$
min \varnothing $7\mu\text{m}$

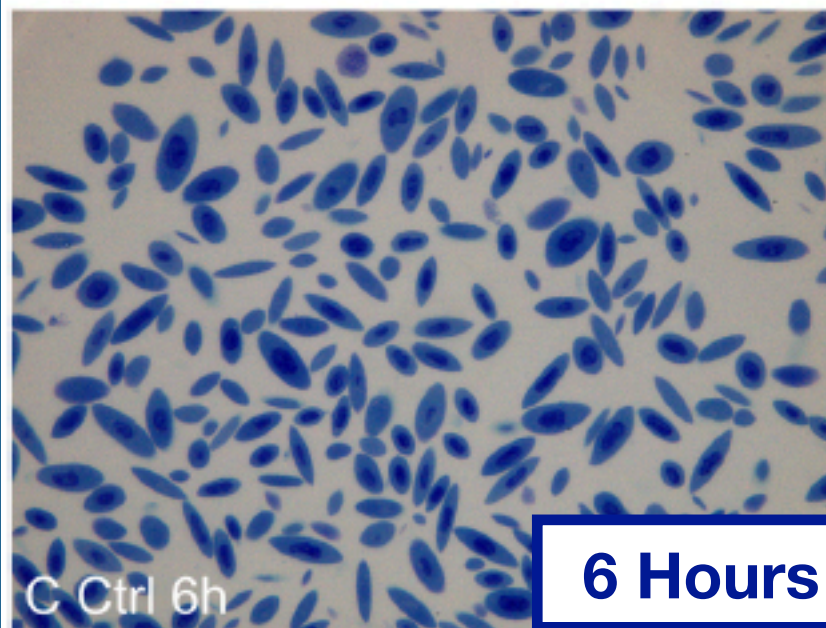


“Environmental”

