

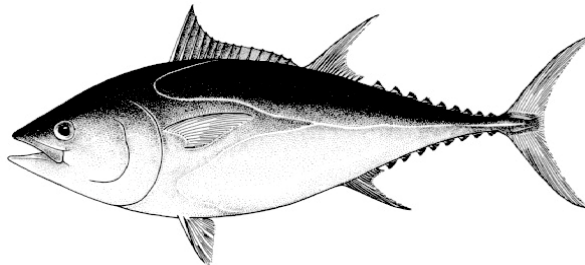


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA
"TOR VERGATA"

FACOLTA' DI SCIENZE FISICA E MATEMATICA

DOTTORATO DI RICERCA IN BIOLOGIA EVOLUZIONISTICA ED
ECOLOGIA

CICLO DEL CORSO DI DOTTORATO: XX



**AMPLIAMENTO DELLE BASI CONOSCITIVE PER LA
MESSA A PUNTO DI METODOLOGIE PER IL CONTROLLO
DELLA BIOLOGIA RIPRODUTTIVA DEL TONNO ROSSO IN
ACQUACOLTURA**

Autore: RICCARDO CAPRIOLI

Docente Guida/Tutor: Prof. STEFANO CATAUDELLA

Coordinatore: Prof. PATRIZIA ALBERTANO

INDICE

INDICE	3
RIASSUNTO	6
ABSTRACT	8
PREMESSA	10
INTRODUZIONE	13
Aspetti ecologici-evolutivi del tonno rosso	13
Morfologia	13
Habitat.....	13
Biologia ed ecologia trofica	14
Biologia riproduttiva	15
Filogenesi ed evoluzione.....	16
La struttura genetica nel Mediterraneo.....	19
Aspetti Gestionali della risorsa tonno	20
La Pesca	20
La conservazione della risorsa	21
L'acquacoltura	23
<i>Aspetti tecnici dell'ingrasso</i>	24
Aspetti economici, sociali, culturali e politici	27
L'economia	27
La tradizione	28
Aspetti sociali e politici.....	30
L'acquacoltura sostenibile	33
Sintesi delle conoscenze sulla biologia riproduttiva dei teleostei in cattività	36
Introduzione	36
Il ciclo riproduttivo nei pesci	37
<i>Vitellogenesi e maturazione finale degli oociti</i>	37
<i>Spermatogenesi e spermiazione</i>	38
Endocrinologia della riproduzione	38
<i>Femmine</i>	39
<i>Maschi</i>	40

Disfunzioni riproduttive nei pesci allevati	41
Induzione ormonale dell'ovulazione e della deposizione.....	43
<i>Utilizzo di preparati a base di gonadotropine (GtH)</i>	43
<i>Utilizzo dell'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH) e agonisti (GnRHa)</i>	44
<i>Sistemi di trasporto per il GnRHa a lento e continuo rilascio</i>	47
Stima della fecondità dei pesci in relazione alle diverse strategie riproduttive	50
Introduzione	50
Stima della fecondità.....	51
Metodi di stima della fecondità.....	52
MATERIALI E METODI	54
Biologia riproduttiva	54
Campionamento	54
Analisi delle gonadi	55
<i>Preparazione dei campioni</i>	55
<i>Istologia</i>	56
<i>Classificazione degli oociti, degli ovari e dei testicoli</i>	56
Analisi stereologiche.....	58
Analisi del sangue.....	60
Analisi statistiche	61
Sviluppo sistema di induzione ormonale	62
Sviluppo di un metodo di somministrazione ormonale e stimolazione della riproduzione	62
<i>Individuazione dei principi attivi e dosi</i>	62
<i>Predisposizione del sistema di somministrazione</i>	63
<i>Prove di stimolazione alla riproduzione</i>	65
Messa a punto di tecniche di raccolta di uova fecondate	66
RISULTATI	68
Biologia riproduttiva del tonno rosso in acquacoltura	68
Esemplari di sesso femminile.....	68
<i>Dati biometrici</i>	68
<i>Istologia delle gonadi</i>	68
<i>Analisi stereologica</i>	73
Esemplari di sesso maschile.....	79
<i>Dati biometrici</i>	79

<i>Istologia delle gonadi</i>	81
Anomalie osservate in individui selvatici	82
Sviluppo sistema di induzione ormonale	84
<i>Prove di stimolazione alla riproduzione</i>	84
Messa a punto di tecniche di raccolta di uova fecondate	87
DISCUSSIONE	90
Biologia riproduttiva del tonno rosso in acquacoltura	90
Femmine	90
Maschi.....	95
Sviluppo di un metodo di somministrazione ormonale e stimolazione della riproduzione	96
Messa a punto di tecniche di raccolta di uova fecondate all'interno di gabbie di stoccaggio	99
Considerazioni conclusive	100
RINGRAZIAMENTI	104
BIBLIOGRAFIA	105

RIASSUNTO

Attualmente il tonno rosso (*Thunnus thynnus* L. 1758), a causa dell'eccessivo prelievo, risulta una specie altamente minacciata. Misure gestionali adeguate di questa specie richiedono un'accurata conoscenza della sua biologia ed in particolar modo della biologia riproduttiva. Una risposta all'attuale situazione del tonno potrebbe essere lo sviluppo di tecnologie innovative che ne permettano la riproduzione in cattività e l'allevamento. A tale scopo il progetto di ricerca, nel quale questa tesi di dottorato è stata svolta, si è occupato dello studio dell'effetto del confinamento sulla maturazione finale della gonade (FOM), sono stati anche testati metodi innovativi di induzione alla deposizione e tecniche di raccolta di uova potenzialmente emesse dai tonni all'interno di gabbie galleggianti.

Analisi istologiche e stereologiche sono state condotte su gonadi femminili e maschili di 58 tonni, campionati durante il periodo riproduttivo (giugno-luglio 2005-2006) e, mantenuti in cattività, per periodi di tempo più o meno lunghi (da 9 giorni fino a 2 anni), presso l'impianto di allevamento Marpesca di Vibo Marina (VV). Tutti i tonni studiati sono risultati adulti ed è stata osservata una differenza significativa (t-test: $P=1,6 \times 10^{-6}$) dell'indice gonadosomatico (IG) tra i dati di giugno e quelli di luglio, riflettendo una chiara differenza nel grado di maturità sessuale tra i due mesi di campionamento. Le analisi istologiche effettuate sugli ovari hanno permesso l'individuazione di 4 fasi di sviluppo degli oociti. A metà giugno gli ovari sono risultati maturi, ma non in deposizione. Lo stadio di vitellogenesi è risultato il più frequente, quello di migrazione del nucleo il più avanzato, ma è stato rilevato anche un elevato grado di atresia. Da fine giugno in poi gli ovari hanno subito una forte regressione e sono stati classificati in fase post-riproduttiva. A fine luglio sono stati osservati esclusivamente oociti primari e le gonadi si trovavano in una condizione di quiescenza. Negli ovari non sono stati mai rinvenuti follicoli post-ovulatori. L'atresia è stata riscontrata in tutti i campioni esaminati. Gli oociti sono distribuiti in modo omogeneo lungo l'asse antero-posteriore della gonade. Le analisi stereologiche hanno evidenziato che i tonni mantenuti da 2 anni in cattività avevano 5 volte meno oociti maturi ($8,1 \pm 11,5 \text{ g}^{-1}$) rispetto a tonni trasferiti in gabbia da circa 10 giorni ($43,38 \pm 17,65 \text{ g}^{-1}$) e campionati nello stesso periodo di metà giugno, ma comunque nettamente inferiori a quelli riportati per tonni selvatici (93 g^{-1}). Nelle femmine, la condizione di cattività, sia breve che prolungata, sembra impedire la FOM e la deposizione. Nei maschi, la condizione di cattività sembra consentire il completamento della gametogenesi, ma ridurre il periodo di emissione rispetto ai selvatici.

Al fine di stimolare la FOM e la deposizione è stato sviluppato un nuovo sistema per somministrare una soluzione a lento rilascio di GnRH α (20-80 $\mu\text{g Kg}^{-1}$) insieme ad un marcatore

visuale. L'ormone è stato iniettato senza immobilizzare o anestetizzare i pesci servendosi di un fucile subacqueo modificato e di siringhe speciali caricate con aria compressa. Nel 2005 sono stati indotti totalmente o parzialmente circa 15 tonni. Nel 2006, sono state condotte altre 3 prove, ma con la sola finalità di ottimizzare il sistema di somministrazione. Nei giorni successivi ai tentativi di induzione ormonale l'acqua superficiale interna alla gabbia è stata campionata lungo la circonferenza, dove era stata fissata una rete da plancton con la funzione di trattenere e concentrare le uova eventualmente rilasciate dai tonni. L'osservazione del materiale raccolto ha consentito di identificare molti organismi planctonici tra cui uova e larve di ittioplancton, ma dalle dimensioni e dalla morfologia è stato escluso che vi fossero uova o stadi larvali di tonno.

Parole chiavi: *Thunnus thynnus*, FOM, 17- β -estradiolo, GnRH α , Vitellogenesi, Riproduzione in cattività, Induzione ormonale.

ABSTRACT

Recently high fishing pressure has caused a reduction in the biomass of bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L. 1758) populations. The effective management of these fish requires a thorough knowledge of their biology, in particular of their reproduction. The aims of the present project were to improve our understanding on reproductive biology of bluefin tuna (BFT) in captivity, to test innovative methodologies for induction of final gonads maturation (FOM) in caged tunas, and the development of egg collection methods thus establishing the basis for the sustainable development of the BFT aquaculture.

Histological and stereological analysis were carried out on 58 samples of BFT kept in captivity from 8 to 54 days (short period), and after 2 years (long period), sacrificed in the fattening cages of Vibo Marina (Italy) during the natural spawning period (June-July 2005-2006). All tunas sampled were adults. When the pooled data from tunas sacrificed in June were compared with those from tunas sampled in July a significant difference in gonadosomatic index (I_G) was found (t-test: $P=1,6 \times 10^{-6}$). The I_G decreased almost four-fold from June to July reflecting an evident difference in the degree of sexual maturity. All the female tunas sampled in early June were non-spawning mature and the most advanced group of oocytes found in the ovaries were in nuclear migration stage (S4). At the end of June and at mid July the gonads were classified as in strong regression due to the conversion in atretic oocytes of all the vitellogenic oocytes (S3). At the end of July all bluefin tuna were identified as post-spawning. For the first time, a comparative analysis among anterior, mid and posterior parts of the ovary was carried out. These parts did not greatly differ in the estimated volume fraction of each oocytes category, with the only exception of a lightly higher number of S4 oocytes in the anterior part. When the mean relative batch fecundity, obtained from the numerical density (N_V) of S4 oocytes, of 2 years captive tunas was compared with data from about 10 days captive tunas (all sacrificed in the same period on early June) some negative effects of captivity on gonadic maturation was noted. Tunas from about 10 days in captivity, in fact, showed more than five-fold highly yolked oocytes ($43.38 \pm 17.65 \text{ g}^{-1}$) than 2 years captive ones ($8,1 \pm 11,5 \text{ g}^{-1}$). Further, these values were notably lower than those reported by Medina *et al.* (2002) (93 g^{-1}) for wild northern bluefin tuna. Therefore a long as well as a short period of captivity seemed to altered the final gonadic maturation and reduce fecundity causing reproductive dysfunctions.

In order to induce FOM, ovulation/spermiation and spawning a total of 15 BFT were injected underwater with a single dose ($20-80 \mu\text{g Kg}^{-1}$) of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) encapsulated in microspheres of a biodegradable copolymer. GnRHa implants were administrated without immobilizing or anaesthetizing the fish and using a spare gun and a

purpose-built air charged system to insert syringes and a visual tag at the same time. Many attempts were made with different tag, to mark treated tunas, in order to prolong the tag staying on the fish, and to assure that the entire dose will enter in tuna muscle. After each treatment, a special purpose-built net was placed around the cage which demonstrated to be able to retain many fish eggs and larvae. However, no spawning was observed and no tuna eggs were collected from the cage. The absence of spawning in treated tunas could be due to the non-optimal gonadic maturation stage and by the very low plasmatic level of 17- β -estradiol (<1 ng ml⁻¹) of the treated fishes.

Keywords: *Thunnus thynnus*, FOM, 17- β -estradiol, GnRH α implants, Vitellogenesis, Reproduction in captivity, Hormonal induction.

PREMESSA

Il presente lavoro di tesi di dottorato è stato svolto nell'ambito di un progetto di ricerca coordinato dal titolo: *“Contributi multidisciplinari allo sviluppo dell'acquacoltura responsabile del tonno rosso (Thunnus thynnus) attraverso il controllo della filiera e l'ampliamento delle basi conoscitive per la riproduzione controllata di questa specie”*, finanziato dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali (VI Piano Triennale – L. 41/82). Il Laboratorio di Ecologia Sperimentale ed Acquacoltura del Dipartimento di Biologia dell'Università di Roma “Tor Vergata” (Unità Operativa n° 6) ha eseguito nello specifico un sub-progetto dal titolo: *“Innovazioni tecnologiche per l'acquacoltura responsabile del tonno rosso: raccolta ed analisi di immagini per applicazioni morfometriche alla valutazione quantitativa delle catture trasferite, tecnologie per il controllo della biologia riproduttiva e delle potenziali emissioni di gameti spontanee ed indotte in mare”*.

Tra gli obiettivi della ricerca figuravano l'acquisizione di conoscenze sulla biologia riproduttiva del tonno rosso per il controllo del ciclo riproduttivo in cattività, la predisposizione di un parco riproduttori, la sperimentazione, per la prima volta in Italia, di tecniche di induzione della riproduzione e di raccolta e impiego delle uova fecondate. Problematiche applicative che richiedono un preciso inquadramento scientifico e metodologico per essere affrontate.

Quasi tutti i pesci mantenuti in condizione di cattività, compreso il tonno rosso, esibiscono alterazioni più o meno estese della biologia riproduttiva, dovute alle condizioni di confinamento, all'alimentazione, alle caratteristiche ambientali dell'ambiente di allevamento, ecc.

Per molte specie ittiche, quali la spigola o l'orata, l'utilizzo di stimolazioni ormonali o di manipolazioni del termo/fotoperiodo ha permesso di risolvere tali problemi, ma nel tonno, ad eccezione di qualche evento spontaneo di deposizione, non è stato ancora raggiunto un reale controllo di qualsiasi parte del ciclo riproduttivo.

L'ampliamento delle basi conoscitive della biologia riproduttiva di questa specie rappresenta pertanto un passaggio strategico fondamentale per l'ottenimento di uova fecondate e di larve di tonno rosso, al fine di mettere a punto tecnologie a supporto dello sviluppo sostenibile dell'allevamento di tonno rosso. Il raggiungimento di questo obiettivo consentirebbe non solo la riduzione della pressione di pesca su questa specie, con effetti positivi sulle popolazioni selvatiche, ma anche potrebbe contribuire a ridurre le catture accidentali di altre specie marine minacciate, come le tartarughe marine e i delfini (Silvani *et al.*, 1999; Deflorio *et al.*, 2005).

Il lavoro di tesi può quindi essere inquadrato nella tematica dell'Ecologia Applicata alla Conservazione e Gestione Sostenibile di specie minacciate e lo sviluppo di un'Acquacoltura

Responsabile e Sostenibile. I modelli di gestione si basano ormai sulla integrazione delle opportunità offerte dall'innovazione tecnica e scientifica.

I tonni, oggetto di pesca da migliaia di anni, hanno svolto un ruolo importante nella cultura di molti popoli in tutto il mondo (Maggio, 2000) e costituiscono la più preziosa risorsa a livello mondiale per la pesca. Nel 2002, le catture globali di tinnidi sono state di 9 milioni di tonnellate, per un fatturato di 6 miliardi di \$ US (Directorate General for Fisheries, 2004; FAO, 2004). Ad eccezione del tonnetto striato (*Katsuwonus pelamis*), gli *stocks* delle varie specie di tonni sono attualmente considerati pienamente sfruttati, sovrasfruttati o esauriti in molte aree della terra (FAO, 2002). In Mediterraneo, la specie di più grande interesse commerciale è il tonno rosso (*Thunnus thynnus thynnus* L. 1758) (Fromentin e Powers, 2005; Chow *et al.*, 2006) e, nell'ultima decade, grazie all'elevata domanda da parte del mercato giapponese, il commercio del tonno rosso è diventato un'importante industria a livello internazionale. Così, negli ultimi anni, grazie anche all'elevato prezzo raggiunto dalle sue carni, l'attività di cattura è stata notevolmente intensificata, rivolgendosi anche ad esemplari di piccole dimensioni. Tale industria si basa sulla cattura di pesci selvatici in migrazione riproduttiva e, in alcuni casi, del loro ingrasso in gabbie galleggianti, generalmente per periodi di pochi mesi (Miyake *et al.*, 2003; Directorate General for Fisheries, 2004; Ottolenghi *et al.*, 2004; FAO, 2005). L'incremento costante della domanda di questo pesce da parte del mercato del sushi e sashimi, non solo in Giappone ma ora anche in Europa e negli Stati Uniti (Catarci, 2004), ha fatto sì che questa specie sia catturata sia all'interno del bacino Mediterraneo, sia nel Mar Atlantico (Doumenge, 1996), minacciando le dimensioni e la struttura dello *stock* naturale, che attualmente è considerato in condizioni di sovrasfruttamento (Fromentin & Powers, 2005; SCRS, 2007). Contemporaneamente all'aumentata pressione di prelievo, è andato crescendo l'interesse internazionale per la salvaguardia e la conservazione della specie, che ha portato all'istituzione di Commissioni Internazionali per la Conservazione dei Tinnidi (ICCAT), che, oltre a stimolare l'attività di ricerca per il ripopolamento, ne incentiva l'allevamento (Ueyanagi *et al.*, 1973). Una risposta all'attuale situazione di sofferenza dello stock ed al contempo all'aumentata domanda del mercato del tonno potrebbe essere lo sviluppo di tecnologie innovative che ne permettano o migliorino l'allevamento. Nel caso specifico del tonno rosso, la fase di ingrasso in gabbie galleggianti è infatti finora finalizzata alla possibilità di *frazionamento della vendita*, che viene così effettuata in momenti più remunerativi, quando l'offerta è minore, ed al *miglioramento della qualità delle carni*, dovuta all'alimentazione effettuata nelle gabbie che, aumentando il tenore lipidico delle carni, innalza il valore economico del prodotto commerciabile.

La possibilità di mettere a punto tecniche di riproduzione ed allevamento larvale in cattività potrebbe quindi permettere l'avvio di una nuova fase per questa specie, con conseguenze di notevole importanza economica e strategica per l'acquacoltura, per la riduzione della pressione di pesca sullo stock naturale e per il mantenimento della biodiversità.

Pertanto, questa tesi di dottorato ha utilizzato la possibilità di poter disporre di un parco riproduttori di tonno rosso in gabbia per sperimentare protocolli ormonali inducenti l'emissione di gameti fertili e metodi per la raccolta di uova eventualmente deposte spontaneamente o sotto induzione ormonale. Nell'ottica di formare e gestire parchi riproduttori di tonno, due sono gli elementi conoscitivi indispensabili: la *determinazione del sesso* e la *valutazione dello stato riproduttivo* degli esemplari stabulati. Nel tonno non si osserva dimorfismo sessuale e non è possibile quindi determinare il sesso con osservazioni macroscopiche. Il tonno è una specie migratoria, la cui gonade matura secondo un pattern sincrono a gruppi, e che quindi ha emissione multiple durante il periodo genetico (maggio-luglio). Lo stato riproduttivo degli individui catturati e stabulati dipende quindi dal periodo in cui avviene la cattura e dagli eventi occorsi precedentemente alla cattura. Al fine di stabilire la condizione riproduttiva gioca quindi un ruolo chiave *l'acquisizione di conoscenze di base sulla biologia riproduttiva*, con l'obiettivo di individuare le eventuali disfunzioni riproduttive indotte dalla cattività e formulare soluzioni (protocolli ormonali e/o condizionamento ambientale) per il superamento delle stesse. La possibilità di ottenere uova fecondate inoltre offre la possibilità di chiudere un ciclo di allevamento, di svincolarsi dai limiti nelle catture stabilite dalle quote ICCAT, e di ottenere una fase sperimentale di allevamento larvale.

INTRODUZIONE

ASPETTI ECOLOGICI-EVOLUTIVI DEL TONNO ROSSO

Morfologia

Il tonno rosso Mediterraneo *Thunnus thynnus thynnus* (Linnaeus, 1758, fig. 1), appartiene all'ordine dei Perciformi e alla famiglia degli Sgombridi, è un pesce che può raggiungere una lunghezza totale di 458 cm (Claro, 1994), mentre il peso massimo pubblicato è di 684 kg (Claro, 1994).



Figura 1: *Thunnus thynnus thynnus* (Linnaeus, 1758)

Il corpo è robusto, particolarmente nella parte anteriore. Il muso è prominente, la testa grande, gli occhi piccoli. La bocca, in posizione terminale, non è molto ampia. Ha sulle mascelle un'unica serie di piccoli denti, presenti anche sulle ossa interne del palato. La colorazione è blu scuro, quasi nera sul dorso, grigio-argentea sui fianchi, con linee trasversali incolori alternate con file di punti incolori. Nei giovani tonni le strisce verticali sono più pronunciate. La prima e la seconda pinna dorsale, rispettivamente di colore giallo o bluastro e bruno rossastro, non sono separate nettamente. La seconda pinna dorsale è più alta della prima; le pinne pettorali, di colore grigio scuro, sono molto brevi, meno dell'80% della lunghezza della testa. Tra la seconda pinna dorsale e la pinna caudale e tra la pinna anale e quella caudale, presenta una serie di piccole pinnule dorsali (8-10) e ventrali (7-9) con funzione stabilizzatrice per il nuoto. Le pinnule e la pinna anale sono gialle con bordi neri. La carena caudale è nera negli adulti mentre la pinna caudale, ampia e falcata, è di colore grigio scuro. Le pinne pelviche in posizione toracica, originano all'altezza dell'inserzione delle prima dorsale. Vescica natatoria presente.

Habitat

È un pesce marino, pelagico, vive in mare aperto con una distribuzione batimetrica che va da 0 a 9.850 m (Riede, 2004). Preferisce acque temperate e subtropicali ma può tollerare una vasta

gamma di temperature (15-30 °C) ed effettua periodiche migrazioni sia verticali che orizzontali. Nelle stagioni calde si sposta più vicino alla costa. Il tonno rosso alterna periodi in cui vive in banchi (*fase gregaria*) a periodi di isolamento (*fase erratica*). La fase gregaria corrisponde al periodo riproduttivo; grossi banchi si dirigono verso le aree riproduttive localizzate nel Golfo del Messico e nel Mediterraneo. Nella fase erratica gli animali si disperdono e si spostano verso maggiori profondità.

Biologia ed ecologia trofica

Il tonno rosso è un animale molto longevo arrivando a vivere oltre 20 anni di età. E' una specie a rapidissimo accrescimento: le forme giovanili hanno un tasso di crescita stimato giornaliero tra i 2,0 e 2,4 mm/giorno (La Mesa *et al.*, 2005), in quattro mesi di vita arriva a misurare 400 mm di lunghezza alla furca (Piccinetti and Piccinetti Manfrin, 1970) e in 2 anni circa 50 cm (El-Kebir *et al.* 2002). È perfettamente adattato al nuoto e in grado di compiere grandi migrazioni percorrendo diverse migliaia di chilometri in continuo (*cruise*), nuotando fino alla velocità di 115 km orari. Ha una serie di adattamenti e specializzazioni morfologiche, che sono state selezionate nel corso dell'evoluzione e che permettono di differenziarlo da altre specie di pesci. La caratteristica più consistente è che può essere definito come un pesce eterotermo locale (Eckert, 1985), infatti esso riesce a mantenere, in alcune zone del corpo, una temperatura corporea più alta di quella dell'acqua. Tale sistema di capitalizzazione del calore metabolico riesce a favorire un potenziamento dell'attività enzimatica, un aumento del rendimento dell'attività muscolare che permette di sostenere questo tipo di nuoto, ma anche un aumento del rendimento dell'apparato digerente che determina un assimilamento del cibo molto più rapido rispetto agli altri pesci ectotermi e quindi un tasso di crescita più rapido.

Dal punto di vista ecologico, il tonno rosso è da considerarsi una specie chiave nella catena alimentare dell'ambiente pelagico. Si ciba infatti di pesci pelagici come acciughe, sardine, aringhe, maccarelli e calamari. Inoltre, un filtro alimentare modificato viene utilizzato per mangiare granchi rossi o altri organismi poco agili (Collette & Nauen, 1983). Agendo all'apice della catena alimentare nell'ecosistema marino svolge una funzione fondamentale, condivisa in parte con gli altri mammiferi marini e l'uomo. Questa specie, per le grandi taglie raggiunte dagli individui adulti, non teme predatori, ad eccezione dell'uomo, e di alcuni grandi cetacei come le orche (*Orcinus orca*).

Biologia riproduttiva

Il ciclo riproduttivo del tonno rosso in Mediterraneo occidentale e centrale è stato recentemente descritto sulla base di esami istologici di gonadi (Corriero *et al.*, 2003; Santamaria *et al.*, 2003; Zubani *et al.*, 2003; Abascal *et al.*, 2004). I pesci sono riproduttivamente inattivi da agosto a marzo, quando negli ovari sono presenti solamente oociti allo stadio perinucleare, mentre i testicoli hanno cisti germinali contenenti principalmente spermatogoni e spermatozoi. In aprile le gonadi iniziano a maturare: negli ovari appaiono oociti allo stadio lipidico o ad alveoli corticali, e nei tubuli seminiferi dei testicoli si iniziano ad osservare tutti gli stadi della spermatogenesi. A maggio, gli ovari sono caratterizzati dalla presenza di oociti in vitellogenesi, mentre il lume dei tubuli seminiferi si riempie progressivamente di spermatozoi. Ovari con oociti idratati e/o follicoli post-ovulatori e testicoli carichi di spermatozoi, entrambi segnali di eventi di deposizione attiva, sono stati osservati da fine giugno ad inizio luglio. Da fine luglio a settembre, gli ovari contengono prevalentemente oociti allo stadio perinucleare e residui oociti vitellogenetici in fase di riassorbimento (atresia). Durante lo stesso periodo, nei testicoli sono presenti solo pochi spermatozoi residui.

La prima maturità sessuale è raggiunta tra la fine del terzo e l'inizio del quarto anno di vita, a una lunghezza di 110-120 cm ed un peso di 30-38 kg (Rodriguez-Roda, 1967; Susca *et al.*, 2001a, 2001b; Medina *et al.*, 2002). I tonni del compartimento dell'est si avvicinano alle coste europee a maggio, passano lo stretto di Gibilterra, penetrano nel Mediterraneo e raggiungono i luoghi di deposizione in giugno e in luglio. Le principali aree di deposizione nel Mediterraneo sono state determinate attraverso lo studio dello stadio di maturazione delle gonadi di femmine catturate (presenza di oociti idratati e con follicoli post-ovulatori) o grazie al ritrovamento di larve di tonno rosso: corrispondono alle acque intorno alle isole Baleari nel Mediterraneo occidentale (Nishida *et al.*, 1998; Susca *et al.*, 2001a; Medina *et al.*, 2002; Corriero *et al.*, 2003), a Malta e il Mare Tirreno meridionale nel Mediterraneo centrale (Nishida *et al.*, 1998) e il Mare Levantino nel Mediterraneo orientale (Karakulak *et al.*, 2004; Oray and Karakulak, 2005). Nel Mare Levantino, la riproduzione avviene a maggio, quasi un mese prima rispetto alle altre aree di deposizione, probabilmente in quanto la temperatura superficiale ottimale del mare per la riproduzione del tonno rosso è raggiunta prima (Karakulak *et al.*, 2004). I tonni del compartimento dell'ovest hanno come area di deposizione il Golfo del Messico e maturano ad una età di 8 anni circa e intorno ai 2 m di lunghezza (SCRS, 2007).

La longevità e il ritardo nel raggiungimento della maturità sessuale in questa specie sono due "fattori di rischio" che la rendono particolarmente vulnerabile alla pesca se non regolamentata su basi scientifiche.

Filogenesi ed evoluzione

Il genere *Thunnus* appare come una unità monofiletica ben supportata sia da dati morfologici che da dati molecolari (Collette *et al.*, 2001). Tuttavia, le relazioni filogenetiche tra le specie del genere sono, ancora, controverse. Gibbs & Collette (1967) e Collette (1979), basandosi su differenze morfologiche ed ecologiche, divisero il genere in due subgeneri, *Neothunnus* (di cui facevano parte principalmente i tonni dell'area tropicale) e *Thunnus* (gruppo di tonni più tolleranti a vivere in acque fredde). Sono membri del subgenere *Neothunnus* le seguenti specie: tonno pinna nera *T. atlanticus* (Lesson, 1831), tonno dalla coda lunga *T. tonggol* (Bleeker, 1851) confinati, rispettivamente, all'Oceano Atlantico ed all'Indo-Pacifico, e tonno pinna gialla *T. albacares* (Bonnaterre, 1788), mentre del subgenere *Thunnus*: alalunga *T. alalunga* (Bonnaterre, 1788), tonno obeso *T. obesus* (Lowe, 1839), tonno rosso atlantico *T. thynnus* (L., 1758) e tonno rosso pacifico *T. maccoyii* (Castelnau, 1872). Il *T. maccoyii* è presente soltanto nell'emisfero meridionale, mentre basandosi su differenze genetiche e sulle sottili differenze morfologiche il tonno rosso atlantico è stato suddiviso in due sotto specie, il *Thunnus thynnus thynnus* ((NBTA) che vive nell'oceano Atlantico e nel Mare Mediterraneo e il *Thunnus thynnus orientalis* (NBTP, Temminck & Schlegel, 1884) che vive nell'oceano Pacifico nord-occidentale (Ward, 1995). Le popolazioni di tonno rosso atlantiche e pacifiche sono geograficamente ben isolate l'una dall'altra, poiché sono rare nell'Oceano Indiano e, in generale, nell'emisfero Sud. Le tre specie *T. alalunga*, *T. obesus* e *T. albacares* sono considerate panmittiche. Questi raggruppamenti sono stati ulteriormente modificati a seguito di alcune analisi genetiche (Chow & Kishino, 1995; Elliot & Ward, 1995; Ward, 1995; Alvarado-Bremer *et al.*, 1997; Takeyama *et al.*, 2001; Chow *et al.*, 2003). Chow & Inoue (1993) e Chow & Kishino (1995) hanno analizzato il gene mitocondriale per il citocromo *b* ed i geni per le ATPasi di tutte le specie del genere *Thunnus* ed hanno riscontrato che la distanza genetica tra le sottospecie di *T. thynnus* atlantiche e pacifiche è maggiore di quella tra tutte le altre specie.

Chow & Inoue (1993) hanno identificato dei marcatori RFLP in grado di distinguere completamente tra tutte le specie del genere *Thunnus*.

Gli enzimi di restrizione proposti da Chow & Inoue (1993) per il frammento ATCO (regione di DNA compresa tra i geni mitocondriali per l'ATPasi per la citocromo ossidasi III) e considerati diagnostici per tutte le specie del genere *Thunnus* sono: AluI, MseI ed HincII o HinfI. Takeyama *et al.* (2001) hanno aggiunto l'enzima RsaI. BU, FRT, KAW e SKI mostrano gli stessi profili di restrizione se digeriti con HincII ed RsaI, mentre possono essere identificati mediante digestione con AluI o MseI. Per le specie del genere *Thunnus*, i marcatori RFLP si sono riconfermati diagnostici per l'identificazione di ALB, BKT, LTT, SBT ed YF, mentre per nuove specie

introdotte dallo studio (*T. obesus* BE e *T. thynnus* NBT) si rende necessaria l'esplorazione di nuovi marcatori RFLP. Inoltre, i campioni di NBTA e NBTP restituiscono pattern di restrizione identici se digeriti con questo set di enzimi. Per quanto concerne BE, lo studio di Takeyama *et al.* (2001) ha dimostrato che gli enzimi RsaI e MseI non sono idonei per la distinzione della specie dalle altre. Gli autori hanno dimostrato che, aggiungendo al set di enzimi Tsp509I, tutte le specie di *Thunnus* possono essere discriminate, indipendentemente dall'origine del campione, ed inoltre che è possibile identificare l'oceano di provenienza per NBT e BE.

L'analisi dei polimorfismi dei frammenti amplificati di DNA dà la possibilità di indagare la presenza di polimorfismi su un maggior numero di loci rispetto ad altre tecniche attualmente disponibili basate sulla PCR. In uno studio di Han & Ely (2002), è stata utilizzata l'AFLP per stimare la variabilità genetica in due specie del genere *Morone* (*M. saxatilis* e *M. chrysops*, specie sorelle strettamente correlate) ed in tre specie del genere *Thunnus* (*T. thynnus thynnus*, *T. albacares*, *T. alalunga*). Per quanto riguarda le specie del genere *Morone*, il livello di variazione genetica in entrambe è relativamente basso rispetto a quello di molte altre specie di pesci (Nevo, 1978), tuttavia, le due specie differiscono considerevolmente l'una dall'altra (Leclerc *et al.*, 1999). Al contrario, le specie del genere *Thunnus* si sono rivelate altamente polimorfiche quando comparate mediante analisi degli allozimi, del DNA mitocondriale o dei microsatelliti (Barlett & Davidson, 1991; Ward, 1995; Alvarado Bremer *et al.*, 1997; Ward *et al.*, 1997; Broughton & Gold, 1997; Quinteiro *et al.*, 1998; Takagi *et al.*, 1999), mentre la loro variabilità interspecifica è minore rispetto a quella osservata nella maggior parte delle specie con generiche (Barlett & Davidson, 1991; Alvarado Bremer *et al.*, 1997). Le tre specie del genere *Thunnus* risultano invece altamente polimorfiche (dall'11% al 19%), mentre la variabilità interspecifica è piuttosto bassa. I pattern AFLP di *T. thynnus* sono molto più simili a quelli di *T. albacares* di quanto non lo siano a quelli di *T. alalunga*, il che è in accordo con studi precedenti che indicano che l'mtDNA di quest'ultima specie è differente da quello delle altre due (Chow & Kishino, 1995; Alvarado Bremer *et al.*, 1997). Analogamente, dati allozimici basati sulla comparazione della mobilità elettroforetica di varie proteine indicano che *T. alalunga* diverge geneticamente dalle altre specie congeneriche (Sharp e Pirages, 1978, Chow & Kishino, 1995; Ward, 1995; Alvarado-Bremer *et al.*, 1997; Chow *et al.*, 2003).

A livello gestionale la Commissione Internazionale per la Conservazione del Tonno Atlantico (ICCAT, <http://www.iccat.es>), riconosce due unità distinte (*stock*) del *T. thynnus thynnus*: un compartimento dell'ovest e uno dell'est. L'areale di distribuzione dello *stock* orientale (Fig. 2) comprende le isole Lofoten al largo delle coste meridionali della Norvegia, fino alle isole Canarie ed include il Mare Mediterraneo (Colette, 1986). Esiste inoltre una popolazione

sudafricana. Nell'Atlantico occidentale questa specie è stata trovata dal Labrador al Golfo del Messico, al Mare dei Caraibi, fino al Venezuela e al Brasile.

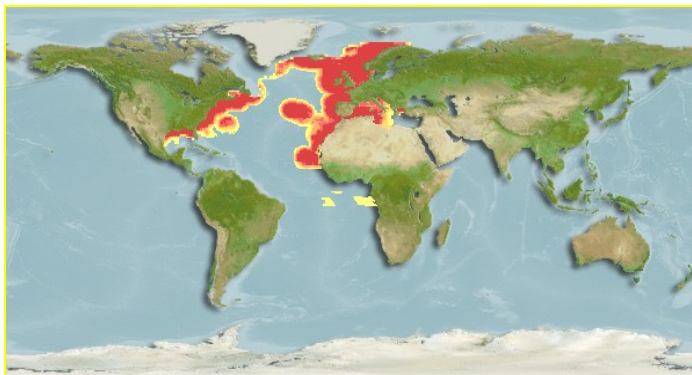


Figura 2: areale di distribuzione di *Thunnus thynnus thynnus* (Froese e Pauly, 2007).

I due *stocks* sono distinti principalmente sulla base delle aree di deposizione (Sissenwine *et al.*, 1998; Nemerson *et al.*, 2000). Recenti studi di marcatura elettronica hanno evidenziato come i due stock siano separati durante il periodo riproduttivo, mentre nel periodo genetico si uniscono parzialmente intorno al 45°W meridiano (Fromentin & Powers, 2005) in quanto area di foraggiamento comune (Block *et al.*, 2005). Alcuni recenti risultati, sempre provenienti da programmi di marcatura elettronica, indicano che la migrazione dei tonni dell'atlantico sia molto differente tra gli individui, negli anni e rispetto alle aree (Lutcavage *et al.* 1999, 2001; Block *et al.* 2001; de Metrio *et al.* 2002). Valutando inoltre le aree in cui sono stati pescati nel passato appare molto importante il ruolo dei cambiamenti ambientali (Marsac 1999; Ravier & Fromentin 2004). L'esistenza di un rimescolamento genetico tra le due unità gestionali è molto controversa (Lutcavage *et al.*, 1999; Nemerson *et al.*, 2000; Block *et al.*, 2001; De Metrio *et al.*, 2002). La validità del modello a due stock è stata spesso messa in discussione e la necessità di definire appropriate unità di gestione ha portato ad una serie di studi genetici mediante l'utilizzo di numerosi marcatori. I primi studi di struttura di popolazione condotti ad ampia scala sull'Atlantico si sono basati sulla variabilità allozimica e non hanno rilevato alcuna struttura in popolazioni (Edmunds & Sammons, 1973; Thompson & Contin, 1979; Pujolar *et al.*, 2003). Broughton & Gold (1997), mediante analisi dei microsatelliti di campioni dell'Atlantico orientale ed occidentale, hanno osservato piccole ma significative differenziazioni, al contrario di Takagi *et al.* (1999). Sequenziando la regione di controllo dell'mtDNA di campioni atlantici orientali ed occidentali, Alvarado Bremer *et al.* (1999) hanno riscontrato delle differenze significative, mentre Ely *et al.* (2002) hanno osservato una sostanziale omogeneità, confermata

anche dalla ridotta variabilità del gene nucleare *IdhA* in campioni dell'Atlantico occidentale e del Mediterraneo.

La struttura genetica nel Mediterraneo

Gli studi di genetica di popolazione condotti sul tonno rosso del Mediterraneo sono piuttosto controversi. Broughton & Gold (1997), utilizzando cinque loci microsatellite, hanno riscontrato una significativa eterogeneità tra campioni mediterranei occidentali ed orientali. Alvarado Bromham *et al.* (1999), al contrario, confrontando le sequenze della regione di controllo dell'mtDNA di tonno rosso proveniente da diverse località nel Mediterraneo, non hanno riscontrato eterogeneità geografica tra i campioni. Viñas *et al.* (2003), sempre sequenziando il DNA mitocondriale di individui di tre distinte località nel bacino mediterraneo, hanno invece rilevato delle differenze significative.

Basandosi su marcatori allozimici, Pujolar *et al.* (2003) non hanno riscontrato evidenza di strutturazione in popolazioni all'interno del Mediterraneo.

Carlsson *et al.* (2004) hanno testato la presenza di struttura in stock di *young-of-the-year* (YOY) nel Mediterraneo indagando la variabilità genetica in nove loci microsatellite (Tth5, Tth8, Tth10, Tth21, Tth34, Ttho-1, Ttho-4, Ttho-6 e Ttho-7) e nella regione di controllo dell'mtDNA (868 basi). I risultati di questo studio suggeriscono che la struttura in popolazioni del tonno rosso sia più complessa di quanto ipotizzato in precedenza. Sia per i loci microsatellite che per la regione di controllo dell'mtDNA, Carlsson *et al.* (2004) hanno riscontrato differenze significative tra gli YOY campionati nei pressi delle Isole Baleari e nel Tirreno e quelli catturati nello Ionio. Una simile eterogeneità suggerisce l'esistenza di popolazioni geneticamente indipendenti nel Mediterraneo orientale, mentre nel Mediterraneo occidentale il flusso genico impedisce la differenziazione. Sia i dati dei microsatelliti che le analisi condotte sull'mtDNA rilevano le maggiori differenze tra i due campioni più prossimi, quelli del Tirreno e quelli dello Ionio. Questo pattern potrebbe risultare dalle condizioni oceanografiche del Mediterraneo che limiterebbero il mescolamento di uova e larve.

ASPETTI GESTIONALI DELLA RISORSA TONNO

La Pesca

Il tonno rosso è un'importante risorsa a livello mondiale, essendo catturato sia all'interno del bacino Mediterraneo, sia nell'Oceano Atlantico (Doumenge, 1996). I pescatori del Mediterraneo hanno pescato il tonno rosso da tempo immemorabile. Sono state ritrovate testimonianze di questa attività di pesca risalenti a epoca pre-romana; gli attrezzi più comunemente usati nel passato fino alla metà del novecento erano le tonnare fisse o trappole. Oggi, le tonnare fisse sono quasi sparite e le sole ragioni per le quali se ne trovano ancora alcune in attività sono legate a scopi turistici ed all'attaccamento delle popolazioni del luogo alle tradizioni (Borsellino & D'Amico, 2004). Nuove tecniche di pesca sono attualmente utilizzate: i palangari giapponesi e le reti a circuizione, dette anche "tonnare volanti", che operano nel basso Tirreno, in Adriatico, nel canale di Sicilia e in Liguria. Negli ultimi anni, l'80% delle catture italiane di tonno rosso nel Mediterraneo avviene utilizzando reti a circuizione, in termini assoluti essa è pari a 3.961 t (stima del 2005), e la quasi totalità dei tonni pescati con questa tecnica (75%) sono stati trasferiti vivi in gabbie *off-shore* idonee all'allevamento del tonno rosso (Scarpato & Simeone, 2005). La pesca con Palangaro nella stagione 2005 ha fatto registrare uno sbarcato di 310 t e quella con tonnara fissa 69 t (Scarpato & Simeone, 2005).

Dal 1982 al 1996, le catture di tonno rosso del comparto dell'Atlantico orientale e del Mediterraneo sono triplicate, arrivando a toccare la quota di 50.000 t annue, successivamente sono diminuite notevolmente assestandosi intorno alle 32.000 t (SCRS, 2007; Fig. 3). Sia l'aumento che la diminuzione delle catture dichiarate sono avvenute in relazione all'andamento della pesca nel Mediterraneo.

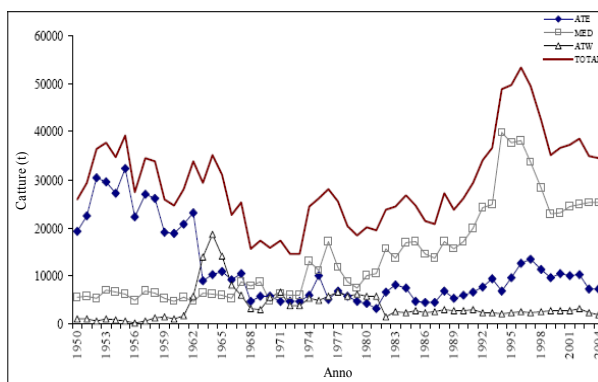


Figura 3: andamento delle catture di *T. thynnus thynnus*. ATE: Atlantico orientale; MED: Mediterraneo; ATW: Atlantico occidentale; TOTAL: catture totali (ICCAT. 2006)

L'Unione Europea ha regolamentato la pesca del tonno rosso, attribuendo ad ogni Stato membro il totale ammissibile di cattura (TAC) da parte delle flotte comunitarie. Per la campagna di pesca 2005, la quota globale europea concessa dall'ICCAT è stata di 18.331 tonnellate.

I pescatori italiani, nel 2005, hanno avuto a disposizione una quota per la pesca del tonno rosso pari a 4.888 tonnellate. Rispetto al 2004 si è registrata una flessione dello 0,7%, in corrispondenza della riduzione della quota europea di tonno rosso, che si è ridotta globalmente da 18.450 a 18.331 tonnellate. Il tonno rosso rappresenta in Italia l'unica specie regolamentata da un sistema di quote. Le quote sono rimaste costanti dal 1999 al 2002. Il TAC concesso dall'ICCAT in tale triennio si è attestato sulle 29.500 tonnellate, di cui 18.590 attribuite all'Unione europea. All'Italia è stato assegnato il 26% circa della quota comunitaria, pari a 4.958 tonnellate. Dal 2003 al 2005 il TAC è aumentato a 32.000 tonnellate, tuttavia, l'Unione europea ha visto aumentare la sua quota a 19.231,7 tonnellate solo nel 2003, per poi ridursi nuovamente nel 2004 a 18.450 tonnellate e nel 2005 a 18.331 tonnellate. Anche per l'Italia il trend delle quote concesse ha segnato un aumento nel 2003 a 5264,7 tonnellate e successivamente una diminuzione a 4.920 nel 2004 e a 4.888 nel 2005 (ICCAT, 2005).

Passando a considerare l'ambito nazionale si nota che la quota italiana di cattura del tonno rosso è ripartita tra i diversi sistemi di pesca. Il sistema di circuizione è di gran lunga quello che detiene la percentuale più elevata del TAC assegnato all'Italia. Nel tempo tale quota è passata dal 71 % del 1999, fino alla punta del 78 % nel 2003 (anno in cui si è registrata la più alta assegnazione di quote di cattura all'Unione europea). Dal 2004, invece, la percentuale attribuita a tale sistema di pesca è ritornata ai livelli del 2001 – 2002 con il 76% del TAC nazionale.

La flotta tonniera più grande dell'intero territorio nazionale è compresa tra l'area di Cetara e Salerno: essa è composta da 30 imbarcazioni da pesca con stazza variabile tra le 100 e le 350 GT. L'intera flotta è riunita in una Organizzazione di Produttori chiamata Associazione di Produttori Tonnieri del Tirreno, che ha sede a Salerno. Nel 2005 le quote ICCAT, destinate all'Associazione, ammontavano a circa 2.800 t; sulle complessive 5.000 t destinate all'Italia.

La conservazione della risorsa

Contemporaneamente all'aumento dello sforzo di pesca e quindi del prelievo, si è sviluppato un interesse internazionale per la salvaguardia e la conservazione dei grandi pesci pelagici, con l'istituzione di Commissioni Internazionali per la conservazione di tinnidi dell'Atlantico (ICCAT), che, oltre a introdurre un sistema di quote con Totali di Cattura Ammissibili (TAC) per i paesi aderenti all'ICCAT, zone di divieto e restrizioni in materia di taglia minima, ha stimolato l'attività di ricerca per il ripopolamento e ne ha incentivato anche l'allevamento (Ueyanagi *et al.*, 1973).

Limitazioni nelle catture sono state adottate a partire dal 1998 e nel 2002, sotto l'impulso dell'Unione Europea, l'ICCAT ha adottato un approccio pluriennale con l'adozione di un piano di gestione del tonno rosso per un periodo di quattro anni che stabilisce la TAC del tonno rosso del comparto orientale dell'Atlantico e Mediterraneo a 32.000 t e un calendario di chiusura delle zone di pesca. Inoltre, è stato istituito un piano di riduzione delle catture del novellame di tonno rosso per gli anni 2003 e 2004 (SCRS, 2007). Le catture ufficiali riportate per gli anni 2003 e 2004 sono state di poco al di sotto della TAC (31.163 t; 31.376 t rispettivamente); al contrario i dati riportati per il 2005 (35.671 t) e le stime del 2006 (32.660 t) indicano un prelievo sostanzialmente superiore alla quota stabilita (SCRS, 2007). Inoltre, una stima della Commissione Scientifica dell'ICCAT, basata sul numero di imbarcazioni che operano nel Mediterraneo e dei rispettivi rapporti di cattura, indicherebbe che le catture riportate sono state fortemente sottostimate negli ultimi 2 anni, e che i valori effettivi sarebbero simili a quelli riportati a metà anni Novanta (50.000 t) (SCRS, 2007).