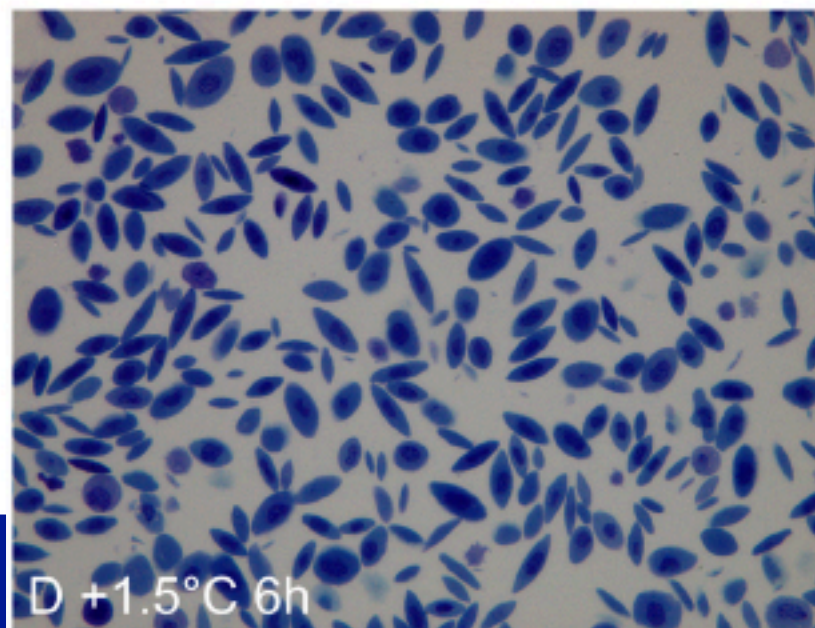


-0.9°C

**gruppo
controllo**

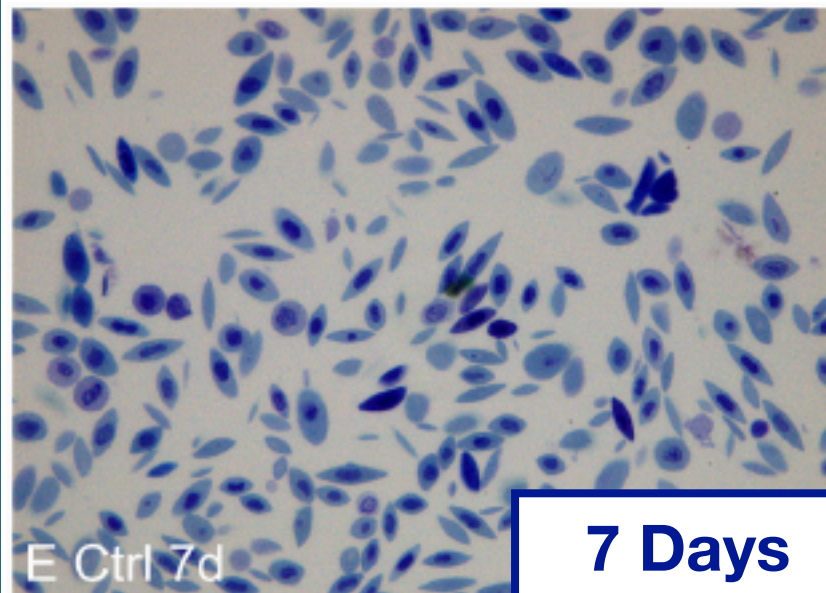


6 Hours

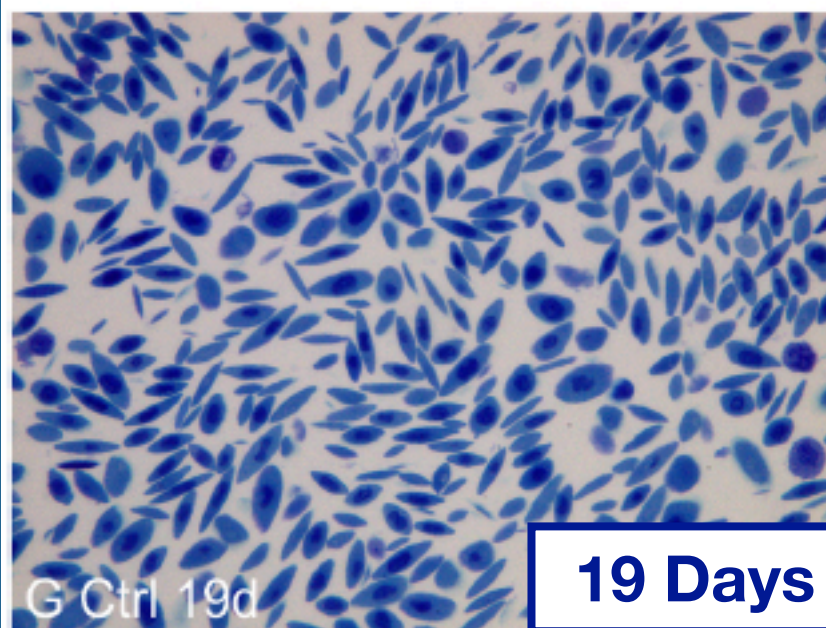
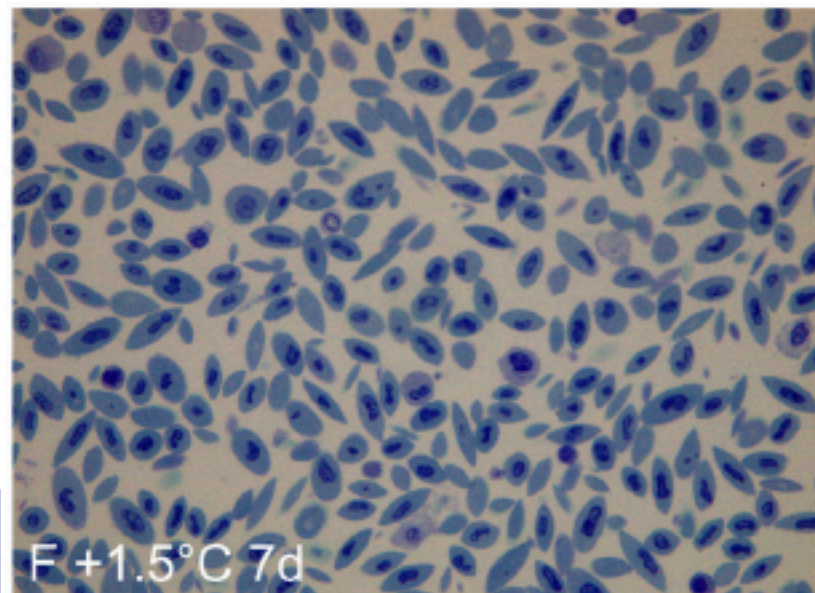


+ 0.6°C

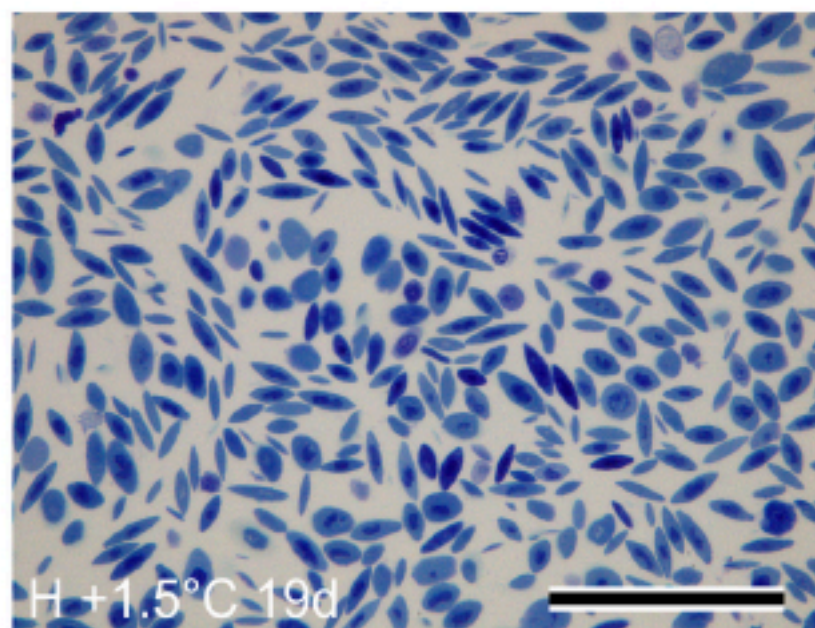
**gruppo
sperimentale**



7 Days



19 Days



Analisi area, circolarità, rotondità eritrociti

	Environmental	Time 0		6 h		7 days		19 days	
		Control	+1.5 °C	Control	+1.5 °C	Control	+1.5 °C	Control	+1.5 °C
Area									
Embed812-	48.89 ± 5.08	44.57 ± 7.44	47.33 ± 2.55	37.75 ± 5.94	36.62 ± 4.79	38.54 ±	37.00 ± 6.38	37.37 ± 6.42	31.58 ± 4.49
Araldite						12.13			
LR White	73.23 ± 9.31	66.43 ± 10.99	71.09 ± 13.25	53.71 ± 2.16	56.99 ± 9.94	65.43 ± 16.46	54.91 ± 16.34	63.41 ± 16.54	53.48 ± 16.47
Circularity									
Embed812-	0.911 ± 0.018	0.810 ±	0.820 ±	0.752 ±	0.732 ±	0.732 ±	0.691 ± .050	0.672 ±	0.626 ±
Araldite		0.034	0.030	0.023	0.014	0.065		0.079	0.051
LR White	0.902 ± .0013	0.079 ± 0.039	0.800 ± 0.027	0.746 ± 0.039	0.715 ± 0.012	0.706 ± 0.034	0.682 ± 0.049	0.681 ± 0.056	0.644 ± 0.029
Roundness									
Embed812-	0.738 ± 0.044	0.055 ±	0.566 ±	0.473 ±	0.457 ±	0.463 ±	0.414 ±	0.402 ±	0.356 ±
Araldite		0.044	0.037	0.020	0.016	0.060	0.046	0.072	0.040
LR White	0.727 ± 0.029	0.538 ± 0.057	0.543 ± 0.034	0.471 ± 0.034	0.440 ± 0.019	0.445 ± 0.031	0.415 ± 0.050	0.412 ± 0.056	0.376 ± 0.029

**Non sono emerse differenze significative
tra le due condizioni sperimentali**

**Differenze significative emergono tra i parametri iniziali e finali
dell'esperimento:
decremento evidente già dopo i 7 giorni di acclimatazione
continua fino al termine dell'esperimento**