Gli ultimi dati sullo stato di salute dello stock di tonno rosso hanno indicato che quasi certamente è soggetto a sovrasfruttamento, giacché la capacità della flotta è superiore alla capacità riproduttiva dello stock. Negli ultimi 4-5 anni è stato registrato un forte declino della porzione riproduttivamente attiva della popolazione ed un incremento del tasso di mortalità imputato alla pesca. Tale declino sembra dovuto in larga parte alla domanda nipponica (Miyake *et al.*, 2003), che ha determinato uno spostamento delle catture soprattutto verso gli esemplari di grossa taglia. Sempre l'analisi dei dati degli ultimi anni mostra come i livelli di prelievo attuali non siano sostenibili e senza una drastica riduzione dello sforzo di pesca e del conseguente prelievo, le previsioni indicano un'alta probabilità di collasso della specie in pochi anni. La Commissione Scientifica dell'ICCAT (SCRS, 2007) ritiene che l'unico percorso possibile da seguire per arrestare il declino della specie ed iniziare il recupero della stessa, implichi una chiusura della pesca nel Mediterraneo durante la stagione riproduttiva e contemporaneamente abbassare la mortalità da pesca sugli esemplari di piccola taglia innalzando notevolmente la taglia minima di cattura. In una specie longeva come il tonno rosso però, benefici effettivi si otterrebbero solo applicando queste norme per tempi lunghi (>10 anni). Nel 2006, l'ICCAT ha deciso di rendere più severe le misure di protezione, abbassando la TAC da 32.000 t a 25.500 t ed innalzando la taglia minima di cattura da 10 kg a 30 kg.

Nel caso del tonno rosso, a differenza di quanto avviene per altre specie ittiche, l'esistenza di impianti di acquacoltura non risolve il problema del depauperamento e della sostenibilità della specie (Covino, 2003). Gli impianti esistenti dipendono totalmente dagli stock selvatici, e non si è ancora in possesso di tecnologie riproduttive utili al fine di creare allevamenti a ciclo completo (dalla riproduzione all'ingrasso). Come riportato in parecchi documenti ICCAT ed in altri

documenti specifici (Miyake *et al.*, 2003), lo sviluppo di questa attività industriale ha, invece, involontariamente creato una serie di difficoltà per il monitoraggio della composizione delle catture effettuate mediante reti a circuizione, consentendo in questo modo di aggirare agevolmente le quote massime di cattura stabilite dall'ICCAT.

Al fine di monitorare lo sviluppo degli “allevamenti” di tonno rosso e di garantire la sostenibilità di queste attività, l'ICCAT ha adottato una serie di misure volte a migliorare la conoscenza dello sfruttamento di tale risorsa ittica. In conformità al Regolamento 896/2004 è stato previsto che:

- gli Stati membri redigano un elenco dei siti d'ingrasso e dei pescherecci autorizzati rispettivamente all'ingrasso ed alla pesca del tonno da ingrassare, e dei soggetti legittimati a trasferire i tonni negli impianti di maricoltura;
- i pescherecci siano tenuti a dichiarare le catture e/o i trasferimenti effettuati, specificando la quantità, il numero, le date ed i luoghi di cattura;
- le aziende autorizzate devono, a loro volta, dichiarare la composizione delle catture che ricevono e redigere le statistiche relative al tonno immesso sul mercato.

Le raccomandazioni ICCAT del 2004 stabiliscono un programma di campionamento per la stima del numero e delle taglie dei tonni catturati destinati all'ingrasso che prevede la raccolta di un campione minimo di lunghezze (LF) o pesi su 100 esemplari ogni 100 tonnellate di tonni in gabbia, o di un campione pari al 10% del totale dei tonni in gabbia. I campionamenti dovrebbero essere condotti durante tutto il periodo di mattanza, in tutte le gabbie di ogni impianto. Questa raccomandazione entrata in vigore nel 2005 è stata inclusa nel regolamento CE. Il campionamento nelle gabbie è piuttosto dispendioso in termini economici, perché è necessaria la presenza di biologi o di tecnici nei vari impianti, durante tutto il periodo di mattanza, che può durare anche parecchi mesi (Di Natale *et al.*, 2006): per tale motivo i controlli sono ancora scarsi.

Concludendo, le attuali strategie di protezione per la specie sono: riduzione della quota prelevabile, innalzamento della taglia minima, controlli e verifiche più severe delle produzioni dichiarate dagli allevatori e sviluppo di tecnologie innovative che ne migliorino l'allevamento. In particolare, il principale obiettivo è arrivare a controllare il ciclo riproduttivo in cattività, cosa che consentirebbe di attenuare lo sforzo di pesca sulle popolazioni selvatiche e di mantenere elevati livelli di produzione.

L'acquacoltura

In realtà il termine “allevamento” per il tonno rosso viene utilizzato in maniera impropria, in quanto tale sistema non comprende la fase riproduttiva (Doumenge, 1996; Lioka *et al.*, 2002).

Attualmente gli impianti esistenti dipendono totalmente dagli stock selvatici. I tonni selvatici sono portati nelle gabbie con il solo fine dell'ingrasso, gestito in modo da aumentare il contenuto di grasso delle carni per ottenere un prodotto di maggior valore sul mercato nipponico.

Aspetti tecnici dell'ingrasso

L'attività di acquacoltura del tonno rosso si basa sull'utilizzo di gabbie per l'ingrasso (Le Gall, 2004). Le gabbie idonee all'ingrasso dei tonni sono strutture galleggianti di diametro di circa 30-50 m e volume di 30.000-50.000 m³, con produzioni (capacità di stoccaggio) finali di 15-40 tonnellate/gabbia. I tonni destinati all'ingrasso vengono pescati da maggio a luglio, nel periodo riproduttivo, durante il quale i tonni salgono in superficie per l'accoppiamento e la deposizione delle uova. I banchi di tonni sono avvistati sempre più spesso da aerei con a bordo gli "avvistatori", che comunicano con un operatore di terra, il quale, a sua volta, informa i battelli dislocati nell'area di pesca e, conoscendo le coordinate di ciascuno, avvisa quelli che si trovano in prossimità del banco. Il peschereccio prossimo all'area raggiunge la zona dove si trova il branco, lo circonda con una rete a circuizione, con la collaborazione di una barca d'appoggio. La rete, perpendicolare rispetto alla superficie dell'acqua, è ristretta progressivamente alla base, intrappolando i tonni che si trovano all'interno della rete (fig. 4). Nel frattempo il rimorchiatore che si trova più vicino alla zona di pesca, si avvicina con le gabbie per il trasporto a rimorchio. Con l'aiuto di subacquei, la gabbia vuota viene ancorata alla rete (fig. 5).



Figura 4: cala di una rete a circuizione; all'interno viene racchiuso il banco di tonni.



Figura 5: gabbia (a sinistra) e rete (al centro) prima del trasferimento.

Gabbia e rete sono dotate di una porta laterale. Il peschereccio stringe la rete, il diametro del cerchio si riduce e, dal varco aperto, i tonni passano dalla rete alla gabbia (fig. 6).



Figura 6: passaggio dei tonni nella porta esistente tra la rete a circuizione e la gabbia di trasporto

Nel momento del passaggio nella gabbia, si perfeziona la vendita del tonno da parte dei pescatori al proprietario delle gabbie di ingrasso. I tonni sono filmati da subacquei mediante una telecamera. La ripresa acquisita viene analizzata dall'acquirente insieme al venditore, che stimano il numero degli esemplari piccoli (generalmente sotto i 150 cm LF) e grandi (generalmente sopra i 150 cm LF), attribuendo un peso medio a ciascuna categoria. A questo punto viene raggiunto l'accordo sul carico di biomassa presente nella gabbia. Il rimorchiatore traina negli impianti le gabbie per il trasporto, contenenti i tonni. Il trasporto avviene alla velocità di un nodo marino (fig. 7) e può durare anche diverse settimane, in relazione alla distanza dall'impianto.

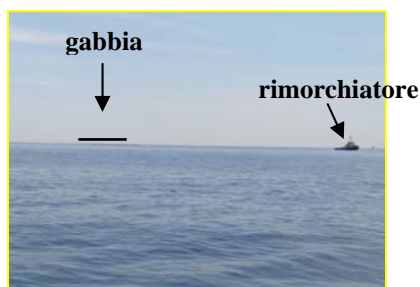


Figura 7: rimorchiatore con gabbia al traino.

Una volta all'interno degli impianti d'acquacoltura, localizzati in aree costiere più o meno riparate (Bronzi *et al.*, 2001), i tonni vengono nutriti con piccoli pelagici come sarde, alaccie, sgombri o cefalopodi, per un periodo della durata di 5-8 mesi (da luglio ad ottobre-marzo, fig. 8). Durante tale periodo, il contenuto di lipidi nel tonno può crescere di circa 10 g/kg a settimana, fino a raggiungere un massimo di 200 g/kg, a seconda del regime alimentare e della temperatura dell'acqua (Aguado *et al.*, 2004). In base alla richiesta del mercato vengono pianificate le mattanze, che in genere sono distribuite durante tutto il periodo d'ingrasso (fig. 9).



Figura 8: alimentazione dei tonni in impianto



Figura 9: fase di mattanza

ASPETTI ECONOMICI, SOCIALI, CULTURALI E POLITICI

L'economia

Il tonno viene commercializzato in tutto il mondo come prodotto fresco, congelato e sott'olio. Particolarmente apprezzate sono la bottarga (gonadi femminili) e la ventresca (masse muscolari della regione addominale).

Per tradizione il Giappone rappresenta il più importante mercato mondiale del tonno rosso, dove si riscontra un consumo annuo che supera i 5 kg a persona; tuttavia, negli ultimi anni, tale mercato si sta progressivamente espandendo anche agli Stati Uniti ed all'Europa (Scarpato & Simeone 2005). In Italia, la componente della domanda per il tonno rosso è molto debole e per lo più locale, in quanto manca la specifica tradizione gastronomica del consumo di pesce crudo, tradizione che è invece ampiamente diffusa tra le comunità orientali. La domanda del Giappone è rivolta soprattutto ai grossi esemplari, o a parti del pesce – come il ventre – che hanno uno specifico contenuto di grassi e può essere utilizzato per il sashimi. Per soddisfare questa domanda, il Giappone era solito rifornirsi dell'analoga specie di tonno che popola il Pacifico (*T. maccoyii*) ma in seguito ad un brusco calo delle catture all'inizio degli anni Ottanta, il Paese ha cercato di diversificare la fonte di approvvigionamento. La flotta peschereccia giapponese ha cominciato quindi ad allontanarsi dalle acque territoriali per raggiungere le aree di pesca del tonno nell'Atlantico e nel Mediterraneo. A sua volta, la domanda proveniente dal mercato giapponese ha spinto le flotte nazionali degli Stati costieri del Mediterraneo ad incrementare la pesca del tonno rosso. Attualmente, il 90% dei tonni allevati ed il 50% di quelli catturati nel Mediterraneo sono destinati al mercato giapponese (Cirspe, 2007). In Giappone il prodotto viene spedito fresco (fig. 10) tramite aeroplani e consumato crudo come sushi o sashimi (fig. 11).



Figura 10: preparazione della spedizione per il mercato giapponese



Figura 11: prodotto pronto sul mercato giapponese per essere venduto per il sushi o sashimi

Alla produzione il prezzo dei tonni vivi destinati all'ingrasso oscilla tra i 3 e i 4 euro/kg per gli esemplari di taglia superiore ai 100 chili, e tra i 2-3 euro/kg per quelli inferiori. Sul mercato giapponese il prezzo all'ingrosso del tonno allevato si aggira intorno ai 40 €/kg, mentre al dettaglio, un esemplare di alta qualità può arrivare a costare anche 7 milioni di Yen, pari a circa 50 mila euro (Cirspe, 2007).

L'industria dell'ingrasso del tonno rosso, introdotta nel Mediterraneo in via sperimentale verso la fine degli anni Ottanta, si è trasformata in un'importante pratica commerciale negli anni Novanta. Dal 1996 al 2003, le poche aziende di allevamento del tonno allora presenti hanno conosciuto un periodo di crescita sensazionale. Tuttavia, il rapido sviluppo della tecnica di ingrasso in altri Paesi del Mediterraneo ha prodotto un sensibile aumento dell'offerta di tonno rosso ed una crescente concorrenza sul mercato. Attualmente sono presenti impianti d'ingrasso in Spagna, Croazia, Italia, Turchia, Grecia, Malta, Marocco, Tunisia, Libia e Cipro per un totale di circa 62 impianti (WWF, 2006), di cui sette in Italia (tre in Sicilia, due in Calabria e due sulla Costiera amalfitana). Nel caso specifico del tonno rosso la maricoltura costituisce una pratica fondamentale per il mercato di questa specie. L'allevamento consente anche di frazionare la vendita del prodotto fresco per poterla effettuare in momenti economicamente più vantaggiosi, limitando la stagionalità dell'offerta. Inoltre la cattività migliora la qualità delle carni, aumentando il tenore lipidico e quindi il valore economico del prodotto per il mercato giapponese.

Dopo un periodo in cui le esportazioni di tonno rosso in Giappone continuavano ad aumentare, negli ultimi anni il mercato giapponese ha cominciato a dar segni di saturazione. Nel 2003, per scongiurare il crollo dei prezzi, molti produttori hanno cominciato a congelare parte della produzione, per commercializzare i propri prodotti allorché la domanda riprenderà a crescere. Inoltre, il prezzo medio annuale del tonno rosso Atlantico e Pacifico è aumentato da 5.279 yen al chilo nel 1986 e a 7.299 yen al chilo nel 1991, per diminuire negli anni successivi fino a 3.800 yen al chilo nel 2004 (Catarci 2004).

La tradizione

La pesca del tonno era praticata sin dall'antichità, lo dimostrano i graffiti nella grotta del Genovese a Levanzo, una delle isole Egadi, e antichi vasi greci e romani che riproducono chiaramente questo pesce (Desse & Desse-Berset, 1994). Testimonianze sulla pesca del tonno risalgono fino al tardo neolitico. I Fenici si organizzarono per la pesca e la lavorazione di questo pesce, tanto pregiato da comparire effigiato sulle monete Fenice e Cartaginesi. La parola tonno, non a caso, deriva dal fenicio *than* "animale di grande mole" (Doumenge, 2000).

I greci e i romani, organizzarono vere e proprie "tonnare volanti", circondando porzioni di costa con un sistema di reti, calato prima dell'estate, che veniva chiamato dai romani "*Magna Retia*". Successivamente il tonno veniva catturato all'interno delle reti con lenze ed ami a cui veniva innescato un pezzo di panno e una penna di uccello. Nell'antichità il tonno rosso veniva consumato sia fresco che salato, ed è stato uno dei principali alimenti delle popolazioni nella storia del mediterraneo. Già Aristotele, infatti, parlava di tonno conservato in giare di terracotta, per essere venduto ai cartaginesi, e il "*garum*", una specie di condimento fatto con le interiora del tonno, era molto conosciuto ed apprezzato dai Romani (Mather *et al.* 1995; Doumenge 1998).

Con la caduta dell'Impero Romano e le invasioni barbariche, non si ebbero più notizie della pesca al tonno, che riemersero in epoca Bizantina. Nel medioevo, le tonnare erano presenti su gran parte delle coste italiane, e molte sono restate attive fino agli anni cinquanta del novecento (Doumenge, 1998; Ravier & Fromentin 2001).

La pesca del tonno, con le tonnare fisse, ha alimentato per secoli la produzione di conserve di tonno, prima sotto sale e nell'ultimo secolo sott'olio, tanto che la vendita di barili di tonno sotto sale è stata, per la Sicilia e Sardegna, l'attività industriale con esportazione più importante per oltre due secoli. Fino alla metà del 1800, quello della salagione era il metodo più utilizzato e sicuro per conservare il pesce, dal 1868 l'utilizzo di scatole in latta chiuse ermeticamente e successivamente sterilizzate ha consentito una diffusione a largo raggio di questo alimento.

Fu in quest'epoca che nacque il periodo d'oro delle tonnare fisse, e che furono costruiti i grandi stabilimenti che incrementarono l'economia legata al tonno (Pavesi, 1889; Berthelot, 1988; Doumenge, 2000). Come già detto questo tipo di pesca attualmente è stata quasi del tutto soppiantata da altre tecniche più redditizie, ma il fascino di un rito che si rinnova uguale da migliaia di anni, attira la curiosità di molti turisti consentendo di mantenere in attività una tradizione e una cultura che altrimenti si andrebbe inevitabilmente perdendo (Fig.12). Al momento, in Italia, sono operative due sole tonnare fisse: in Sicilia a Favignana e in Sardegna a Carloforte.



Figura 12: Cartolina delle isole Egadi: scena di mattanza con turisti spettatori

Aspetti sociali e politici

Data la grande tradizione e l'elevato valore economico della risorsa tonno rosso, esiste un grande interesse a regolamentare a livello internazionale sia la pesca che l'acquacoltura di questa specie (SCRS, 2007; FAO, 2005). Il tonno rosso è una specie che, per motivi trofici e riproduttivi, compie lunghe migrazioni e vive per la maggior parte del tempo in mare aperto (Fromentin & Powers, 2005). Si deve considerare quindi come una risorsa condivisa a più Paesi, in quanto gli stessi tonni si spostano dalle acque internazionali a quelle territoriali di più nazioni. Dunque si tratta di identificare, insieme agli altri Paesi, le regole per lo sfruttamento di una risorsa naturale, al fine di evitare gli effetti delle crisi di abbondanza, dipendenti da fluttuazioni naturali o da effetti di una pesca eccessiva, in modo da salvare "ecologie ed economie". Economia ed Ecologia sono, infatti, gli elementi che consentono di misurare quanto una attività sia destinata a durare nel tempo, sia perché capace di mantenere l'efficienza produttiva ed economica, sia perché strutturata e funzionante in modo tale da consentire un uso duraturo delle risorse naturali (ad esempio: acqua, risorse genetiche, popolazioni, ecosistemi), senza generare conflitti (Cataudella, 2001). Se da un lato è necessario programmare gli investimenti nel settore della pesca e dell'acquacoltura considerando l'immissione dei mezzi tecnici e l'intensificazione delle produzioni è anche necessario considerare la natura degli impatti sui processi naturali, ed elaborare nuovi modelli di sviluppo economico che considerino la vulnerabilità dell'ambiente. I

mondi delle scienze economiche e delle scienze sociali devono creare dei criteri di valutazione dei risultati ottenuti che tengano conto di nuove modalità di misurare il successo delle imprese e delle istituzioni (Cataudella, 2001). Oltre alle economie della utilità, si dovrà percorrere anche la strada delle economie etiche. Queste dovranno considerare i valori della biodiversità, ossia che ogni forma di vita merita rispetto, ma anche i valori culturali, tradizionali e legati al tempo libero della risorsa tonno. Tutto ciò, però, non è attuabile senza un sistema di regole certe ed eque e condivise da tutti i Paesi.

Dal punto di vista commerciale la pesca e l'allevamento del tonno rosso possono ritenersi due attività importanti poiché, se gestite in modo responsabile ed all'insegna della sostenibilità, possono offrire notevoli potenzialità di sviluppo, nuove opportunità di lavoro e guadagni elevati. D'altra parte molte sono le critiche che vengono mosse contro l'attuale processo di industrializzazione della pesca, dell'allevamento e della commercializzazione di questa risorsa.

La prima, sulla quale si concentrano la maggior parte delle istituzioni internazionali, è quella di un eccessivo sfruttamento di questa risorsa ittica, che già da diversi anni sta mostrando segnali di collasso con una netta riduzione del numero delle catture e della taglia media degli individui (SCRS, 2007). L'ICCAT, a causa di dati statistici carenti, non ha ancora trovato una stima ideale per la massima resa sostenibile (MSY) di questa risorsa (Fromentin & Powers, 2005). Inoltre, l'impoverimento della risorsa è in parte dovuto al fatto che non tutti i Paesi rispettano le quote, che ci sono "Flotte fantasma", che operano senza essere titolari di quote, che i controlli sono difficili e che le regole non sono ben fatte.

A ciò bisogna aggiungere che la presenza di impianti di allevamento non risolve il problema della preservazione della sostenibilità della specie, in quanto, come detto, l'utilizzazione di tali impianti consente soltanto l'ingrasso dei tonni catturati e non la riproduzione degli stessi.

Criticabile è anche la scelta di allevare animali al vertice della rete trofica, in quanto sono pesci che richiedono una dieta con forti componenti di origine animale e che quindi è considerata energeticamente dispendiosa (FAO, 1995). Il fatto poi, che non si sia ancora messo a punto una dieta artificiale bilanciata costringe gli allevatori ad alimentare i tonni con pesce azzurro congelato, il che determina da una parte grandi sprechi per i produttori dall'altra uno sforzo di pesca maggiore sul pesce foraggio.

Gli impianti, inoltre, se vengono posizionati in siti non idonei, in termini di caratteristiche oceanografiche, batimetriche e di circolazione dell'acqua di profondità, rischiano di produrre esternalità negative sugli ecosistemi acquatici. Gli scarichi di azoto e fosforo provenienti dagli escrementi degli animali allevati e l'accumolo del pesce non ingerito sul fondo possono alterare la qualità dell'acqua e dei sedimenti causando di conseguenza anche alterazioni sugli organismi marini.

Sebbene la pesca e l'allevamento del tonno possano determinare alcuni impatti indesiderati sull'ambiente marino e sulla conservazione delle risorse naturali, la sfida vera non sta nell'estromettere le attività produttive, bensì nella capacità di saperle dimensionare e renderle appropriate per evitare che uno sfruttamento irrazionale comporti la perdita di opportunità future, considerando nel conto anche quelle che oggi non possiamo conoscere. La pesca e l'acquacoltura moderna sono attività altamente tecnologiche, e la stessa capacità di misura e controllo degli impatti sull'ambiente dipende dalla possibilità di disporre di dati scientifici e tecnologie appropriate, e che questi siano accessibili. Nello sviluppo di una acquacoltura responsabile la prima tappa è la corretta scelta tecnologica, un impianto correttamente collocato nell'ambiente significa migliori opportunità economiche e minori impatti ambientali, se la capacità portante del sistema viene rispettata. Soprattutto dove c'è bisogno di produrre, l'intensificazione sembra una via obbligata. Ma chi pianifica, deve prevedere la natura degli impatti attesi e dovrà considerare, come successo del progetto, la capacità di contenimento e controllo delle esternalità negative. Dunque tecnologie per produrre e per controllare gli impatti. La ricerca di tecnologie sicure è il primo passo verso una acquacoltura responsabile e sostenibile.

L'ACQUACOLTURA SOSTENIBILE

Nel 1995 la FAO (FAO, 1995) ha pubblicato il Codice di Condotta per la Pesca Responsabile (CCPR) che include anche i principi per lo sviluppo di un'acquacoltura sostenibile. Il Codice è stato approvato nell'ottobre del 1995 da tutti i Paesi che partecipavano al Comitato della Pesca della FAO, che, nella sostanza, è il momento di incontro e di dibattito, in materia di pesca ed acquacoltura, degli Stati che afferiscono alle Nazioni Unite.

Il principio dell'integrazione tra ambiente e sviluppo è stato posto alla base del cosiddetto *Sviluppo Sostenibile*. L'obiettivo principale è conservare le risorse naturali, garantendone il trasferimento alle future generazioni, avviando modelli di sviluppo capaci di produrre non intaccando la rinnovabilità delle risorse biologiche, non più intese come beni isolati, ma come viventi parti di un ecosistema.

L'acquacoltura ha dimostrato enormi potenzialità e tassi di crescita elevati, e come grande missione ha quella di produrre per soddisfare la crescente domanda di prodotti che la pesca oceanica non può coprire (FAO, 2000). Pesca ed acquacoltura, nella loro diversità e nel pieno rispetto delle specificità tecniche ed economiche, vanno trattate nello stesso contenitore, soprattutto per la serie di interazioni che le caratterizzano.

Nell'art. 9 del CCPR sono espresse una serie di azioni che dovrebbero essere condotte per praticare un'acquacoltura responsabile, (Tab.1, FAO, 1997). Gli Stati dovrebbero, ad esempio, mantenere l'integrità delle comunità acquatiche, promuovere procedure appropriate per la selezione dei riproduttori, per la produzione di uova ed avannotti, e l'utilizzo di prodotti farmacologici a basso impatto ambientale. L'art. 9.3.5 esorta nello specifico il mondo della ricerca legato all'acquacoltura ad approfondire le conoscenze relative alle specie a rischio o minacciate. È infatti necessario ricordare che l'acquacoltura moderna è un'attività molto giovane, e che gran parte delle specie oggi allevate fino a venti anni fa comparivano esclusivamente nelle liste dei prodotti pescati. Il mondo dei Teleostei presenta una grande diversità in specie, indice di dinamiche evolutive molto attive. Il numero di adattamenti è sorprendente, da quelli alla vita nelle sorgenti di alta montagna, a quelli necessari per svolgere il ciclo vitale negli spazi pelagici e negli abissi.

Un'acquacoltura responsabile deve usare al meglio tanta diversità, che deve essere conosciuta per essere gestita. Se da un lato è possibile raggiungere risultati soddisfacenti, grazie all'esperienza acquisita in tempi molto lunghi, attraverso un processo per prove ed errori (la piscicoltura cinese o la nostra vallicoltura ne sono, se pur a scale dimensionali differenti, un esempio), dall'altro l'applicazione di un corretto metodo scientifico per accelerare realmente il progresso dovrebbe evitare "forzature" dei processi naturali. Dunque per ogni specie allevata

dovremmo disporre di un minimo di basi conoscitive affidabili. I vari livelli di organizzazione biologica, che sono alla base della biodiversità, dalle cellule agli organismi, dalle comunità agli ecosistemi, debbono essere conosciuti, con i metodi di studio appropriati.

Tabella 1: Linee guida derivate dall'art. 9 del CCPR (FAO, 97) per la produzione responsabile di uova, larve e giovanili di specie ittiche

CCPR (Par.)	Riproduttori	Gameti	Larve e giovanili
9.03	Perdita di variabilità genetica	Riduzione fertilità e schiusa	Sopravvivenza ridotta
9.04	Stress Riduzione delle performances Trasferimento di patogeni		Deformazioni Alterazioni del fenotipo
Linee guida			
9.03.03	Selezione e miglioramento genetico	Indicatori di qualità	Codici di "Buone pratiche di allevamento"
9.03.04	Aumento del numero di riproduttori Programmi di riproduzione e selezione Registrazione dati di avannotteria Avannotterie specializzate per il miglioramento del seme	Ottenuti durante tutta la stagione riproduttiva naturale Regole e linee guida per la produzione di ibridi e transgenici	
9.03.05	Mantenimento della variabilità genetica Broodstock geneticamente compatibili No incroci e/o ibridi No domesticazione	Conservazione ex situ	Riprodotti in condizioni simil-naturali (catene trofiche, ambiente)
9.04.02	Riduzione stress	Igiene ambientale	Riduzione stress
9.04.03	Programmi di profilassi, diagnosi e terapia		Riduzione densità Programmi di profilassi, diagnosi e terapia
9.04.04	Igiene ambientale Registrazione dati Miglioramento diete Sviluppo vaccini (soprattutto contro agenti trasmessi verticalmente)	Trasferimento costituenti (resistenza patogeni e miglioramento crescita)	Miglioramento diete Riduzione uso farmaci

Certamente gran parte del recente processo di sviluppo è avvenuto considerando le produzioni animali e vegetali come scatole nere, da non aprire, il che ha determinato una carenza nelle

conoscenze fondamentali. Questo approccio pragmatico può dare buoni risultati produttivi, ma non consente un inserimento corretto e sostenibile dell'attività produttiva nel mondo che la circonda, con gravi rischi ambientali per le imprese e per i consumatori.

Deve esistere un patrimonio di conoscenze per misurare gli effetti che l'attività di acquacoltura può avere sulle risorse, garantendo crescita ed opportunità occupazionali. Dunque il CCPR, che si rivolge principalmente agli Stati, certamente sottintende l'esistenza e la necessità di una ricerca scientifica per poter misurare, e soprattutto prevenire, gli impatti negativi che, anche in totale buona fede, possono essere generati dall'ignoranza. Una buona ricerca scientifica, socio-economica e giuridica garantisce le imprese dall'applicazione di norme precauzionali spesso sommarie, apre la strada all'innovazione tecnologica, e offre agli Stati strumenti per definire meglio le regole.

Nell'art. 6.4, il CCPR fa riferimento alla necessità di prendere decisioni, per la gestione e la conservazione, alla luce delle migliori evidenze scientifiche, valorizzando specialmente le conoscenze tradizionali. Trattandosi di sistemi complessi che possono essere osservati da più punti di vista, talvolta i giudizi decisionali possono essere discordanti. Ciò significa che le dimensioni economiche, sociali, ecologiche e di governance, debbono essere valutate non solo grazie a criteri specifici, ma anche considerando la serie di relazioni che sono alla base del sistema stesso, richiedendo un approccio "di sistema".

Nell'ambito delle Linee Guida Tecniche pubblicate dalla FAO nel 1999 (FAO, 1999) è stato pubblicato un documento finalizzato a definire alcuni Indicatori per lo Sviluppo Sostenibile della pesca. In sintesi, lo scopo degli indicatori è quello di fornire la possibilità di migliorare la comunicazione, la trasparenza, la validità e l'affidabilità nella gestione delle risorse naturali. Gli Indicatori non debbono portare a costruire strumenti di valutazione rigidi ed applicabili in tutte le situazioni. Bisogna definire gli obiettivi di qualità che si vogliono perseguire e scegliere, secondo le varie dimensioni, gli indicatori più appropriati per misurare i risultati ottenuti e per valutare le tendenze per il futuro. Anche in assenza di evidenze scientifiche, l'uso integrato di più indicatori, può aiutare a prendere decisioni corrette. Oltre a produrre bisogna considerare una serie di fattori esterni quali l'ambiente, la sicurezza alimentare, la qualità, i consumatori, e proprio su queste necessità si basa una moderna acquacoltura che sia, appunto, responsabile e sostenibile.

SINTESI DELLE CONOSCENZE SULLA BIOLOGIA RIPRODUTTIVA DEI TELEOSTEI IN CATTIVITÀ

Introduzione

L'acquacoltura intensiva di pesci marini è una attività che si è sviluppata solamente nell'ultimo secolo e confrontata alle produzioni degli animali terrestri si avvale ancora di metodi di produzione "primitivi" (Kirk, 1987; Forster, 1999). Una delle più grandi limitazioni nello sviluppo dell'acquacoltura è l'incapacità di controllare completamente i processi riproduttivi dei pesci mantenuti in cattività. Solo in pochissime specie si osserva, infatti, uno sviluppo naturale delle gonadi ed il raggiungimento della maturità riproduttiva anche in condizioni di allevamento. Molti pesci, invece, quando sono allevati presentano differenti gradi di disfunzioni riproduttive. Nella maggior parte dei casi la mancanza di stimoli ambientali adeguati e l'inevitabile stress da confinamento determina nelle femmine l'arresto della maturazione finale degli oociti (FOM) e della deposizione delle uova (Zohar, 1989b; Peter *et al.*, 1993), mentre nei maschi la riduzione della qualità e della produzione di sperma. (Billard, 1986, 1989). Nei casi più gravi, per ottenere uova e giovanili da allevare si deve ricorrere al prelievo in natura con la conseguenza che tale prelievo è imprevedibile ed inaffidabile, e perciò inappropriato per un'acquacoltura di tipo commerciale (Zohar & Mylonas, 2001), oltre ad incidere a volte pesantemente sul reclutamento di giovanili nello stock selvatico. Altre volte le disfunzioni possono essere migliorate utilizzando elaborate e costose manipolazioni di alcuni parametri ambientali come: la temperatura, il fotoperiodo, la salinità, la profondità, il volume delle vasche, il substrato o la vegetazione, ecc. (Zohar, 1989b; Munro *et al.*, 1990; Yaron, 1995). In alcune specie, tra le quali quelle di molti pesci marini particolarmente pregiati, l'utilizzo di vari trattamenti ormonali rappresenta l'unico modo per controllare il ciclo riproduttivo (Donaldson & Hunter, 1983; Peter *et al.*, 1988, 1993; Zohar, 1988, 1989a,b; Tucker, 1994). Questi metodi si sono rivelati molto efficaci, ma per agire al meglio devono essere applicati quando la gonade dei pesci trattati si trova in un avanzato stadio di sviluppo e il trattamento deve essere ripetuto spesso più volte per essere efficace (Mylonas & Zohar, 2001). Questi trattamenti utilizzavano inizialmente estratti ipofisari (contenenti gonadotropine GtH) ottenuti da pesci maturi (Housay, 1930), mentre attualmente prevedono l'utilizzo di analoghi sintetici dell'ormone che determina il rilascio delle gonadotropine (GnRH α) (Peter *et al.*, 1988, 1993; Zohar, 1988, 1989a,b; Crim & Bettles, 1997), inseriti in sistemi di trasporto a lento rilascio (Crim *et al.*, 1988b; Zohar *et al.*, 1990b; 1994; Zohar, 1996; Mylonas *et al.*, 1995a). Questi metodi hanno contribuito in modo significativo a

sviluppare sistemi più affidabili e meno specie-specifici per il controllo della riproduzione di pesci allevati.

Il ciclo riproduttivo nei pesci

I pesci delle aree temperate hanno generalmente una riproduzione di tipo stagionale, controllata da parametri ambientali come il fotoperiodo, la temperatura, i cicli lunari e tidali (Munro *et al.*, 1990). Il ciclo riproduttivo può essere suddiviso in due principali fasi. La proliferazione, la crescita e la differenziazione dei gameti costituiscono la prima fase (vitellogenesi e spermatogenesi), mentre la maturazione finale degli oociti (FOM) e degli spermatozoi, con lo stadio di preparazione al loro rilascio (spermiazione) costituisce la seconda fase.

Vitellogenesi e maturazione finale degli oociti

Il principale evento nella fase di vitellogenesi consiste nella produzione della proteina precursore del tuorlo (vitellogenina) e del suo sequestro negli oociti in crescita (Tyler & Sumpter, 1996). La maturazione finale degli oociti avviene dopo che si è completata la fase di vitellogenesi e include cambiamenti citologici e nucleari che preparano gli oociti all'ovulazione ed alla fecondazione (Goetz, 1983; Nagahama, 1983). Durante la FOM, il nucleo o vescicola germinale (GV) migra verso la periferia dell'oocita ed in particolare verso l'area del micropilo, ossia il lato dal quale penetreranno gli spermatozoi (Gilkey, 1981). Durante o immediatamente dopo la migrazione del nucleo, le gocce lipidiche e i globuli di tuorlo si fondono rispettivamente tra di loro, e successivamente si rompe la membrana nucleare e ricomincia la meiosi che si era arrestata in profase I durante la vitellogenesi (Jalabert *et al.*, 1991). Gli oociti sono ovulati con i cromosomi bloccati in metafase II e la meiosi si completa al momento della fecondazione (Goetz, 1983; Nagahama, 1983).

Nei Teleostei è possibile riconoscere tre differenti tipologie di sviluppo dell'ovario: sincrono, sincrono a gruppi e asincrono (Wallace & Selman, 1981; Tyler & Sumpter, 1996). Lo sviluppo sincrono è caratteristico delle specie semelpare come il salmone del pacifico (*Oncorhynchus* spp.) e l'anguilla che si riproducono una sola volta nella vita. Nei pesci con sviluppo sincrono a gruppi si osservano due o più distinte popolazioni di oociti a differente stadio di sviluppo nell'ovario. C'è una popolazione di oociti primari e una o più popolazioni di oociti in sviluppo. Alcune specie, come il persico spigola o la trota, rilasciano un solo lotto di uova durante la stagione di deposizione, altre specie, come la spigola (*Dicentrarchus labrax*), alcuni pleuronettidi e siganidi hanno un ovario sincrono a gruppi ma rilasciano nel corso della stessa stagione riproduttiva più lotti di uova. Infine, le specie con sviluppo dell'ovario asincrono hanno

una popolazione di oociti primari e una popolazione eterogenea di oociti in vitellogenesi; da questa ultima, alcuni lotti sono reclutati per raggiungere la maturazione finale durante la stagione riproduttiva, ad intervalli regolari o semiregolari. La distinzione tra ovario asincrono e sincrono a gruppi in grado di rilasciare più lotti è molto sottile, specialmente in quei pesci che hanno una bassa frequenza di deposizione (3-5 volte) e si basa sulle modalità sincrone con cui le popolazioni distinte di oociti tendono a svilupparsi.

Spermatogenesi e spermiazione

La spermatogenesi è la prima fase del ciclo riproduttivo maschile ed è completata con la produzione di spermatozoi flagellati, processo denominato spermiogenesi (Billard, 1986). La maturazione dei testicoli, o spermiazione, avviene durante la stagione riproduttiva e include l'acquisizione della capacità di movimento da parte dello spermatozoo, l'idratazione della testa con il plasma seminale e la produzione di sperma (Nagahama, 1994; Billard *et al.*, 1984). In alcuni pesci la spermatogenesi e la spermiazione sono temporalmente separati, con la spermiazione che avviene dopo che si è concluso il processo di spermiogenesi. Come risultato, durante la stagione riproduttiva i testicoli contengono esclusivamente spermatozoi (Billard, 1986; Malison *et al.*, 1994). Comunque in molte specie esiste una sovrapposizione tra i due processi, con la spermatogenesi che si attiva durante il periodo riproduttivo insieme con la spermiazione (Jackson & Sullivan, 1995; Matsuyama *et al.*, 1995a,b).

Endocrinologia della riproduzione

Il sistema di controllo endocrino della riproduzione nei pesci è regolato dal cervello attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade, analogamente a quanto avviene nei mammiferi (Fig. 13). Il cervello integra le informazioni provenienti da fonti interne ed esterne e, in base a queste, rilascia per mezzo di cellule neurosecretorie, principalmente localizzate nell'ipotalamo, l'ormone che determina il rilascio delle gonadotropine, GnRH (Yu *et al.*, 1997). Questo decapeptide agisce a livello della ghiandola ipofisaria e controlla la sintesi e il rilascio di gonadotropine (GtH) (Kobayashi *et al.*, 1997). L'ipofisi produce anche dopamina, che, nella maggior parte dei pesci, ha un effetto inibente, ossia un controllo negativo nel rilascio delle GtH (Peter & Yu, 1977).

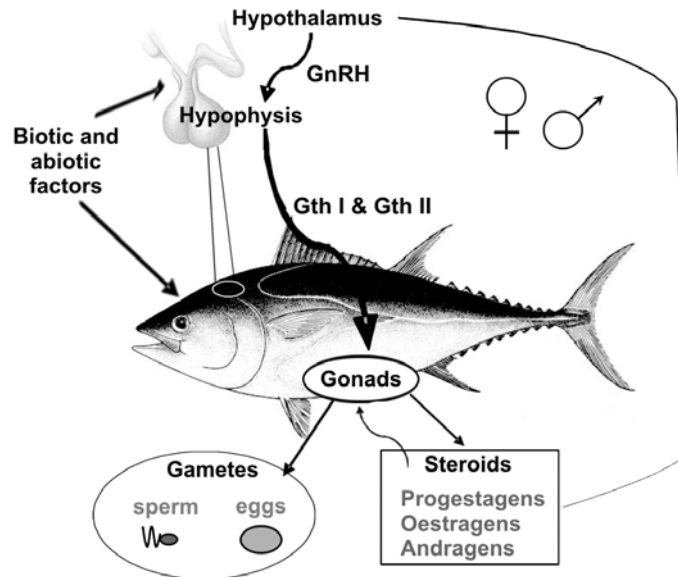


Figura 13: Schema semplificato del controllo endocrino della riproduzione nei pesci .

I pesci posseggono 2 o 3 differenti varianti di GnRH (Gothilf *et al.*, 1996; Holland *et al.*, 2000a), e 14 varianti sono state identificate fino a questo momento nei Vertebrati. Tutte le forme di GnRH hanno una grande capacità di rilasciare GtH (Zohar *et al.*, 1995a), e nell'ipofisi possono essere presenti anche due forme contemporaneamente (Holland *et al.*, 1998a,b; Holland *et al.*, 2000b). Le gonadotropine raggiungono le gonadi per mezzo del circolo sanguigno e le inducono a produrre i gameti. Il controllo ipofisario della riproduzione avviene attraverso un doppio sistema basato sull'utilizzo delle GtH (Schulz, 1995). Due tipi di GtH, differenti per struttura e ruolo chimico, sono state identificate nei Teleostei: l'ormone follicolo stimolante (FSH o GtH I), responsabile della regolazione della vitellogenesi e della spermatogenesi, e l'ormone luteinizzante (LH o GtH II) impiegato nella regolazione della FOM e della spermiazione (Slater *et al.*, 1994; Moberg *et al.*, 1995) ed in grado, inoltre, di influenzare il comportamento sessuale (Pankhurst & Thomas, 1998). In alcune specie, l'LH è la forma più prominente durante l'intero ciclo riproduttivo (Van Der Kraak *et al.*, 1992; Yaron, 1995).

Femmine

Durante la fase di vitellogenesi, l'FSH o l'LH stimolano le cellule della teca a produrre il testosterone (T) che a sua volta viene aromatizzato dalle cellule della granulosa in 17- β -estradiolo (E_2) (Nagahama, 1994). Il fegato in risposta allo stimolo dell' E_2 produce vitellogenina, che viene sequestrata negli oociti, attraverso un sistema mediato da recettori e amplificato dall'azione dell'FSH. Completato il processo di vitellogenesi, nel plasma si osserva un innalzamento dei livelli di LH che a sua volta ha un feed-back

negativo sui livelli plasmatici dell'E₂, un aumento transiente del T durante la migrazione del nucleo verso il polo animale e un aumento consistente dei livelli plasmatici degli steroidi che inducono la maturazione (MIS), i quali agiscono a livello della membrana degli oociti per indurre la FOM (Nagahama, 1994; Nagahama *et al.*, 1994; Peter & Yu, 1997). Gli steroidi più comuni, che inducono la maturazione, sono 17,20-β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20-β-P) ed il 17,20-β,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20β,21-P). Livelli elevati di LH, prima della FOM, sono importanti per indurre la competenza di maturazione negli oociti (Kagawa *et al.*, 1998), che consiste in un processo di nuova sintesi dei recettori in grado di riconoscere gli steroidi che inducono la maturazione (Thomas & Ghosh, 1995). Oltre all'LH, anche il fattore di crescita I (IGF-I) è in grado di indurre la competenza di maturazione negli oociti e la FOM (Negatu *et al.*, 1998). Il tempo necessario per attivare la cascata ormonale e il processo di FOM è molto variabile a seconda della specie, andando da poche ore (Zohar *et al.*, 1988) a pochi giorni (Mylonas *et al.*, 1998a) fino a più di una settimana (Scott *et al.*, 1983).

Maschi

Le gonadotropine regolano la spermatogenesi attraverso la produzione di androgeni da parte dei testicoli, principalmente 11-ketotestosterone (11-KT; Borg, 1994). Il T è il precursore dell'11-KT, ed i livelli di questi due androgeni co-variano durante la maggior parte della stagione riproduttiva. I livelli più alti di 11-KT nel plasma si registrano durante la spermiogenesi e decrescono appena prima, o durante il periodo di spermiazione. Uno studio *in vitro* condotto sui testicoli immaturi dell'anguilla giapponese (*Anguilla japonica*) ha mostrato che la somministrazione di GtH induce la produzione di 11-KT da parte delle cellule di Leyding e di attivina B da parte delle cellule del Sertoli, che a loro volta inducono la spermatogenesi (Miura *et al.*, 1991). Analogamente a quanto succede nelle femmine, all'inizio della stagione riproduttiva si osserva un incremento dei livelli plasmatici di LH che causa uno spostamento della produzione degli ormoni steroidei dagli androgeni agli steroidi che inducono la maturazione (Nagahama, 1994). L'ormone luteinizzante e gli steroidi che inducono la maturazione sono responsabili dell'aumento del volume dello sperma attraverso la stimolazione della produzione del liquido seminale (Marshall *et al.*, 1989; Pankhurst, 1994). In particolare, i MIS determinano un incremento del pH del plasma seminale, che rende attiva la motilità degli spermatozoi immagazzinati (Miura *et al.*, 1995; Ohta *et al.*, 1997).

Disfunzioni riproduttive nei pesci allevati

Sebbene il termine “domestico” sia spesso utilizzato in riferimento a riproduttori mantenuti in cattività, attualmente non è possibile identificare una specie ittica domestica, almeno in accordo con la definizione che viene utilizzata per gli animali terrestri. Analogamente alla maggior parte degli animali selvatici mantenuti in cattività, molti pesci di interesse commerciale per l’industria dell’acquacoltura esibiscono disfunzioni riproduttive. Queste disfunzioni sono probabilmente il risultato della combinazione dello stress indotto dalla cattività (Sumpter *et al.*, 1994; Pankhurst & Van der Kraak, 1997), e della mancanza di un ambiente “naturale” di deposizione (Zohar, 1989a,b; Yaron, 1995; Battaglene & Selosse, 1996; Ohta *et al.*, 1997). Alcune volte, i problemi riproduttivi si riducono con il passare degli anni e dopo molte generazioni di pesci che si riproducono e che sono allevati in cattività. Un esempio di questo effetto di “domesticazione” lo si osserva nell’orata (*Sparus aurata*). L’allevamento di questo sparide è iniziato in Mediterraneo agli inizi degli anni settanta. Il solo modo di ottenere un numero cospicuo di uova era attraverso la somministrazione di ormoni esogeni (Gordin & Zohar, 1978; Zohar & Gordin, 1979; Zohar *et al.*, 1984). Selezionando nel tempo i riproduttori che meglio si adattavano ad una condizione di cattività, l’utilizzo di ormoni è stato via via ridotto fino a non essere più necessario. Attualmente l’orata è in grado di deporre spontaneamente uova per più di 3 mesi consecutivamente durante la stagione riproduttiva (Barbaro *et al.*, 1997).

I problemi riproduttivi di pesci mantenuti in cattività sono normalmente più gravi nelle femmine ed, in generale, possono essere classificati in tre tipologie. Il primo, e anche il più grave, è il completo arresto del processo di oogenesi e della spermatogenesi, come si verifica, ad esempio, nell’anguilla europea (*Anguilla anguilla*). In natura la gonade dell’anguilla si sviluppa in un arco temporale di 18 mesi, periodo che occorre per migrare dagli ambienti fluviali in cui generalmente si nutre alle aree di deposizione site nel Mar dei Sargassi. Nelle anguille allevate, però, l’impossibilità di migrare sembra essere la causa dell’arresto dello sviluppo della gonade (Fontaine, 1975).

Il secondo tipo di disfunzione riproduttiva nelle femmine allevate è il mancato raggiungimento della FOM. La vitellogenesi, in questi casi, sembra procedere normalmente, ma all’inizio della stagione riproduttiva gli oociti in stadio avanzato di vitellogenesi non procedono oltre e vanno incontro a regressione, processo che prende il nome di *atresia* (Tucker, 1994; Berlinsky *et al.*, 1997; Larsson *et al.*, 1997; Mylonas *et al.*, 1997b,c). Questo è il problema più comune riscontrato in acquacoltura.