812 Araldite

LR White

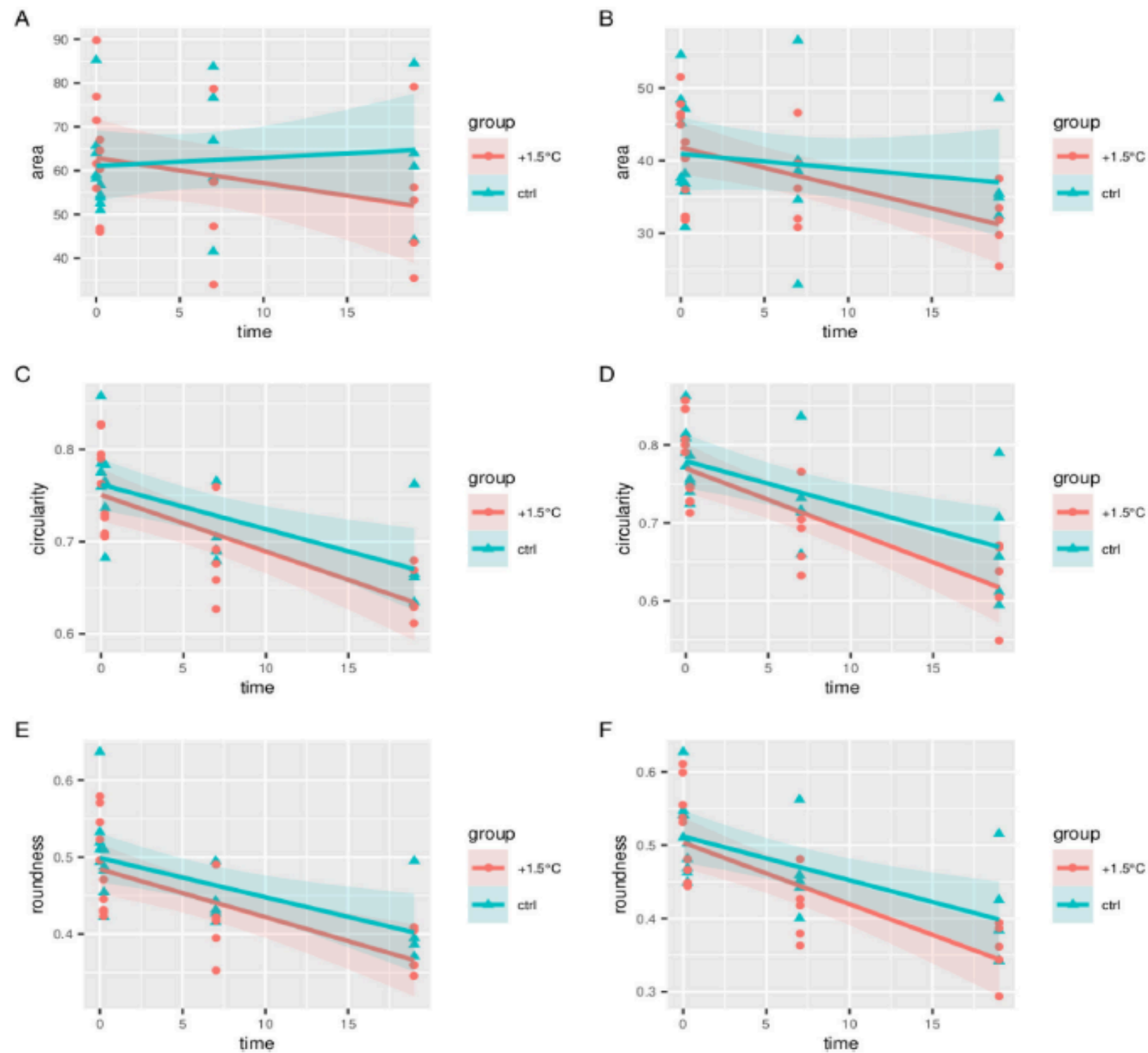


Fig. 3. Plot of means and linear models of measured area (A and B) and shape descriptors (C to F) of the erythrocytes of control fish (light blue) and heat stressed ones (light red). A, C, and E are values measured from pellets embedded in Embed812-Araldite whilst B, D and F from pellets embedded in LR-White. 95% confidence intervals of the linear models are shown in the same color as the lines.

Analisi area, circolarità, rotondità e solidità dei nuclei

		Time 0		6 h		7 days		19 days	
	Environmental	Control	+1.5 °C	Control	+1.5 °C	Control	+1.5 °C	Control	+1.5 °C
Area	12.71 ± 2.21	11.14 ± 1.43	12.60 ± 0.71	10.21 ± 1.79	9.25 ± 1.48	9.79 ± 2.97	9.79 ± 1.34	9.37 ± 0.94	9.73 ± 2.11
Circularity	0.856 ± 0.023	0.783 ± 0.032	0.775 ± 0.040	0.740 ± 0.036	0.749 ± 0.044	0.738 ± 0.068	0.712 ± 0.0478	0.654 ± 0.048	0.730 ± 0.065
Roundness	0.640 ± 0.042	0.527 ± 0.047	0.532 ± 0.042	0.484 ± 0.036	0.512 ± 0.048	0.511 ± 0.062	0.485 ± 0.035	0.445 ± 0.046	0.503 ± 0.064
Solidity	0.983 ± 0.007	0.975 ± 0.007	0.965 ± 0.014	0.965 ± 0.016	0.956 ± 0.015	0.949 ± 0.029	0.937 ± 0.025	0.912 ± 0.027	0.944 ± 0.030

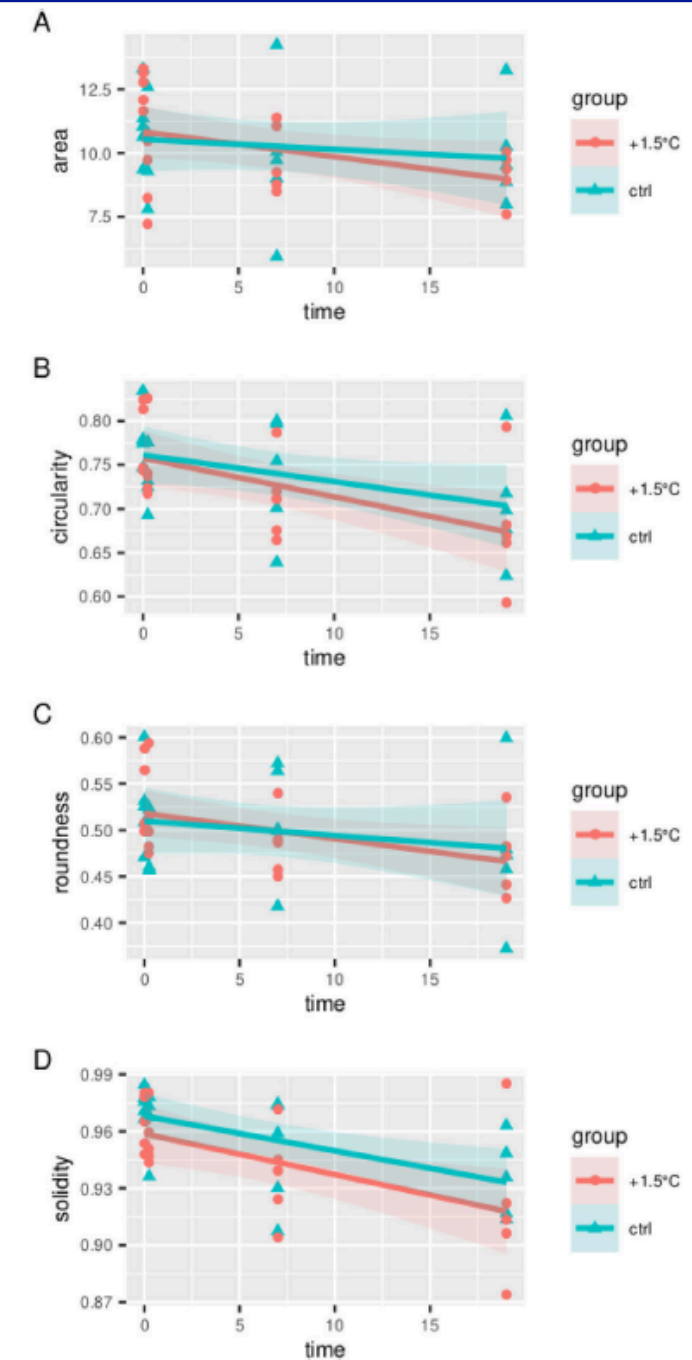
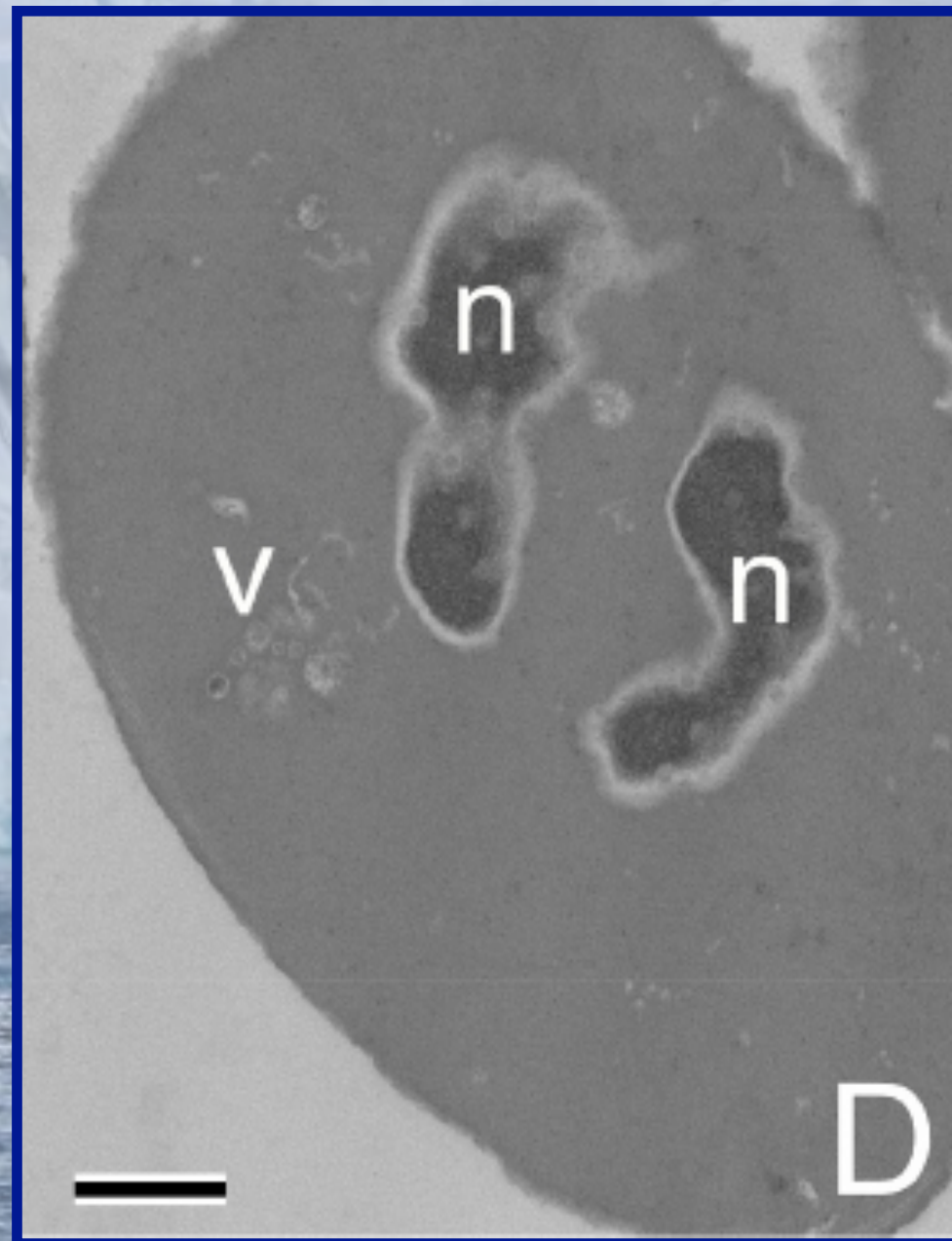