Il terzo tipo di disfunzione riproduttiva è l’assenza di deposizione alla fine del ciclo riproduttivo. In specie che esibiscono tale problema, gli oociti vanno incontro ad un normale processo di

vitellogenesi, FOM ed ovulazione in risposta a stimoli fisiologici ed ambientali adeguati, ma le uova ovulate non vengono rilasciate nell'acqua. A questo punto le uova possono avere uno o due destini. Nei salmonidi, le uova sono trattenute nella cavità addominale e sono lentamente riassorbite nei mesi successivi (Bromage *et al.*, 1992). Le femmine di alcune specie marine, come il persico spigola (Zohar & Mylonas, 2001), il dentice e la cernia bianca (Hassin *et al.*, 1997) possono rilasciare queste uova poco tempo dopo l'ovulazione (da qualche ora a pochi giorni) anche in assenza di comportamenti riproduttivi. Ovviamente, per ottenere delle uova vitali da tali pesci è necessario spremere manualmente i pesci e fertilizzare le uova artificialmente. La spremitura deve, però, essere eseguita in una precisa finestra temporale dopo l'ovulazione, altrimenti le uova diventano eccessivamente mature e non possono essere fecondate. L'ampiezza del *range* temporale può essere molto variabile, da qualche minuto fino a poche settimane, e varia con la specie e la temperatura. Nei salmonidi, che vivono in acque fredde, le uova possono essere mantenute nella cavità addominale per almeno una settimana dopo l'ovulazione senza una significativa riduzione della fertilità e del successo di schiusa (Sakai *et al.*, 1975; Springate *et al.*, 1984). In specie come il pesce gatto (*Clarias macrocephalus*), il rombo (*Scophthalmus maximus*) ed il merluzzo (*Gadus morua*) la fertilità è mantenuta per circa 10 h dopo l'ovulazione (Kjørsvik *et al.*, 1990). Invece, in pesci come il persico spigola (Stevens, 1966) e il persico spigola bianco (Mylonas *et al.*, 1996) la perdita di fertilità avviene in meno di 1 h. L'ovulazione tra le femmine allevate spesso non è sincronizzata e quindi l'intero parco riproduttori deve essere controllato manualmente almeno 2 o 3 volte la settimana durante il naturale periodo di deposizione. Tale gestione dei pesci è laboriosa e può indurre stress, ferite, malattie ed elevate mortalità nonché ridurre la qualità delle uova ottenute. Al fine di sincronizzare l'ovulazione dei riproduttori in un arco temporale ridotto (1-2 settimane) sono state sviluppate delle tecniche di induzione della maturazione basate sulla somministrazione di ormoni esogeni, che ha permesso di ridurre lo stress e rendere più efficiente la raccolta delle uova (Donaldson & Hunter, 1983; Zohar, 1988).

Ad eccezione dell'anguilla europea, le disfunzioni riproduttive osservate nei riproduttori maschi allevati sono limitate alla riduzione della produzione e qualità dello sperma dovuto alla cattività. Specialmente i riproduttori maschi selvatici catturati durante la stagione riproduttiva e portati in cattività producono sperma con spermatozoi poco attivi (Berlinsky *et al.*, 1997), e un liquido spermatico altamente viscoso che ha difficoltà a mescolarsi con l'acqua e il più delle volte non consente la fecondazione delle uova (Vermeirssen *et al.*, 1998, 2000). Un altro problema riguarda la quantità di sperma prodotto, spesso insufficiente a supportare le procedure di inseminazione artificiale praticate nelle avannotterie, al fine di fecondare le uova delle femmine

che raggiungono la FOM e l'ovulazione in tempi differenti dai maschi durante il periodo riproduttivo.

Induzione ormonale dell'ovulazione e della deposizione

Il lavoro scientifico che ha dato lo spunto per lo sviluppo degli approcci farmacologici per l'induzione della maturazione nei pesci è stato presentato nel 1930 dal Professore B. A. Houssay (Houssay, 1930), vincitore nel 1947 del Premio Nobel in Fisiologia e Medicina. Nel suo studio sulla funzione dell'ipofisi, aveva osservato che le femmine di *Cnesterodon decemmaculatus* (*Poeciliidae*), dopo essere state trattate con omogenato ipofisario, venivano indotte all'ovulazione. La ghiandola ipofisaria doveva contenere, quindi, l'ormone necessario per innescare la FOM e l'ovulazione. Studi molto più recenti (Zohar, 1988; Mylonas *et al.*, 1997b; 1998b) hanno dimostrato che l'ormone principalmente responsabile della deposizione è l'LH. In femmine che depongono spontaneamente, i livelli ipofisari di LH aumentano gradualmente con il progredire della vitellogenesi, raggiungendo i livelli massimi nel momento in cui questo processo si conclude, a cui fa seguito nel momento della FOM e ovulazione un incremento rapido dei livelli di LH plasmatici (Zohar, 1988; Elizur *et al.*, 1995). Nei pesci allevati, che presentano disfunzioni nella FOM e nell'ovulazione, invece, l'LH viene ugualmente prodotto e accumulato nell'ipofisi ma non viene rilasciato nel circolo sanguigno. Conseguentemente, l'LH non raggiunge gli ovari, che sono gli organi bersaglio, per innescare la maturazione finale degli oociti.

Utilizzo di preparati a base di gonadotropine (GtH)

Omogenati ipofisari ed estratti ipofisari sono stati i primi preparati a base di gonadotropine (GtH) ad essere utilizzati per l'induzione della deposizione nei pesci (Von Ihering, 1937; Fontenele, 1955). Questa tecnica ha preso il nome di *ipofisazione* ed è stata utilizzata a lungo in molte specie allevate (Donaldson & Hunter, 1983). Ipofisi prelevate da pesci durante il periodo riproduttivo si rivelavano più efficaci nell'indurre la deposizione per il loro maggiore contenuto di GtH (Zohar, 1989a,b). Le dosi e la tempistica di somministrazione è variata nel tempo ed è specie-dipendente (Palmer *et al.* 1954; Fontenele, 1955). Una dose efficace, comunque, ha un intervallo compreso tra 2 e 10 mg di ipofisi per kg di massa corporea del pesce ricevente (Thalathiah *et al.*, 1988; Parauka *et al.*, 1991; Yaron, 1995; Kucharczyk *et al.*, 1997). L'uso di omogenati ipofisari è, in ogni caso, associato a delle controindicazioni di cui la più importante è la grande variabilità nel contenuto di LH ipofisario. In secondo luogo, la presenza di altri principi ormonali nell'ipofisi che possono avere un effetto contrario sulla fisiologia dei pesci trattati e, terzo, la possibilità di trasmettere malattie dai pesci donatori ai riproduttori da trattare.

Il contenuto di LH nell'ipofisi varia in accordo al peso, al sesso e all'età del pesce donatore, al periodo dell'anno in cui il pesce viene sacrificato, ed al tempo trascorso dalla morte del pesce alla raccolta dell'ipofisi (Yaron, 1995). Quindi, la raccolta e la preparazione degli omogenati ipofisari richiede un approccio laborioso ed un'elevata esperienza oltre a dipendere da un elevato numero di altre variabili. Al fine di ridurre tale variabilità che provocava un'elevata imprevedibilità nei successi, gli sforzi successivi sono stati orientati verso l'acquisizione di LH purificato o parzialmente purificato ottenuto da ipofisi mature di riproduttori di pesci ed isolato per cromatografia. I preparati purificati più utilizzati sono stati prelevati da salmone e carpa (Donaldson, 1973; Yaron, 1995), che però mostrarono un'elevata specie-specificità e quindi risultarono utilizzabili solo nelle specie molto vicine filogeneticamente. Inoltre, gli elevati costi di produzione dell'LH purificato ne limitarono fortemente il suo utilizzo. A partire dai primi anni settanta, alcuni ricercatori sperimentarono la somministrazione di estratto di gonadotropina corionica umana (hCG), che viene isolata facilmente dall'urina delle donne incinte (Lam, 1982; Donaldson & Hunter, 1983; Zohar, 1989b). Fra le gonadotropine, l'hCG è la più utilizzata per la sua facile reperibilità e per gli elevati standard di purezza e attività (Lee *et al.*, 1988). L'hCG è spesso somministrata in una dose singola (100-4000 IU/kg), e la sua efficacia è probabilmente dovuta al tempo relativamente lungo di permanenza nel circolo sanguigno (Ohta & Tanaka, 1997). Un vantaggio dell'hCG è quello di agire abbastanza velocemente con una stimolazione diretta a livello delle gonadi e di non richiedere la presenza di LH immagazzinato o dell'attivazione delle gonadotropine ipofisarie (Hodson & Sullivan, 1993). La controindicazione più grande all'utilizzo dell'hCG è che, essendo una molecola abbastanza grande, è altamente immuno-stimolante e con elevato potere allergenico, risultando inefficace se somministrata nelle stagioni riproduttive successive: il sistema immunitario riconosce come sostanze esogene questi grandi peptidi e per questo motivo sviluppa contro di essi anticorpi specifici (Lam, 1982; Donaldson & Hunter, 1983; Zohar, 1989a). Quando lo stesso trattamento viene applicato nella stagione successiva, i pesci sviluppano una risposta immunitaria e l'iniezione di GtH è immuno-neutralizzata. Ogni anno dunque è necessario fornire una dose sempre più elevata per indurre la deposizione, e spesso tale incremento non risulta comunque sufficiente.

Utilizzo dell'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH) e agonisti (GnRHa)

L'ormone ipotalamico rilasciante le gonadotropine (LH-RH o GnRH), è stato scoperto agli inizi degli anni settanta nei mammiferi (Schally, 1978), e successivamente diversi ricercatori hanno iniziato ad utilizzarlo per indurre la maturazione e la deposizione in pesci allevati. Breton & Weil (1990), trattando femmine di carpe mature con estratti ipotalamici o GnRH nativo, ottennero un aumento improvviso nel rilascio delle GtH dall'ipofisi. Quasi subito sono stati

sviluppati degli agonisti sintetici del GnRH (GnRH_a) (Fujino *et al.*, 1972), i quali agiscono come il peptide nativo ma sono molto più potenti. Sia il GnRH che il GnRH_a, infatti, sono in grado di indurre lo sviluppo dell'ovario, la FOM e l'ovulazione, ma la dose di somministrazione deve essere molto superiore nella forma nativa (1-15 mg GnRH kg⁻¹) rispetto a quella sintetica (1-100 µg GnRH kg⁻¹) (Donaldson & Hunter, 1983; Zohar, 1989a,b). L'efficacia del GnRH e dei suoi agonisti sintetici ha confermato l'ipotesi che nei pesci con disfunzioni riproduttive l'ipofisi è ancora in grado di sintetizzare e rilasciare le gonadotropine endogene, fornendo appropriati trattamenti e dosi.

L'utilizzo di peptidi di GnRH nelle terapie di induzione della deposizione ha importanti vantaggi rispetto all'uso di preparati a base di GtH. Per prima cosa, il GnRH e le sue forme agoniste sono piccoli decapeptidi che non innescano una risposta immunitaria, e quindi, possono essere utilizzati ancora in una successiva stagione riproduttiva senza che ci sia una riduzione nella loro efficacia. Secondo, inducendo il rilascio di LH endogeno, il GnRH agisce "riparando" l'interruzione del sistema di regolazione endocrino della riproduzione che si osserva nei pesci allevati. Terzo, il GnRH agisce ad un livello più alto dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade, di conseguenza il GnRH può fornire una stimolazione più bilanciata degli eventi riproduttivi, e presumibilmente, una migliore integrazione di questi eventi con altre funzioni fisiologiche, sia direttamente che indirettamente, interessando il rilascio di altri ormoni necessari per il successo della FOM, della spermiazione e della deposizione (Zohar & Mylonas, 2001). Gli ormoni coinvolti includono la prolattina (Weber *et al.*, 1995), l'ormone della crescita (Marchant *et al.*, 1989; Peter *et al.*, 1990; Le Gac *et al.*, 1993) e gli ormoni tiroidei (Sullivan *et al.*, 1989). Un quarto vantaggio della forma agonista del GnRH è che può essere sintetizzato ed ottenuto in forma pura, e perciò non esiste alcun rischio di trasmissione di malattie, cosa che invece riguarda l'utilizzo di estratti ipofisari di pesce. Infine, data la similarità nella struttura degli GnRHs di molte specie di pesci (Sherwood *et al.*, 1994), è possibile utilizzare con successo lo stesso GnRH_a per un vasto gruppo di specie ittiche, cosa che non era possibile utilizzando direttamente gonadotropine.

Sebbene in molte specie di pesci la somministrazione di GnRHs nativi determini un brusco innalzamento delle GtH nella circolazione sanguigna, quasi sempre l'ampiezza di tale innalzamento è troppo bassa e la sua durata troppo breve per indurre FOM, ovulazione e deposizione (Omeljaniul *et al.*, 1987; Crim *et al.*, 1988b; Zohar, 1988; Zohar *et al.*, 1989a). Il tempo di permanenza particolarmente breve del GnRH nativo nel circolo sanguigno è principalmente dovuto all'effetto degenerativo delle endopeptidasi localizzate nell'ipofisi, nel fegato e nel rene dei pesci trattati (Zohar *et al.*, 1990a). Questi enzimi scindono i decapeptidi di GnRH specificatamente tra le posizioni 5-6 e 9-10, producendo frammenti più piccoli e inattivi.

Sostituendo però, l'amminoacido in posizione 6 e quello in posizione 10 rispettivamente con un amminoacido destrorso e un gruppo etilammide viene prodotto un GnRH sintetico e resistente alla degradazione enzimatica (Goren *et al.*, 1990; Weil *et al.*, 1991, 1992). Perciò, il GnRHa rimane nel circolo sanguigno per un periodo di tempo più lungo e stimola più efficacemente il rilascio delle GtH dall'ipofisi rispetto al GnRH nativo. A causa della polarità e della struttura terziaria modificata, alcuni di questi GnRHa esibiscono un aumento nell'affinità di legame con i recettori ipofisari per il GnRH (De Leeuw *et al.*, 1988; Habibi *et al.*, 1989; Pagelson and Zohar, 1992). I GnRHa per la loro maggiore resistenza alla degradazione enzimatica e per la più alta affinità di legame verso i recettori sono così 30-100 volte più potenti rispetto ai GnRH nativi nell'indurre il rilascio dell'LH, sia in termini di modulazione di ampiezza che di durata dell'incremento di LH (Peter *et al.*, 1988; Zohar *et al.*, 1989a,b; Crim e Bettles, 1997). Tra i molti GnRHa testati nei pesci (Peter *et al.*, 1985; Crim *et al.*, 1988a; Zohar, 1989a; Zohar *et al.*, 1989a), quelli più comunemente utilizzati per indurre la deposizione sono il (D-Ala⁶,Pro⁹,NEthylamide)-mammalian GnRH, e il (D-Arg⁶,Pro⁹,NEthylamide)-salmon GnRH. Questi due agonisti hanno un effetto simile nell'orata (Zohar, 1989a,b; Zohar *et al.*, 1989a) e nel salmone (Crim *et al.*, 1988a), mentre il (D-Arg⁶,Pro⁹,Net)-salmon GnRH è più efficace nell'indurre il rilascio di GtH nel *Paramisgurnus dabryanus* (Lin *et al.*, 1991), nella trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (Crim *et al.*, 1988a) e nel carassio (Peter *et al.*, 1985). Il (D-Ala⁶,Pro⁹,Net)-mammalian GnRHa, viene impiegato in varie applicazioni nella medicina umana (Barbieri, 1992; Emons & Schally, 1994) e per questa ragione è largamente disponibile e poco costoso rispetto al (D-Arg⁶,Pro⁹,Net)-salmon GnRH. Di conseguenza, il (D-Ala⁶,Pro⁹,Net)-mammalian GnRH è il GnRHa che viene più largamente utilizzato nell'induzione della FOM, ovulazione e spermiazione nei pesci. In generale l'utilizzo di GnRHa ha rivoluzionato in positivo la gestione dei riproduttori e ad oggi è diventato uno strumento spesso indispensabile per la gestione delle avannotterie. La somministrazione degli GnRHa viene effettuata principalmente mediante iniezione in soluzione salina o nella forma di sistemi di trasporto e rilascio continuo. Alcuni studi effettuati agli inizi degli anni novanta hanno sperimentato la possibilità di somministrare GnRHa per via orale (Thomas and Boyd, 1989; Solar *et al.*, 1990; McLean *et al.*, 1991; Sukumasavin *et al.*, 1992), ma sebbene i risultati siano stati abbastanza promettenti, questo metodo è ancora nella fase sperimentale.

Alcuni protocolli di induzione della maturazione prevedono l'utilizzo di GnRHa associati ad antagonisti della dopamina (Peter *et al.*, 1993). L'effetto inibente della dopamina è stato dimostrato in molti ciprinidi e nel pesce gatto africano (*Clarias gariepinus*), ma sembra essere assente o debole nella maggior parte dei pesci di interesse commerciale (Copeland and Thomas, 1989; King *et al.*, 1994; Zohar *et al.*, 1995a,b). Inoltre, l'effetto inibente della dopamina sembra

che cambi durante il ciclo riproduttivo, nell'*Acipenser transmontanus* è molto forte durante il periodo della riproduzione (Pavlick & Moberg, 1997), mentre in altre specie può essere minimo durante questa fase. (Linard *et al.*, 1995). Per queste ragioni protocolli di induzione della deposizione che fanno uso combinato di antagonisti della dopamina e di GnRHa sono utilizzati largamente solo nei pesci della famiglia dei ciprinidi (Peter, 1983; Yaron, 1995).

Sistemi di trasporto per il GnRHa a lento e continuo rilascio

I GnRHa sono stati prodotti in modo da resistere alla degradazione enzimatica per un periodo di tempo più lungo rispetto al GnRH nativo e consentire una stimolazione del rilascio delle GtH più prolungata (Van der Kraak *et al.*, 1983; Zohar *et al.*, 1989b, 1990a, 1995a,b; Goren *et al.*, 1990). Anche il più resistente GnRHa alla degradazione enzimatica, però, ha un'emivita di soli 23 minuti *in vivo*, comparati ai 5 min per il GnRH nativo (Gothilf & Zohar, 1991). A causa del basso tempo di residenza nel circolo sanguigno, l'incremento dell'LH risulta molto breve a seguito di un singolo trattamento con GnRHa, variando da poche ore a pochi giorni (Zohar, 1988; Zohar *et al.*, 1989a, 1995a; Crim *et al.*, 1988b; Harmin and Crim, 1993). In molte specie studiate, questo arco temporale è troppo breve per indurre una completa FOM, ovulazione e deposizione, rendendo una singola iniezione di GnRHa inutile per indurre la deposizione. Ad esempio, due trattamenti singoli con GnRHa sono necessari per indurre ovulazione nel luccio perca (*Stizostedion vitreum*) (Pankhurst *et al.*, 1986), nel persico reale (*Perca flavescens*) (Dabrowski *et al.*, 1994), nella spigola (*Dicentrarchus labrax*) (Carrillo *et al.*, 1995), nel persico del Nilo (*Lates calcarifer*) (Almendras *et al.*, 1988) e nella maggior parte dei salmonidi (Donaldson and Hunter, 1983; Mylonas *et al.*, 1992; Slater *et al.*, 1994).

Inoltre, in alcune specie od in certe condizioni, come quando la temperatura dell'acqua è molto bassa o la gonade non è in un avanzato stadio di sviluppo, anche due trattamenti di GnRHa possono non essere sufficienti per indurre la deposizione (Sullivan *et al.*, 1997).

Trattamenti multipli sono, quindi, necessari per ottenere la deposizione, ma l'intera operazione determina un forte stress nei pesci che può causare elevate mortalità, oltre a richiedere un elevato costo in termini di tempo e di personale. Per tale motivo negli ultimi 20 anni sono stati sviluppati dei sistemi di trasporto per il GnRHa a lento e continuo rilascio. Il primo di questi sistemi ad essere utilizzato sono stati i *pellet* di colesterolo e sono stati testati nei salmoni atlantici (Weil & Crim, 1983). Variando la percentuale di colesterolo nella matrice con l'aggiunta di cellulosa è possibile produrre degli impianti a "lento" o "veloce" rilascio (Carolsfeld *et al.*, 1988; Sherwood *et al.*, 1988). Gli impianti di colesterolo a rilascio rapido di GnRHa possono mantenere elevati livelli di GtH nel plasma per almeno 8 giorni, mentre quelli a lento rilascio arrivano fino ad 8 settimane (Crim *et al.*, 1983b). Gli impianti di colesterolo sono

preparati come *pellet* cilindrici solidi (3 mm di diametro) e vengono impiantati intramuscolarmente utilizzando uno speciale applicatore o per mezzo di un bisturi. Questo tipo di sistema di trasporto si prepara facilmente ed è relativamente poco costoso, ma il rilascio del GnRHa dai cilindri di *pellet* è molto variabile (Carolsfeld *et al.*, 1988), probabilmente in quanto ogni impianto è preparato singolarmente (Sherwood *et al.*, 1988).

Il secondo tipo di sistema di trasporto del GnRHa è stato fabbricato in forma di microsfele (5-200 μm di diametro), utilizzando un co-polimero di acido lattico e acido glicolico (LGA). Questo materiale biodegradabile è stato da principio utilizzato per suture chirurgiche, e successivamente utilizzato anche come matrice di trasporto di medicinali (Lewis, 1990). Le microsfele sono preparate utilizzando un'emulsione doppia, con il metodo dell'evaporazione del solvente (Okada *et al.*, 1994a,b), dove il GnRHa è sciolto in gocce di acqua microscopiche, che vengono intrappolate in una matrice di LGA. Il rilascio dell'ormone dalle microsfele è immediato e può durare fino ad alcuni mesi, in rapporto alla quantità di acido lattico e acido glicolico e alla lunghezza e al peso molecolare del polimero (Chasin and Langer, 1990). La maggior parte dei sistemi a lento rilascio costituiti da microsfele biodegradabili, utilizzati per l'induzione della deposizione nei pesci, sono disponibili commercialmente sotto forma di prodotti già confezionati (Zohar, 1988; Zohar *et al.*, 1990b; Breton *et al.*, 1990; Chang *et al.*, 1995; Barbaro *et al.*, 1997), essendo utilizzati anche per il controllo della fertilità negli uomini e nel bestiame (Favero *et al.*, 1995; Barbieri and Hornstein, 1999) o per trattamenti tumorali correlati alle gonadotropine nell'uomo (Emons and Schally, 1994). Recentemente, sistemi a lento rilascio di GnRHa costituiti da microsfele biodegradabili LGA sono stati sviluppati in modo specifico per i pesci, prendendo in considerazione la bassa temperatura corporea che hanno i pesci rispetto ai mammiferi. Questo tipo di sistemi sono utilizzati con successo per indurre FOM e ovulazione nell'orata (Zohar *et al.*, 1995a), nel salmone atlantico e del pacifico (Mylonas *et al.*, 1993; Zohar, 1996), e in diversi altri pesci allevati. Il grande vantaggio nell'utilizzo di questi sistemi costituiti da microsfele biodegradabile è che lo stesso preparato può essere utilizzato per trattare pesci che variano nella taglia da pochi grammi fino a alcuni kg. Questo può essere fatto perché le microsfele sono sospese in un liquido che viene somministrato in un volume relazionato al peso del pesce da trattare. Un altro vantaggio è che le microsfele sono costituite da prodotti naturali e vengono completamente riassorbite dai pesci trattati, consentendo di vendere e consumare il prodotto senza alcun rischio di residui chimici nelle carni.

L'ultimo tipo di sistema di trasporto del GnRHa utilizzato per l'induzione della deposizione viene preparato sotto forma di un impianto monolitico solido, utilizzando un co-polimero non degradabile di Etilene e Vinile Acetato (EVAc) (Rhine *et al.*, 1980a). In questo sistema a lento

rilascio, il GnRHa è mischiato con un agente inerte espandibile, e la miscela è inclusa nella matrice di EVAc. A seguito dell'applicazione, la matrice inerte si dissolve, portando con sé il composto attivo (Brown *et al.*, 1986), in questo caso il GnRHa. La cinetica di rilascio che utilizza l'EVAc come sistema di trasporto può essere controllata variando il peso molecolare del polimero, la percentuale di matrice inerte caricata, il tipo di matrice (idrofobica vs. idrofilica), la forma degli impianti (sfere vs. disco) o applicando uno scudo sulla superficie dell'impianto (Rhine *et al.*, 1980a,b; Hsu and Langer, 1985; Langer, 1991). Gli impianti di EVAc sviluppati per i pesci rilasciano GnRHa per periodi da 2 a 5 settimane (Zohar *et al.*, 1990b; Zohar, 1996; Mylonas *et al.*, 1998b). Gli impianti di EVAc sono fabbricati come dischi da 2 mm in diametro e sono somministrati intramuscolarmente utilizzando un *implanter*. Al contrario delle microsferi biodegradabili e come i pellet di colesterolo, i sistemi di rilascio costituiti da EVAc sono in grado di mantenere la loro efficacia per 3 anni se conservati a -20 C.

STIMA DELLA FECONDITÀ DEI PESCI IN RELAZIONE ALLE DIVERSE STRATEGIE RIPRODUTTIVE

Introduzione

La conoscenza dettagliata delle strategie riproduttive e della stima della fecondità sono due aspetti estremamente importanti per studiare la biologia e la dinamica di popolazione delle specie di pesci (Hunter *et al.*, 1992). Studi relativi agli aspetti riproduttivi prevedono la determinazione della taglia di prima maturità, i rapporti quantitativi fra femmine e maschi (sex-ratio), la fecondità potenziale dello stock riproduttivamente maturo/attivo, la durata della stagione riproduttiva, l'individuazione del momento del giorno in cui avviene l'evento di deposizione e la frazione di uova prodotte. Una stima corretta di queste informazioni permettono di quantificare la capacità riproduttiva di un singolo pesce e combinando questo dato con la stima delle uova rilasciate in mare è possibile ricavare la biomassa dello stock in deposizione (SSB) (Saville, 1964; Parker, 1980; Lasker, 1985). L'aumento delle conoscenze rispetto allo stato demografico di uno stock consente di sviluppare dei piani su base scientifica per una gestione sostenibile della risorsa.

Marcate differenze nella fecondità tra specie spesso riflettono strategie riproduttive differenti (Pitcher & Hart, 1982; Wootton, 1984; Helfman *et al.*, 1997; Murua & Saborido-Rey, 2003). All'interno della stessa specie, la fecondità può variare in risposta a differenti adattamenti alle condizioni ambientali (Witthames *et al.*, 1995). Anche all'interno dello stesso stock, la fecondità può variare annualmente in risposta a cambiamenti a lungo termine (Horwood *et al.*, 1986; Rijnsdorp, 1991; Kjesbu *et al.*, 1998) ed è stato dimostrato che è proporzionale alla taglia (per cui all'età dei pesci) e alla condizione di salute della popolazione. Pesci più grandi producono più uova sia in termini assoluti che relativi alla massa corporea. A parità di taglia, femmine in condizioni migliori esibiscono fecondità più elevate (Kjesbu *et al.*, 1991). La taglia e la condizione nei pesci sono, perciò, dei parametri chiave per valutare correttamente la fecondità a livello di popolazione. Nelle popolazioni fortemente sfruttate, i pesci di grande taglia verranno eliminati più rapidamente in quanto esposti alla mortalità da pesca per taglia-selettiva (Trippel, 1999). In questa condizione, la fecondità della popolazione non solo diminuisce come conseguenza della riduzione dell'abbondanza dei pesci in grado di deporre, ma anche a causa della riduzione della taglia media della popolazione.

Cambiamenti di fattori ambientali, come la temperatura, possono avere effetti importanti nell'influenzare il comportamento e il metabolismo dei pesci, così come la disponibilità

alimentare e l'inquinamento. Alterazioni delle condizioni ambientali e ridotta disponibilità alimentare possono determinare un declino nella fecondità stagionale della popolazione in quanto inducono una minore produzione di oociti od un aumento degli oociti atresici. Nei casi estremi, condizioni sfavorevoli possono indurre il fallimento completo della riproduzione e causare la perdita di un'intera stagione riproduttiva (Bell *et al.*, 1992; Livingston *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 1998).

Stima della fecondità

La stima della fecondità implica un certo numero di assunzioni, e queste dipendono dalle strategie riproduttive delle specie (Hunter *et al.*, 1992; Murua & Saborido-Rey, 2003). La *fecondità potenziale* è definita come il massimo numero di oociti che può rilasciare una femmina in un anno (Macer, 1974; Hunter *et al.*, 1992). In pesci che depongono una sola volta a stagione si può calcolare facendo una stima del numero di oociti che si trovano in avanzato stato di vitellogenesi o in migrazione nucleare o idratati (stato di riproduzione attiva). In pesci che sono classificati come *multiple spawners*, cioè in grado di rilasciare più lotti di uova nell'arco di una stagione riproduttiva, è necessario calcolare la fecondità relativa per lotti. La *fecondità relativa* per lotti si calcola contando il numero di uova deposte per lotto o contando il lotto di uova in avanzato stadio di vitellogenesi (stadio di migrazione nucleare). La somma dei vari lotti di deposizione ci dà la stima della *fecondità annuale realizzabile* (de Vlaming, 1983). La fecondità annuale realizzabile si può calcolare anche come la differenza tra la fecondità potenziale e la stima del grado di atresia (Fatresia) (ICES MS, 1997).

Uno dei principali obiettivi nello studio della fecondità dei pesci, indipendentemente dalla strategia riproduttiva dei pesci, è stabilire una relazione tra taglia e fecondità (lunghezza/peso/età), che può essere utilizzata per stimare la biomassa dello stock in deposizione o la relazione tra i pesci della popolazione in deposizione e la produzione di uova.

Per pesci con *fecondità determinata*, ossia pesci in cui la fecondità totale è considerata equivalente alla fecondità potenziale annuale, l'assunzione base è che la fecondità è fissata prima dell'inizio della deposizione, cosicché la fecondità potenziale è equivalente alla produzione di uova annuale dopo aver contato le perdite per atresia (Hunter *et al.*, 1992). Di conseguenza, per determinare la *fecondità potenziale annuale* è necessario non conteggiare gli oociti atresici nella fecondità potenziale. In questi pesci, per avere una corretta stima della fecondità, è particolarmente importante campionare in fase di pre-deposizione, ossia quando gli ovari si trovano in tarda vitellogenesi. Se gli ovari vengono campionati troppo presto potrebbero essere non sufficientemente sviluppati da permettere l'identificazione di tutti gli oociti destinati ad essere depositi (May, 1967; Hunter *et al.*, 1992; Kraus *et al.*, 2000).

Le specie che presentano *fecondità indeterminata* hanno una fecondità potenziale annuale non fissata all'inizio della deposizione (Hunter *et al.*, 1992). In queste specie, gli oociti in previtellogenesi possono essere reclutati in qualsiasi momento della stagione riproduttiva diventando oociti vitellogenetici (Hunter & Goldberg, 1980). Perciò, la stima della fecondità potenziale negli ovari prima dell'inizio della deposizione non ha senso. In queste specie, la fecondità annuale dovrebbe essere stimata dal numero di oociti rilasciati per evento di deposizione (*batch fecundity*), dalle percentuali di femmine che depongono per giorno (*spawning frequency*) e dalla durata della stagione di deposizione (Hunter *et al.*, 1985). I rappresentanti della famiglia dei Tunnidi fanno parte tutti di questa ultima categoria, in quanto i tonni depongono numerose volte durante la stessa stagione o nello stesso anno, e la loro fecondità potenziale annuale di conseguenza supera il numero di oociti in sviluppo che si possono osservare nell'ovario. Dalla stima della fecondità relativa per lotti, dalla frequenza delle deposizioni e dalla lunghezza del periodo riproduttivo è quindi possibile stimare la fecondità potenziale annuale. Stime della fecondità media relativa per lotti per il *T. albacares* (67 oociti/g di massa corporea), per il *T. orientalis* (69 oociti/g di massa corporea) e per il *T. maccoyii* (57 oociti/g di massa corporea) sono simili, ma nettamente più grandi rispetto alle stime per il *T. obesus* (31 oociti/g di massa corporea) e considerevolmente più piccole rispetto a quelle per *K. pelamis* (82 oociti/g di massa corporea) e per *E. lineatus* (99-136 oociti/g di massa corporea) (Schaefer, 2001a).

Metodi di stima della fecondità

Non esiste un metodo universale che può essere applicato per la stima della fecondità di tutti i pesci, ma ci sono diversi metodi che devono essere utilizzati e adattati a seconda delle strategie riproduttive dei pesci che si stanno studiando. Ogni metodo presenta dei vantaggi e degli svantaggi e la scelta è in funzione della disponibilità di tempo, soldi e del grado di accuratezza del lavoro.

I metodi più comunemente utilizzati sono: gravimetrico, volumetrico, gravimetrico e volumetrico combinato con conta automatizzata delle particelle, stereometrico, *disector*, *auto-diametric fecundity method* (Murua *et al.*, 2003). In tabella 2 sono riassunti i vantaggi e gli svantaggi per ognuno di questi metodi.

Tabella 2: Caratteristiche, vantaggi e svantaggi dei metodi utilizzati per stimare la fecondità nei pesci

Metodo	Vantaggi	Svantaggi
Gravimetrico	<ul style="list-style-type: none"> • Approccio tecnologico accurato e poco costoso • Può fornire ulteriori informazioni sulla frequenza e il diametro degli oociti • Tecnica molto utile per la stima della <i>batch fecundity</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • No informazioni sulla presenza di oociti atresici o di indicatori di eventi di deposizione come i POFs • Metodo non efficace per specie con sviluppo asincrono degli oociti, o dove il gap tra gli oociti in avanzata vitellogenesi e gli oociti in previtellogenesi è poco accentuato come negli ovari poco sviluppati • Necessità di portare l'ovario intero in laboratorio • Necessità di eseguire analisi istologiche per stimare la proporzione degli oociti atresici e per identificare la presenza di POFs • Consumo di tempo
Volumetrico	<ul style="list-style-type: none"> • Approccio tecnologico poco costoso • Può fornire ulteriori informazioni sulla frequenza e il diametro degli oociti 	<ul style="list-style-type: none"> • No informazioni sulla presenza di oociti atresici o di indicatori di eventi di deposizione come i POFs • Metodo non efficace per specie con sviluppo asincrono degli oociti, o dove il gap tra gli oociti in avanzata vitellogenesi e gli oociti in previtellogenesi è poco accentuato come negli ovari poco sviluppati • Necessità di portare l'ovario intero in laboratorio • Necessità di eseguire analisi istologiche per stimare la proporzione degli oociti atresici e per identificare la presenza di POFs • Consumo di tempo
Gravimetrico/ volumetrico combinato con conta automatizzata delle particelle	<ul style="list-style-type: none"> • In grado di contare una grande quantità di oociti in poco tempo con una buona accuratezza • Può fornire ulteriori informazioni sulla frequenza e il diametro degli oociti 	<ul style="list-style-type: none"> • Difficoltà nel separare gli oociti • Necessità di utilizzo del fissativo di Gilson (altamente tossico) o di preparati enzimatici per la degradazione e successiva separazione degli oociti • No informazioni sulla presenza di oociti atresici o di indicatori di eventi di deposizione come i POFs • Necessità di portare l'ovario intero in laboratorio • Necessità di eseguire analisi istologiche per stimare la proporzione degli oociti atresici e per identificare la presenza di POFs • Necessità di calibrazione e di un equipaggiamento elettronico costoso
Stereometrico	<ul style="list-style-type: none"> • Analisi completa che include lo stato di deposizione, atresia, fecondità, taglia della uova e numero degli oociti in previtellogenesi • Individuazione degli oociti in avanzata vitellogenesi per mezzo delle tecniche di colorazione e della misurazione delle taglie degli oociti 	<ul style="list-style-type: none"> • Non ottimale per ovari >200g • Necessità di strumenti altamente tecnologici e costosi per l'acquisizione e l'analisi di immagini • Necessità di portare l'ovario intero in laboratorio • Metodo non buono per la stima della fecondità per lotti (<i>batch fecundity</i>)
<i>Disector</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Analisi per la stima dell'atresia • Le sezioni forniscono informazioni istologiche sulla presenza e il numero di follicoli post-ovulatori 	<ul style="list-style-type: none"> • Procedura molto lenta e richiede delle sezioni seriali dei frammenti degli ovari
<i>Auto-diametric fecundity method</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Consente di valutare lo stato di deposizione, la fecondità e la taglia delle uova • Metodo molto rapido nello stimare la fecondità • Non richiede il trasporto dell'intero ovario in laboratorio per le analisi consentendo un risparmio di spazio e fissativo 	<ul style="list-style-type: none"> • Metodo pubblicato ma deve essere validato su un numero maggiore di specie e può essere utilizzato per la stima della fecondità potenziale solamente per pesci con fecondità determinata • Non utilizzabile per pesci con sviluppo asincrono degli oociti (Murua & Saborido-Rey, 2003) • Non utilizzabile per ovari che sono alla fine della deposizione e dove sono numerosi gli oociti atresici o POF • Necessita analisi istologiche per stimare la relazione tra oociti atresici e in vitellogenesi e per identificare POFs

MATERIALI E METODI

BIOLOGIA RIPRODUTTIVA

Campionamento

I tonni rossi utilizzati in questa ricerca sono stati pescati con reti a circuizione nella zona di mare compresa tra le Isole Eolie e il golfo di Sant'Eufemia, in tre differenti campagne di pesca (inizio giugno 2003; giugno 2005 e fine maggio 2006). I pesci sono stati trasferiti vivi dalle reti a circuizione in gabbie galleggianti del diametro di 50 m e profonde 25 metri. Le gabbie galleggianti sono state trainate da rimorchiatori alla velocità di 0,8-0,6 miglia orarie (per un totale di circa 5-10 giorni di navigazione), dalle aree di pesca fino all'impianto di acquacoltura "Marpesca S.R.L.", situato nel compartimento del Mar Tirreno Meridionale, in Calabria, a Vibo Marina (VV) dove è stato condotto lo studio (Fig. 14)



Figura 14: area di pesca e trasferimento dei tonni all'impianto "Marpesca S.R.L."

La raccolta dei campioni è stata eseguita nel corso di 2 stagioni riproduttive (2005-2006), su tonni mantenuti in cattività da un lungo e un breve periodo di tempo. Il 12 giugno 2005 sono stati sacrificati 4 esemplari (2 maschi e 2 femmine) dalla gabbia 1 che conteneva pesci catturati nella campagna di pesca del 2003 e che quindi si trovavano in una condizione di cattività da circa 2 anni. I tonni mantenuti in cattività per un breve periodo

di tempo includevano 37 individui pescati nel 2005 e campionati dalla gabbia 2 tra il 12 giugno e il 27 luglio dello stesso anno e 18 pesci pescati nel 2006 e campionati il 4 e il 7 giugno 2006 (gabbia 3).

Lo schema di campionamento è riassunto in tabella 3.

Periodo	Inizio Giugno		Fine Giugno		Metà Luglio		Fine Luglio		Inizio Giugno	
T°C mare	22 (°C)		24 (°C)		28 (°C)		29 (°C)		22 (°C)	
Data	12/6/05	15/06/05	26/6/05	18/7/05	25/7/05	27/7/05	4/6/06	7/6/06		
Gabbia 1 (cattività 2 anni)	4 (2 ♀)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gabbia 2 (cattività 8-54 gg)	4 (2 ♀)	2 (2 ♀)	2 (2 ♀)	4 (2 ♀)	14 (2♀)	10 (2♀)	-	-	-	-
Gabbia 3 (cattività 7-10 gg)	-	-	-	-	-	-	6 (2♀)	12(2♀)		

Tabella 3: numero di pesci campionati dalle gabbie dell'impianto in base alla data di prelievo (♀ = femmine)

Nell'arco dei due anni di studio, i tonni sono stati campionati in 8 date differenti, nei periodi di inizio e fine giugno, e metà e fine luglio. In questo spazio di tempo la temperatura dell'acqua superficiale è aumentata progressivamente in media da 22 a 29 °C.

Per ogni tonno campionato sono state raccolte porzioni di gonadi e campioni di sangue e sono stati registrati i seguenti dati: la lunghezza alla forca (LF), il peso del tronco eviscerato (PTr) e, per mezzo di un fattore di conversione (33% del peso del tronco), è stato retrocalcolato il peso totale dell'animale ($PT = [PTr + (PTr * 33/100)]$), approssimandolo all'unità espressa in kg. La gonade è stata pesata (PG) ed il volume calcolato misurando lo spostamento d'acqua dopo aver immerso la gonade in un cilindro pieno d'acqua (Scherle, 1970). L'indice gonadosomatico (IG%) è stato calcolato secondo la seguente formula $IG = 100 PG/PT$ (Fernandez-Delgado *et al.*, 1988).

Analisi delle gonadi

Preparazione dei campioni

Dalla gonade dei tonni mantenuti in cattività da 2 anni (gabbia 1) sono stati prelevati, immediatamente dopo la cattura, 3 porzioni di tessuto di circa 0,5 cm di spessore, dalla parte anteriore, centrale e posteriore e sono stati fissati per 48 ore in liquido di Bouin e successivamente disidratati in etanolo. Dalla gonade dei tonni della gabbia 2 e della gabbia 3 è

stata fissata solamente la porzione centrale. Tutti i prelievi di gonade sono stati sottoposti ad analisi istologiche e stereologiche.

Istologia

I campioni fissati in liquido di Bouin sono stati disidratati passandoli in concentrazioni di etanolo crescenti, diafanizzati in xilene e quindi inclusi in paraffina. Sezioni di circa 5 µm sono state colorate in ematossilina-eosina. L'analisi morfologica e le fotografie delle sezioni sono state effettuate al microscopio (Wild Leitz GMBH) equipaggiato con una macchina fotografica digitale (Polaroid Digital Microscope Camera DMC 1). Per le gonadi in stadio di maturazione avanzata sono stati fotografati un minimo di 5 differenti campi, selezionati in modo completamente casuale, utilizzando l'obiettivo x4, mentre per i campi delle gonadi meno mature è stato utilizzato l'obiettivo x10. Una scala calibrata con suddivisioni di 10 µm è stata fotografata agli stessi ingrandimenti in modo da calcolare accuratamente le taglie degli oociti fotografati.

Classificazione degli oociti, degli ovari e dei testicoli

Sono stati utilizzati due differenti sistemi di classificazione istologica: una per valutare gli stadi di maturazione e l'altra per stimare la maturità sessuale, utilizzando come criterio la classe di cellule germinative che si trovano nella fase di sviluppo più avanzato.

Gonadi femminili

Basandosi su precedenti classificazioni (Tyler & Sumpter, 1996; Coward & Bromage, 1998; Susca *et al.*, 2001a; Medina *et al.*, 2002), sono stati considerati solamente 4 stadi di sviluppo degli oociti (stadi 1-4), poiché una eccessiva frammentazione del processo avrebbe reso difficoltoso stabilire in modo netto dei confini tra uno stadio di maturazione e l'altro degli oociti e reso le analisi stereologiche inutilmente complicate. Le fasi identificate ed utilizzate sono le seguenti:

- *fase 1*, oociti in previtellogenesi (*S1*);
- *fase 2*, oociti con alveoli corticali (*S2*);
- *fase 3*, oociti in vitellogenesi (*S3*);
- *fase 4*, oociti in fase di migrazione nucleare (*S4*).

Inoltre, quando presenti, oociti atresici e follicoli post-ovulatori sono stati identificati ed il loro volume frazionale stimato.

Per determinare la maturità sessuale degli ovari è stato utilizzato un criterio adottato da Medina *et al.* (2002), che individua 4 fasi principali, basandosi sul gruppo degli oociti in più avanzato stadio di sviluppo incontrato. Si tratta di:

- *femmine immature o inattive*: quando sono presenti solamente oociti in stadio 1 e 2;
- *femmine in maturazione attiva*: se gli oociti in stadio 3 sono il gruppo più frequente e non sono presenti segni evidenti di eventi di deposizione;
- *femmine mature in deposizione*: quando sono presenti oociti in stadio 3 e 4 così come oociti idratati e follicoli post-ovulatori; infine
- *femmine in fase post-riproduttiva*: quando è presente un'elevata frequenza di oociti atresici e solo oociti in stadio 1 e 2.

La determinazione degli stadi di sviluppo delle gonadi è stata effettuata con l'ausilio del programma d'analisi dell'immagine Optimas 6.5.

Gonadi maschili

I campioni di tessuto testicolare sono stati classificati in funzione dello stadio di sviluppo delle cellule germinative e della loro localizzazione nel testicolo, dell'organizzazione dello stroma e del tessuto connettivale. I cambiamenti nelle proporzioni di cisti che contengono spermatogoni, spermatociti, spermatidi e spermatozoi caratterizzano gli stadi di maturità del tonno rosso. I maschi sono considerati:

- *in maturazione* quando mostrano un'elevata presenza di cisti di spermatociti e spermatidi nella parete del tubulo e una piccola porzione di spermatozoi maturi nel lume dei tubuli seminiferi;
- *maturi* quando mostrano un'alta densità di spermatozoi maturi nei tubuli seminiferi, e una minore presenza di cisti di cellule in maturazione nelle pareti dei tubuli seminiferi;
- *in fase post-riproduttiva* quando mostrano pochi spermatozoi residui nei tubuli e nel dotto deferente ed, infine,
- *in fase di quiescenza* quando i tubuli seminiferi sono vuoti e si osserva una ipertrofia dei tessuti connettivali ed un'estesa spermatogonia (Santamaria *et al.*, 2002).

In aggiunta alla classificazione istologica i maschi maturi sono stati ulteriormente distinti in:

- *fluente*, se lo sperma veniva facilmente emesso a seguito di una pressione addominale sul pesce od applicando una leggera pressione direttamente sul testicolo;
- *non fluente*, se i tubuli seminiferi erano ripieni di spermatozoi ma lo sperma veniva rilasciato solo al taglio della gonade.

Analisi stereologiche

Per stimare il numero di ogni tipo di oocita presente nella gonade, è stato utilizzato il metodo stereologico di Weibel & Gómez (1962). Tale metodo si basa sul principio di Delesse (Delesse, 1847) che afferma che il volume frazionale “ V_i ” di un elemento “ i ” presente in un tessuto è proporzionalmente legato alla sua stessa sezione di area frazionale “ A_i ”. Per potere applicare questo metodo, è necessaria che sia rispettata l’assunzione che l’elemento su cui si vuole indagare sia distribuito in modo omogeneo in tutto il tessuto. Questa tecnica è stata precedentemente utilizzata per la conta di oociti nei pesci con risultati considerevoli (Emerson *et al.*, 1990; Greer Walker *et al.*, 1994; Coward & Bromage 1998; Medina *et al.*, 2002). L’elemento “ i ” nell’ovario dei pesci è rappresentato dal gran numero di oociti di forma sferica o semisferica che in sezione trasversale appaiono con profili grosso modo circolari. Il termine tecnico per chiamare il profilo dell’elemento “ i ” è “*transection*”. Il numero di oociti a differente stadio di sviluppo è stato quindi calcolato per unità di volume sulle fotografie scattate delle sezioni istologiche, in accordo con la formula sviluppata da Weibel & Gómez (1962) e in seguito modificata da Weibel *et al.*, (1966).

$$N_v = (K/\beta)(Na^{3/2}/V_i^{1/2})$$

dove:

N_v = numero di oociti per unità di volume

β = coefficiente di forma

K = coefficiente di taglia

Na = numero di *transections* per unità di area

V_i = frazione di volume occupato da ogni categoria di oocita.

Il valore di β è stato ottenuto, in ogni campione e per ogni categoria di oocita, effettuando la media del rapporto tra l’asse più lungo e l’asse più corto di ogni oocita, calcolato su tutti i profili allo stesso stadio, sezionati a livello del nucleo. I valori di β sono risultati compresi tra 1,1 e 1,68.

K è stato calcolato utilizzando la seguente formula (Williams, 1977):

$$K = (M_3/M_1)^{3/2}$$

dove M_1 rappresenta il diametro medio dell’oocita

$$M_1 = [(D_1 + D_2 + D_3 + \dots + D_n)/n]$$

e M_3 è la radice cubica del terzo momento circa la media della distribuzione

$$M_3 = [(D_1)^3 + (D_2)^3 + (D_3)^3 + \dots + (D_n)^3]/n^{1/3}$$

Weibel (1963, 1969) ha dimostrato che quando le taglie delle particelle che devono essere contate hanno una distribuzione normale ed un coefficiente di variazione minore del 25%, allora K possiederà valori compresi tra 1,00 e 1,07. Se, al contrario, le taglie delle particelle non avessero una distribuzione normale e/o un coefficiente di variazione più grande del 25%, allora K sarà quasi certamente più elevato di 1,07. Nei campioni oggetto di questa tesi, i valori di K variavano tra 1,2 in oociti allo stadio 1 e 1,001 in oociti allo stadio 4.