Fig. 4. Plot of means and linear models of measured area (A) and shape descriptors (B to D) of the erythrocytes' nuclei of control fish (light blue) and heat stressed ones (light red) from pellets embedded in Embed812-Araldite. 95% confidence intervals of the linear models are shown in the same color as the lines.



★ il trend di diminuzione degli eritrociti, comparabile tra le due resine, consente di escludere un incremento in eritropoiesi come risposta allo stress

★ l'aumento di forme allungate in sezione appare come un'accelerazione per maturazione ed invecchiamento: possibile risposta a stress termico
MA anche ad altri tipi di stress (*Farag and Alagawany, 2018*)

★ Le alterazioni morfologiche di eritrociti e nuclei non hanno determinato mortalità, gli stress apportati (stabilizzazione ed aumento temperatura) non appaiono letali per la durata dell'esperimento

CONSIDERAZIONI FINALI

**ci possono essere molteplici fonti di disturbo possibile
rispetto ad un organismo estremamente sensibile
alle condizioni ambientali come il Trematomus Bernacchii:**

**densità e tipo di interazione tra i pesci negli acquari usati
prima vasca 1500 L per 40 esemplari
poi 2 vasche da 180 L per 20 esemplari**

Grazie per l'attenzione



EMERALD ROCKCOD - (*Trematomus bernacchii*)

#