N_a è il numero di *transections* degli oociti per unità di area: è stato calcolato contando, per ogni stadio di sviluppo degli oociti, i profili sezionati con e senza nucleo.

V_i è la frazione di volume (ossia la frazione d'area A_i) occupata dagli oociti di una data categoria (densità di volume). In questa tesi, è stata calcolata in maniera differente rispetto ad altri lavori riportati in letteratura che si sono serviti del metodo stereologico di Weibel & Gómez (1962) per stimare il numero di oociti presente nella gonade dei pesci. Il procedimento standard prevede, infatti, di sovrimporre sulla fotografia della sezione istologica un *sistema test* costituito da una griglia di punti ugualmente spaziatati (griglia di Weibel, fig. 15). La densità di volume si stima contando il numero di punti che toccano i profili di ciascuna categoria di oociti e dividendo per il numero totale di punti della griglia (Weibel & Gómez, 1962; Weibel, 1966; Weibel, 1969; Williams, 1977).

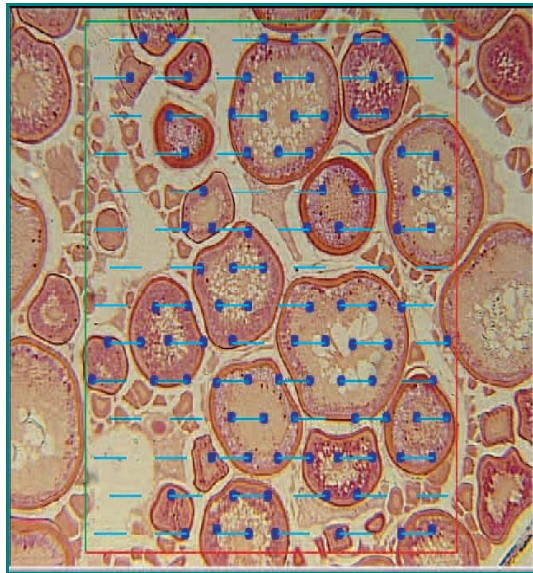


Figura 15: Esempio di griglia di Weibel sovrimposta sull'immagine di una sezione istologica. I punti in blu consentono di stimare la frazione di volume (V_i) per oociti in stadio di vitellogenesi. In questa griglia ci sono 84 barre e gli estremi di ogni barra rappresentano un *test points* ($n = 168$, $V_i = 97/168$). Il parametro N_a viene calcolato come il numero di oociti in vitellogenesi che vengono toccati dall'area della griglia e includono gli oociti che sono a cavallo della linea verde ma non della linea rossa (Murua *et al.*, 2003)

In questo lavoro di tesi, invece, è stato utilizzato un programma evoluto di analisi di immagine OPTIMAS 6.5 che è in grado, dopo che l'operatore ha tracciato manualmente il profilo dell'oocita (Fig 16), di fornire in modo automatico tutta una serie di parametri: area, perimetro, asse maggiore, asse minore, centroide, circolarità, rettangolarità e altri elementi relativi alla colorazione dell'oggetto. La *densità di volume* è stata così stimata sommando in modo indipendente le aree di ciascuna categoria di oociti e dividendo il valore ottenuto per la somma delle aree totali delle immagini prese in considerazione ($Vis_x = \sum A_{Sx} / A_{TOT}$).



Figura 16: Esempio dell'applicazione del programma di analisi dell'immagine Optimas 6.5 per tracciare i profili di oociti in vitellogenesi (S3) ed ottenere in modo automatico una serie di parametri quali l'area, il perimetro, l'asse maggiore e minore, centroide, la circolarità e la rettangolarità, oltre ad elementi relativi alla colorazione dell'oggetto.

Il numero totale di oociti di ogni categoria contenuto nella gonade di ciascun individuo è stato facilmente ottenuto moltiplicando N_v per l'intero volume della gonade. A partire da questa stima, è stato quindi possibile calcolare la *fecondità* come numero di oociti totali rispetto alla massa corporea del pesce, espressa in g, per tutti i campioni esaminati. Esprimere la fecondità in questo modo è particolarmente utile perché riduce l'effetto del peso quando si vogliono confrontare individui e gruppi con accentuate differenze di taglia.

Analisi del sangue

Dagli stessi esemplari di tonno utilizzati per l'analisi delle gonadi durante la stagione riproduttiva 2005, sono stati prelevati immediatamente campioni di sangue, centrifugati per 15 minuti a 5000 rpm ed il plasma è stato conservato a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La concentrazione plasmatica del 17- β -estradiolo (E2) è stata misurata usando un sistema per immunodosaggi in chemiluminescenza (CENTAUR - Bayer).

Analisi statistiche

Per testare la significatività di eventuali differenze nelle taglie e nei valori di IG tra i tonni campionati nelle tre gabbie di allevamento durante le due stagioni riproduttive è stato utilizzato il test t di Student con $\alpha = 0,05$. Il test di Mann-Whitney (Statistica 6.0) è stato utilizzato per effettuare i confronti a coppie tra i gruppi di misure relative al 17- β -estradiolo, separati in funzione del tempo di mantenimento in cattività. Anche in questo caso, sono state considerate significative le differenze per $p < 0.05$. L'interpretazione del test è sostanzialmente identica a quella del t-test di Student per campioni indipendenti, tranne che per il fatto che la statistica U si basa sulle somme di ranghi piuttosto che sulle medie. Il test non parametrico di Kruskal-Wallis (PAST 6.0), analogo del test parametrico ANOVA, è stato utilizzato per valutare le possibili differenze nel grado di maturazione dei tonni campionati nel medesimo periodo dell'anno ma mantenuti in condizione di cattività per lunghi e brevi periodi di tempo.

SVILUPPO SISTEMA DI INDUZIONE ORMONALE

Sviluppo di un metodo di somministrazione ormonale e stimolazione della riproduzione

Individuazione dei principi attivi e dosi

L'ormone utilizzato in questa sperimentazione è stato il des-Gly¹⁰, [D-Leu⁶]-LH-RH etilammide.

Il nome farmaceutico dell'ormone è: Enantone 3.75 Depot, Takeda, Japan, (Fig. 17).



Figura 17: Ormone e kit necessario per la somministrazione

Il principio attivo dell'Enantone 3.75 è la *leuprorelina acetato*, un nanopeptide sintetico, analogo della forma naturale dell'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH o LH-RH). La leuprorelina è molto più attiva dell'LH-RH naturale e può essere definita come superagonista del decapeptide fisiologico ipotalamico.

Per pesci di grandi dimensioni come i tonni, che sono difficilmente manipolabili o anestetizzabili, l'utilizzo di dispositivi che rilascino l'ormone lentamente diventa obbligato se si vogliono mantenere livelli adeguati di LH per un periodo di tempo prolungato senza ricorrere a somministrazioni ripetute. Questo farmaco è incapsulato in microsferi di un copolimero di acido DL-lattico e acido glicolico, mannitolo, gelatina (LGA 3:1). Le microsferi sono sospese in un veicolo viscoso e devono essere iniettate per via intramuscolare o sotto la cute.

Pensato per uso umano, il prodotto è già stato utilizzato con successo per indurre maturazione finale degli oociti (FOM) e ovulazione, sia in pesci Teleostei caratterizzati da sviluppo dell'ovario sincrono, come *Dicentrarchus labrax* (Tandler, 1993), e *Morone saxatilis* (Mylonas and Zohar, 1995), sia con sviluppo dell'ovario asincrono e a deposizione multipla, come *Lates*

calcarifer (Almendras *et al.*, 1988), *Sparus aurata* (Zohar *et al.*, 1990a; Barbaro *et al.*, 1997), *Alosa sapidissima* (Mylonas and Zohar, 1995), e *Umbrina cirrosa* (Barbaro *et al.*, 2002). L'Enantone, quindi, è formulato in modo da permettere, dopo la somministrazione, una costante ed uniforme liberazione (2,8%/die della dose somministrata) del principio attivo dalla sede. Dopo l'iniezione, si riscontra un incremento dose-dipendente delle concentrazioni sieriche di leuprolide e si ha inizialmente un transitorio aumento degli steroidi sessuali per stimolazione della secrezione ipofisaria delle gonadotropine (effetto agonista). Entro 3 ore dalla somministrazione si raggiungono picchi sierici (fase iniziale di assorbimento rapido) a cui fa seguito la fase successiva di decremento o fase di lento rilascio del principio attivo, che si protrae in modo costante per almeno 35 giorni dalla somministrazione. Livelli sierici di leuprolide sono ancora dosabili dopo 42 giorni. Entro 3 settimane dalla singola somministrazione si ha una inibizione secretoria dell'ipofisi (effetto antagonista) e soppressione della funzione gonadica. In prove di somministrazioni ripetute non sono stati osservati fenomeni di accumulo.

Tre differenti dosaggi di questo ormone sono stati somministrati (1,87 mg, 3,75 mg e 5,62 mg di LH-RHa) e tenendo conto della taglia variabile dei pesci indotti (50 – 100 Kg), il dosaggio effettivo aveva un intervallo molto ampio, tra 20-80 $\mu\text{g Kg}^{-1}$.

Predisposizione del sistema di somministrazione

La scelta di utilizzare le microsferiche di LGA come sistema di rilascio lento dell'ormone ha richiesto lo sviluppo di un sistema subacqueo a distanza di somministrazione del farmaco in forma liquida e di una contemporanea marcatura. Per iniettare l'ormone sono state utilizzate delle siringhe speciali: siringhe Tel-inject da cerbottana, di 3 ml di capacità. Questo tipo di siringhe vengono generalmente utilizzate per anestetizzare grandi animali terrestri, costruite in modo da poter essere sparate anche da notevole distanza e, cosa molto importante, il farmaco si scarica automaticamente in una frazione di secondo. Ogni siringa è costituita da due camere: quella anteriore porta il farmaco e la seconda viene caricata con aria a pressione. Durante il primo anno di sperimentazione (2005), sono stati utilizzati degli aghi da 60 mm di lunghezza e 2 mm di spessore, provvisti di un piccolo ardiglione, ai quali era stata legata, per mezzo di un monofilo in nylon, una lunga fascetta in plastica. L'ardiglione aveva la funzione di trattenere l'ago nella muscolatura del pesce e la fascetta, ad esso assicurata, di marcare il pesce colpito (fig. 18).



Figura 18: Siringa Tel-inject da cerbottana (3 ml), con ago da 60 mm, provvisto di ardiglione e fascetta in plastica.

Durante il secondo anno, l'obiettivo principale è stato cercare di migliorare e perfezionare il sistema di somministrazione e marcatura. A tale scopo sono stati utilizzati degli aghi più corti (40 mm lunghezza e 2 mm spessore), in modo da offrire una leva meno favorevole al momento dell'impatto col pesce; inoltre tali aghi non erano dotati né di ardiglione né di fascetta, ma sono stati inseriti in *tags* a forma di testa di freccia in polietilene (Floy Tag and Manufactured Company, USA), i quali una volta penetrati avrebbero dovuto garantire un tempo di permanenza più prolungato nella muscolatura di quelli usati precedentemente (Fig. 19).

Le siringhe, in entrambe le stagioni riproduttive, sono state sparate per mezzo di un fucile subacqueo, la cui punta dell'asta è stata modificata in modo da poter avvitare un alloggiamento in grado di accogliere la siringa stessa. Nel primo anno questo alloggiamento è stato un semplice pezzo di tubo in plastica (fig. 20), mentre nella seconda stagione è stato costruito un cilindro in metallo con una molla al suo

interno allo scopo di liberare più velocemente la siringa dal complesso asta-alloggiamento e di favorire il rinculo dell'asta dopo che l'ago fosse penetrato nel tonno (fig. 21). L'alloggiamento del secondo anno è stato costruito su misura per la siringa, in modo da ridurre l'attrito in acqua e avere una velocità e una gittata del fucile superiore.



Figura 19: Siringhe con aghi da 4 cm piani e tags in polietilene a forma di testa di freccia



Figura 20: Complesso siringa-alloggiamento – asta utilizzato nella prima stagione sperimentale



Figura 21: Alloggiamento per siringa utilizzato nella seconda stagione

Prove di stimolazione alla riproduzione

Le prove di stimolazione alla riproduzione, in entrambi gli anni di studio, sono state condotte nel mese di giugno, periodo centrale della deposizione naturale dei tonni rossi in mediterraneo (Medina *et al.*, 2002; Corriero *et al.*, 2003; Abascal *et al.*, 2004; Karakulak *et al.*, 2004). Una temperatura dell'acqua superiore ai 23 °C è considerata ottimale per la deposizione del tonno rosso (review Schaefer, 2001b), sebbene eventi di deposizione siano stati riportati anche a temperature inferiori ai 22 °C per il *T. orientalis* mantenuto in condizioni di cattività (Lioka *et al.*, 2000; Miyashita *et al.*, 2000; Sawada *et al.*, 2005). La temperatura dell'acqua durante il periodo di sperimentazione è variata tra i 22 e 24 °C. Durante la prima stagione, sono state condotte 3 prove di somministrazione ormonale, tra il 13 e il 26 giugno 2005, su tonni della gabbia 1 (animali da 2 anni in cattività), per un totale di circa 20 tentativi di induzione alla riproduzione. Il fondo della gabbia è stato alzato, per mezzo di speciali palloni di sollevamento, in modo da dividere a metà la gabbia e ridurre il volume nel quale nuotavano i pesci, allo scopo di rendere più facile l'avvicinamento del subacqueo ai tonni. Il sommozzatore è stato istruito a colpire i pesci posteriormente alla prima pinna dorsale, perché la cute nella porzione caudale è meno spessa e per prevenire penetrazioni accidentali nella parete addominale e danni agli organi interni. Dopo ogni sparo, il subacqueo constatava l'inserimento del *tag* nel muscolo e quanto ormone, rispetto a quello contenuto nella siringa, si fosse scaricato nel pesce. I tonni totalmente o parzialmente trattati sono stati circa 15. Durante il secondo anno, utilizzando la stessa procedura, ma con le modifiche tecniche apportate al sistema, sono state condotte altre 3 prove su animali appena trasferiti in gabbia, questa volta con la sola finalità di ottimizzare il sistema di somministrazione; quindi non è stato utilizzato ormone. In questa seconda stagione sono stati effettuati circa 15 tentativi.

MESSA A PUNTO DI TECNICHE DI RACCOLTA DI UOVA FECONDATE

Per trattenere le uova fecondate rilasciate dai tonni all'interno della gabbia 1 a seguito di una deposizione spontanea o indotta, è stata fissata una rete da plancton con vuoto di maglia di 1 mm ed altezza di 2 m, lungo tutta la circonferenza interna della gabbia (Fig. 22).

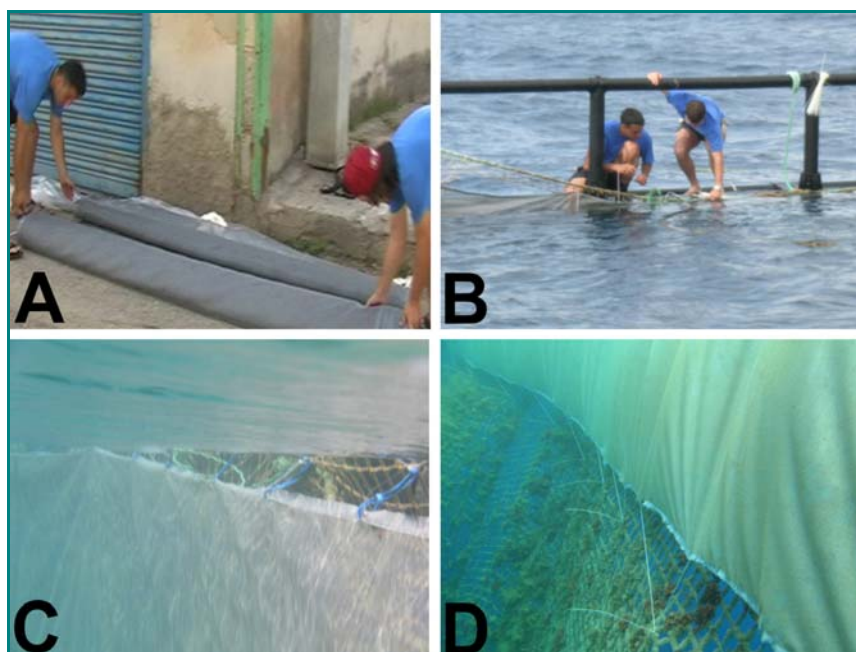


Figura 22: (A) Rete da plancton utilizzata per trattenere le uova deposte all'interno della gabbia, (B) fasi di fissaggio della rete da plancton alla parte interna della rete della gabbia, (C) particolare della modalità di fissaggio della rete nella parte superiore della gabbia, (D) particolare della modalità di fissaggio della parte inferiore della rete

Per evitare l'occlusione delle maglie della rete, processo che si forma inevitabilmente sulla superficie degli oggetti sommersi, a causa della colonizzazione dinamica da parte di numerosi organismi viventi, sia unicellulari che pluricellulari, cui si associa in modo più o meno massiccio la deposizione dei materiali (effetto *bio-fouling*), la rete è stata pulita regolarmente manualmente con scope a setole morbide (fig. 23). Ogni mattina una rete del tipo "bongo" (Tsuji, 2002) con un vuoto di maglia di 100 μm e con un'apertura circolare di 50 cm (Fig. 24) è stata trainata in superficie lungo la circonferenza interna della gabbia per raccogliere le uova e il plancton trattenuti dalla rete. Una rete da plancton più grande, con un'apertura circolare di 1,5 m, è stata trainata in superficie in modo da setacciare l'acqua intorno alla gabbia. Le reti sono state

sciacquate con acqua di mare e le uova e il plancton concentrato sono stati fissati in formalina 4% tamponata, per le successive osservazioni in laboratorio al microscopio binoculare.

Il comportamento dei riproduttori è stato monitorato due volte al giorno, per individuare eventuali segnali di eventi di deposizione (nuoto veloce, inseguimento tra pesci, salti fuori dall'acqua), così come sono state registrate le condizioni meteo-marine e la temperatura superficiale dell'acqua (Sawada *et al.*, 2005).

La sperimentazione del sistema per trattenere e raccogliere le uova fecondate è stata effettuata solamente nella prima stagione riproduttiva (2005), in quanto nella seconda stagione, la gabbia di diametro ridotto (30 m) che doveva ospitare i tonni superstiti della gabbia 1, è stata danneggiata dal maltempo con la conseguente perdita degli esemplari che erano in cattività da 3 anni. Non è stato possibile, quindi, montare la nuova rete rinforzata appositamente costruita per resistere alle forti correnti della zona e modificata per coprire una superficie più ampia della gabbia.



Figura 23: fasi di pulizia della rete da plancton



Figura 24: Rete da plancton tipo bongo utilizzata per la raccolta delle uova deposte all'interno della gabbia

RISULTATI

BIOLOGIA RIPRODUTTIVA DEL TONNO ROSSO IN ACQUACOLTURA

Esemplari di sesso femminile

Dati biometrici

In tabella 4 sono riportate le biometrie e gli indici biologici delle femmine prelevate nelle due stagioni di campionamento. Gli animali macellati sono risultati tutti tonni adulti. I pesci di gabbia 2 e gabbia 3 possedevano dimensioni simili (t-test: $p=0,31$), con taglia media di $228,5 \pm 16,0$ cm di lunghezza alla forca. Le due femmine prelevate in gabbia 1 erano di dimensioni inferiori, con $158,5 \pm 2,1$ cm di lunghezza media. Le femmine campionate nel giugno di entrambe le stagioni possedevano gonadi più grandi rispetto a quelle campionate a luglio. Inoltre, l'IG è risultato molto maggiore nei tonni pescati nel 2006 (G3). Quando l'insieme dei dati di giugno è stato comparato con quello di luglio, è stata riscontrata una differenza significativa nell'IG (t-test : $p=1,6 \times 10^{-6}$): l'IG decresce di oltre 4 volte già a partire dalla fine di giugno, riflettendo una evidente differenza nel grado di maturità sessuale tra i due mesi di campionamento.

Istologia delle gonadi

Le analisi istologiche hanno permesso l'individuazione di 4 fasi di sviluppo degli oociti, come illustrato nelle figure seguenti. In particolare, nella figura 25 si osserva un ovario con oociti in fase perinucleare (S1) e ad alveoli corticali (S2); nella figura 26 sono inoltre ben evidenti gli oociti in fase di vitellogenesi (S3) e di migrazione nucleare (S4). Nell'ovario sono stati osservati anche oociti atresici (fig. 27), ma mai follicoli post-ovulatori.

Fenomeni atresici sono stati riscontrati in tutti i campioni esaminati. Nelle femmine della gabbia 1, la percentuale dell'area contenente oociti atresici rispetto a quella occupata da oociti ad altri stadi di maturazione è stata del 5%; nella gabbia 2 è variata considerevolmente nel tempo, con valori paragonabili a quelli della gabbia 1 nelle date del 12 e del 15 giugno, con un picco massimo il 26 giugno (13%), per poi diminuire nelle date di luglio fino all'1%. In gabbia 3, la percentuale di atresia è paragonabile ai valori dei campioni raccolti ad inizio giugno 2005 (5%).

Tabella 4: Codice identificativo di ciascuna femmina di tonno campionata, gabbia da cui è stata prelevata, data di campionamento, numero di giorni in cattività, biometrie (LF: lunghezza alla forca, PT: peso totale, PG: peso gonade) e indice gonadosomatico (I_G). I valori più elevati sono evidenziati in grassetto .

ID	Gabbia	Data	Giorni cattività	LF (cm)	PT (kg)	PG (kg)	I_G
1206-03	G1	12/06/2005	730 (2 anni)	157	69,16	1,6	2,31
1206-04	G1	12/06/2005	730 (2 anni)	160	77,14	2	2,59
1206-05	G2	12/06/2005	9	222	234,08	5,6	2,39
1206-08	G2	12/06/2005	9	224	179,55	4,8	2,67
1506-02	G2	15/06/2005	12	238	263,34	7,6	2,89
2606-01	G2	26/06/2005	23	225	178,22	2,2	1,23
1807-02	G2	18/07/2005	45	260	308,56	4,4	1,43
1807-03	G2	18/07/2005	45	240	252,7	2,2	0,87
1807-04	G2	18/07/2005	45	270	401,66	6	1,49
2507-02	G2	25/07/2005	52	215	203,49	2	0,98
2507-07	G2	25/07/2005	52	225	207,48	1,8	0,87
2507-10	G2	25/07/2005	52	230	258,02	3	1,16
2507-14	G2	25/07/2005	52	230	255,36	2	0,78
2707-16	G2	27/07/2005	54	220	203,49	1,2	0,59
2707-18	G2	27/07/2005	54	215	223,44	2,6	1,16
2707-21	G2	27/07/2005	54	215	195,51	2,2	1,13
2707-24	G2	27/07/2005	54	225	199,5	1,6	0,80
2707-26	G2	27/07/2005	54	238	199,5	2	1,00
0406-05	G3	04/06/2006	8	223	246,05	10	4,06
0706-01	G3	07/06/2006	11	215	168,91	6	3,55
0706-03	G3	07/06/2006	11	225	223,44	10	4,48
0706-04	G3	07/06/2006	11	235	227,43	7	3,08
0706-08	G3	07/06/2006	11	240	255,36	11	4,31
0706-12	G3	07/06/2006	11	190	155,61	4	2,57
0706-20	G3	07/06/2006	11	235	262,01	14,5	5,53

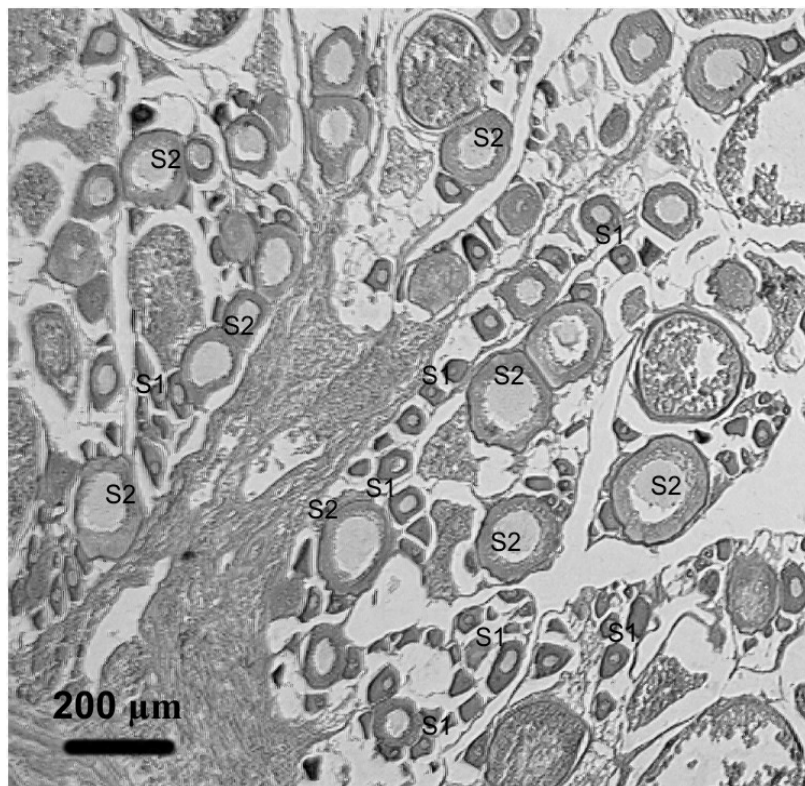


Figura 25: Sezione di gonade immatura con oociti allo stadio di sviluppo di fase perinucleare (S1) e ad alveoli corticali (S2)

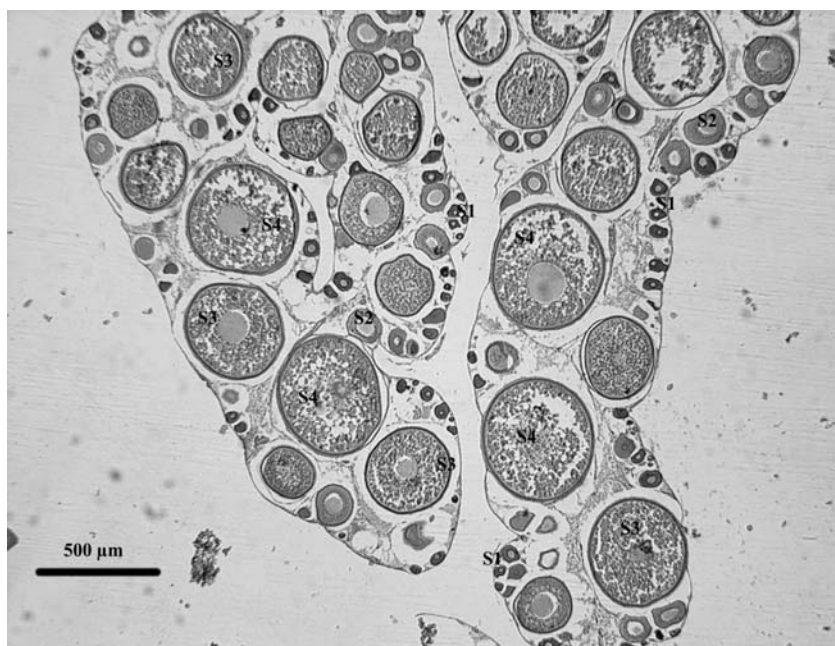


Figura 26: Gonade in maturazione attiva, con stadi di sviluppo degli oociti in fase perinucleare (S1), ad alveoli corticali (S2), in vitellogenesi (S3) e migrazione nucleare (S4)

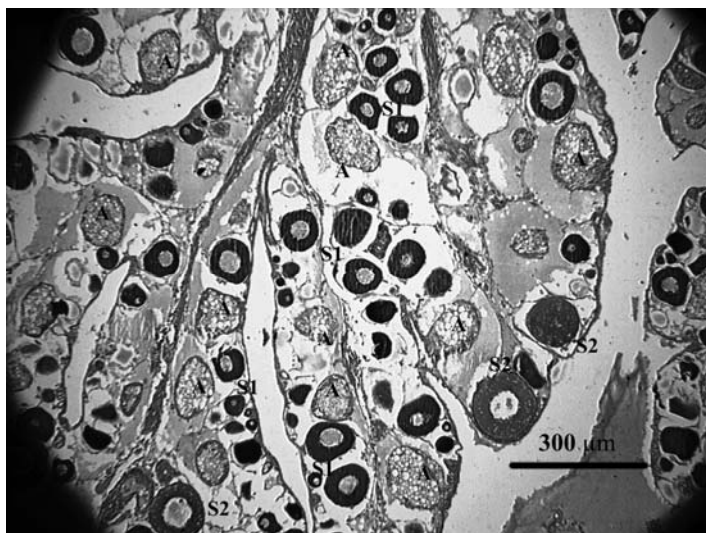


Figura 27: Gonade in forte regressione, con oociti atresici (A) e stadi di sviluppo degli oociti in fase perinucleare (S1) e ad alveoli corticali (S2)

Tabella 5: Codice identificativo di ciascuna femmina di tonno campionata, gabbia da cui è stato prelevato, data di campionamento, numero di giorni in cattività, stadio più avanzato degli oociti rinvenuto e condizione riproduttiva assegnata. # = atresia estesa

ID	Gabbia	Data	Giorni cattività	Stadio più avanzato degli oociti	Condizione riproduttiva
1206-03	G1	12/06/2005	730	vitellogenesi#	Maturo
1206-04	G1	12/06/2005	730	migrazione nucleo#	Maturo
1206-05	G2	12/06/2005	9	migrazione nucleo#	Maturo
1206-08	G2	12/06/2005	9	migrazione nucleo#	Maturo
1506-02	G2	15/06/2005	12	migrazione nucleo#	Maturo
2606-01	G2	26/06/2005	23	alveoli corticali#	post-riproduttiva
1807-02	G2	18/07/2005	45	alveoli corticali#	post-riproduttiva
1807-03	G2	18/07/2005	45	alveoli corticali#	post-riproduttiva
1807-04	G2	18/07/2005	45	vitellogenesi#	Maturo
2507-02	G2	25/07/2005	52	perinucleare	post-riproduttiva
2507-07	G2	25/07/2005	52	perinucleare	post-riproduttiva
2507-10	G2	25/07/2005	52	perinucleare	post-riproduttiva
2507-14	G2	25/07/2005	52	perinucleare#	post-riproduttiva
2707-16	G2	27/07/2005	54	perinucleare	post-riproduttiva
2707-18	G2	27/07/2005	54	perinucleare	post-riproduttiva
2707-21	G2	27/07/2005	54	perinucleare	post-riproduttiva
2707-24	G2	27/07/2005	54	perinucleare	post-riproduttiva
2707-26	G2	27/07/2005	54	perinucleare	post-riproduttiva
0406-05	G3	04/06/2006	8	migrazione nucleo#	Maturo
0706-01	G3	07/06/2006	11	migrazione nucleo#	Maturo
0706-03	G3	07/06/2006	11	migrazione nucleo#	Maturo
0706-04	G3	07/06/2006	11	migrazione nucleo#	Maturo
0706-08	G3	07/06/2006	11	migrazione nucleo#	Maturo
0706-12	G3	07/06/2006	11	migrazione nucleo#	Maturo
0706-20	G3	07/06/2006	11	migrazione nucleo#	Maturo

Le analisi istologiche degli ovari (tabella 5) hanno consentito di classificare i tonni della gabbia 1 (mantenuti in cattività da due anni) e le femmine campionate il 12 e 15 giugno 2005 della gabbia 2 come maturi ma non in fase di deposizione attiva. Il gruppo di oociti in stadio più avanzato trovato in questi ovari è stato lo stadio di migrazione del nucleo (S4), ma il terzo stadio è risultato il più frequente ed era presente un elevato grado di atresia.

Nelle date del 26 giugno e 18 luglio le gonadi hanno subito una forte regressione e sono state classificate in fase post-riproduttiva ed il gruppo di oociti in stadio più avanzato rinvenuto è stato quello ad alveoli corticali. Un campione del 18 luglio presentava ancora oociti vitellogenetici, ma una contemporanea elevata atresia ed assenza di oociti in fase 4. Nei campioni del 25 e 27 luglio, il primo stadio è risultato prevalente e si è osservata una ridotta presenza di oociti al secondo stadio e di follicoli atresici. Le femmine della gabbia 3 sono state classificate mature ma non in deposizione attiva, così come le femmine dello stesso periodo dell'anno precedente. Lo stadio più avanzato osservato è stato quello di migrazione del nucleo e anche in questo caso non sono stati trovati follicoli post-ovulatori.

I livelli plasmatici più elevati di 17- β -estradiolo (E_2) sono stati rinvenuti nei tonni prelevati nella prima metà di giugno, sia che si trattasse di pesci in cattività da 2 anni sia che si trovassero in gabbia da circa 9 giorni (fig. 28).

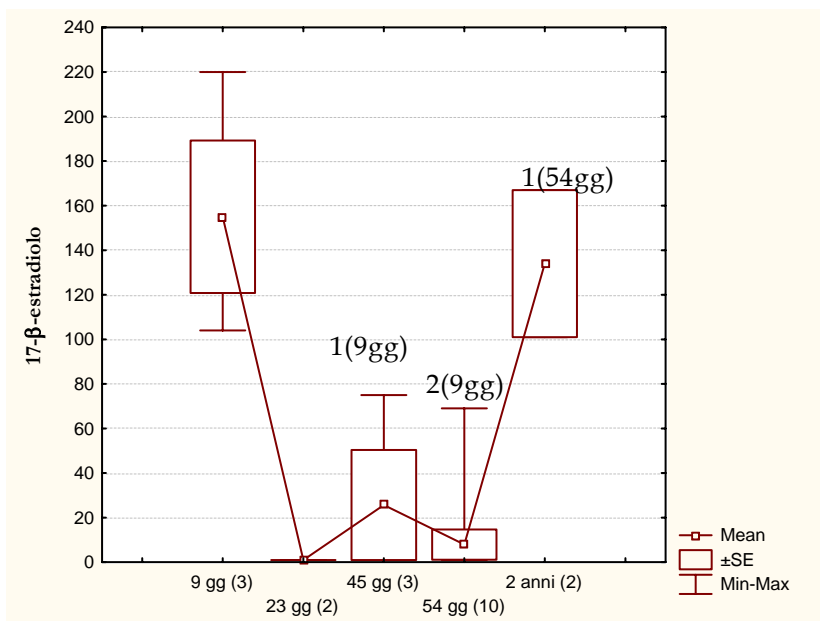


Figura 28: Box plot relativi alle misure di 17- β -estradiolo degli esemplari esaminati, raggruppati in base alla durata del periodo di cattività. Tra parentesi è riportato il numero di individui appartenenti a ciascun gruppo. 1: $p<0.05$; 2: $p<0.005$

Tra questi due gruppi di pesci, i livelli di E_2 non presentavano differenze significative (Mann-Whitney test $p < 0.05$), mentre livelli di E_2 significativamente più bassi sono stati registrati per gli animali campionati a fine giugno e luglio (23, 45, 54 gg di cattività).

Analisi stereologica

Attraverso le stime stereometriche ottenute analizzando i campioni di ovario di 2 tonni della gabbia 1 (ID: 1206-03, 1206-04) si è cercato di valutare l'omogeneità della distribuzione degli oociti all'interno dell'ovario, effettuando una prima analisi comparativa tra le porzioni anteriori, centrali e posteriori della gonade dei singoli animali. Per ogni gonade si sono stimati tre differenti valori di frazione di volume (V_i), densità di volume (N_v), numero di oociti per individuo (N_o) e numero di oociti rispetto alla massa corporea del pesce espressa in g, per ogni porzione e stadio di sviluppo degli oociti (tabella 6).

Tabella 6: Dati stereologici delle porzioni anteriori, centrali, e posteriori delle gonadi delle 2 femmine (1206-03 e 1206-04) campionate nella gabbia 1.

ID	1206-03			1206-04		
	Anteriore	Centrale	Posteriore	Anteriore	Centrale	Posteriore
Oociti stadio 1						
V_i	0,05	0,08	0,10	0,05	0,05	0,06
$N_v(m^{-1})(\times 10^3)$	212	367	438	245	274	336
N_o per individuo ($\times 10^6$)	2,83	4,89	5,85	4,10	4,58	5,61
$N_o g^{-1}(\times 10^3)$	4,09	7,08	8,45	5,92	5,94	7,27
Oociti stadio 2						
V_i	0,13	0,17	0,18	0,14	0,14	0,13
$N_v(m^{-1})(\times 10^3)$	50,22	81,46	75,37	48,11	49,08	52,83
N_o per individuo ($\times 10^6$)	67,03	108,73	100,61	80,26	81,88	88,15
$N_o g^{-1}$	989,2	1572,2	1454,7	1160,6	1061,5	1142,8
Oociti stadio 3						
V_i	0,20	0,16	0,13	0,18	0,21	0,20
$N_v(m^{-1})(\times 10^3)$	11,39	13,33	10,94	8,26	11,28	7,68
N_o per individuo ($\times 10^6$)	15,20	17,80	14,60	13,79	18,83	12,82
$N_o g^{-1}$	219,9	257,4	211,2	199,4	244,2	166,3
Oociti stadio 4						
V_i	0,06	0	0	0,10	0,04	0,06
$N_v(m^{-1})(\times 10^3)$	1,05	0	0	1,74	0,75	1,13
N_o per individuo ($\times 10^6$)	1,41	0	0	2,91	1,25	1,89
$N_o g^{-1}$	20,4	0	0	37,7	16,3	24,5
Atresia						
V_i	0,064	0,049	0,053	0,066	0,089	0,082

La lettura in orizzontale della tabella consente di valutare se esiste un differente grado di maturazione della gonade lungo l'asse antero-posteriore e se vi sono delle differenze tra le due femmine campionate. I dati riportati in tabella sono semplificati negli istogrammi seguenti. Nel grafico 29 vengono messi a confronto i contributi percentuali dei valori di V_i di ciascuno stadio di maturazione degli oociti rispetto al totale. Da tale grafico appare evidente come per tutte le porzioni di entrambi i campioni gli stadi di sviluppo 2 e 3 siano quelli che forniscono un contributo percentuale più elevato. In questo grafico si osserva inoltre anche l'elevato grado di atresia presente in tutte le porzioni della gonade di entrambi i pesci.

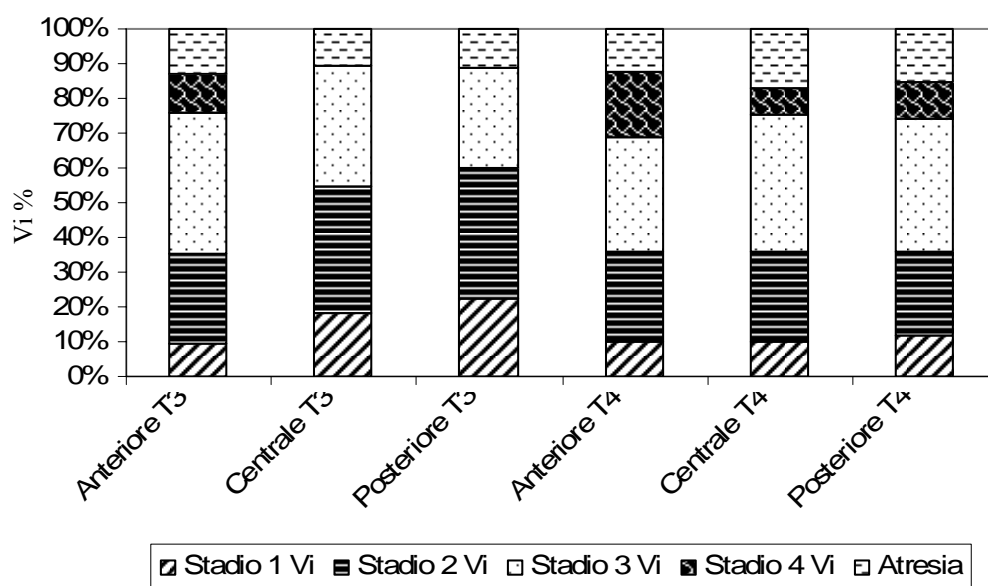


Figura 29: Confronto tra i contributi percentuali dei valori di frazione di volume (V_i) di ciascuno stadio di maturazione degli oociti rispetto al totale. (ID: T3=1206-03, T4=1206-04).

Un secondo istogramma (Fig. 30) mostra il numero di oociti per ogni stadio di sviluppo, espressi rispetto alla massa corporea, nelle 3 porzioni di gonade di entrambi i campioni. Il campione 1206-03 presenta una distribuzione eterogenea degli oociti lungo un gradiente crescente dalla porzione anteriore verso la porzione caudale della gonade per il primo stadio di sviluppo, omogenea per il secondo ed il terzo stadio, ed eterogenea per il quarto stadio, in quanto prevalente nella porzione anteriore. Il campione 1206-04, invece, mostra una distribuzione degli oociti pressoché omogenea nelle differenti porzioni di tessuto per quasi tutti gli stadi di sviluppo. Solo il quarto stadio, come nel campione 1206-03, sembra essere poco più abbondante nella porzione anteriore rispetto alle altre due porzioni.

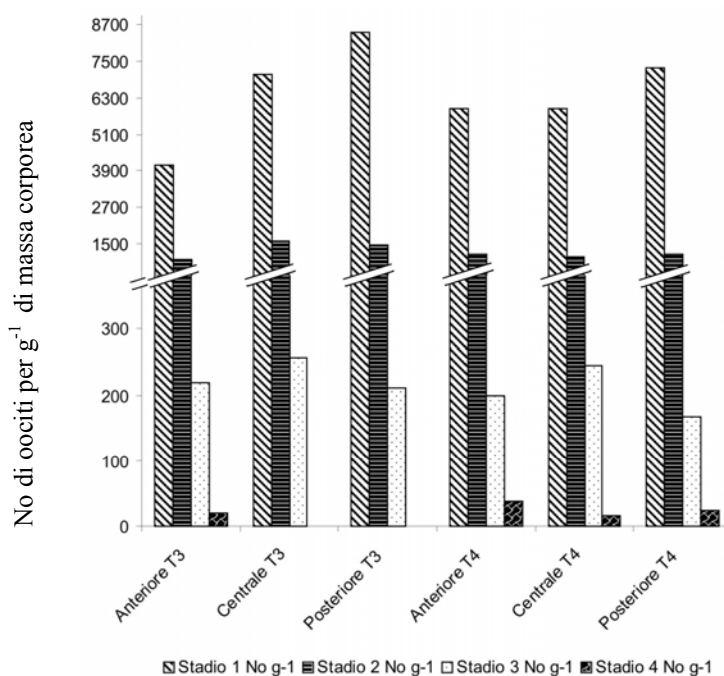


Figura 30: Numero di oociti nei differenti stadi di sviluppo e nelle diverse parti della gonade espressi in g rispetto alla massa corporea dei 2 tonni campionati dalla gabbia 1 (ID: T3=1206-03, T4=1206-04).

Al fine di studiare gli effetti della cattività sulla maturazione della gonade nel lungo e nel breve periodo, i dati medi rilevati nella sola porzione centrale relativi ai tonni mantenuti in cattività per circa 2 anni (gabbia 1) sono stati confrontati con quelli relativi ai tonni che si trovavano in una condizione di cattività da soli 10 giorni circa, campionati nella stesso periodo (inizio giugno) nel 2005 e 2006 (ID gabbia 2: 1206-05; 1206-08; 1506-02 e ID gabbia 3: 0406-05; 0706-01; 0706-03; 0706-04; 0706-08; 0706-12; 0706-20) (Tabella 7).

La figura 31 mostra i contributi percentuali medi dei valori della frazione di volume (V_i) di ciascuno stadio di maturazione per le tre gabbie studiate, al fine di fornire una rappresentazione visiva dello stato generale di maturazione della gonade. Per la gabbia 1, il secondo e il terzo stadio sono percentualmente i più consistenti, mentre il quarto stadio risulta il meno rilevante.

I dati della seconda e terza gabbia sono leggermente differenti rispetto alla prima: in entrambe si osserva un aumento del terzo e quarto stadio a scapito del secondo stadio, e tra le due gabbie si osserva un aumento del quarto stadio più consistente nella gabbia 2 rispetto alla gabbia 3. I valori del primo stadio e dell'atresia invece rimangono pressoché costanti in tutte e tre le gabbie.

Tabella 7: Comparazione dei dati stereologici tra tonni adattati da circa 2 anni alla cattività (gabbia 1) e tonni mantenuti in gabbia da circa 10 giorni (gabbia 2 e 3), tutti campionati nello stesso periodo di inizio giugno. I valori sono espressi come *media* \pm *S.D.*; *n* è il numero di individui esaminati.

	GABBIA 1	GABBIA 2	GABBIA 3
Ovociti stadio 1			
Vi	0,06 \pm 0,02 (n=2)	0,04 \pm 0,009 (n=3)	0,06 \pm 0,02 (n=7)
Nv (ml ⁻¹) (x 10 ³)	320,85 \pm 65,25 (n=2)	164,65 \pm 72,43 (n=3)	133,16 \pm 50,83 (n=7)
No per individuo (x 10 ⁶)	4,74 \pm 0,22 (n=2)	7,67 \pm 1,82 (n=3)	9,86 \pm 5,66 (n=7)
No g ⁻¹ (x 10 ³)	6,51 \pm 0,80 (n=2)	5,76 \pm 3,67 (n=3)	4,93 \pm 3,42 (n=7)
Ovociti stadio 2			
Vi	0,15 \pm 0,02 (n=2)	0,11 \pm 0,008 (n=3)	0,09 \pm 0,02 (n=7)
Nv (ml ⁻¹) (x 10 ³)	65,27 \pm 22,90 (n=2)	51,78 \pm 8,64 (n=3)	28,55 \pm 13,30 (n=7)
No per individuo (x 10 ⁶)	95,31 \pm 18,98 (n=2)	253,13 \pm 29,95 (n=3)	200,33 \pm 1,06 (n=7)
No g ⁻¹ (x 10 ³)	1,31 \pm 0,36 (n=2)	1,99 \pm 1,37 (n=3)	0,95 \pm 0,48 (n=7)
Ovociti stadio 3			
Vi	0,18 \pm 0,03 (n=2)	0,22 \pm 0,03 (n=3)	0,24 \pm 0,05 (n=7)
Nv (ml ⁻¹) (x 10 ³)	12,31 \pm 1,45 (n=2)	11,99 \pm 3,30 (n=3)	11,22 \pm 3,17 (n=7)
No per individuo (x 10 ⁶)	18,31 \pm 0,73 (n=2)	58,77 \pm 14,27 (n=3)	76,25 \pm 27,83 (n=7)
No g ⁻¹	250,77 \pm 9,36 (n=2)	406,17 \pm 145,22 (n=3)	372,99 \pm 182,21 (n=7)
Ovociti stadio 4			
Vi	0,02 \pm 0,03 (n=2)	0,12 \pm 0,04 (n=3)	0,08 \pm 0,04 (n=7)
Nv (ml ⁻¹) (x 10 ³)	0,37 \pm 0,53 (n=2)	1,70 \pm 0,64 (n=3)	1,50 \pm 0,73 (n=7)
No per individuo (x 10 ⁶)	0,63 \pm 0,88 (n=2)	9,04 \pm 5,62 (n=3)	9,54 \pm 3,94 (n=7)
No g ⁻¹	8,14 \pm 11,51 (n=2)	38,55 \pm 17,84 (n=3)	45,45 \pm 18,55 (n=7)
Atresia			
Vi	0,07 \pm 0,03 (n=2)	0,08 \pm 0,05 (n=3)	0,07 \pm 0,02 (n=7)

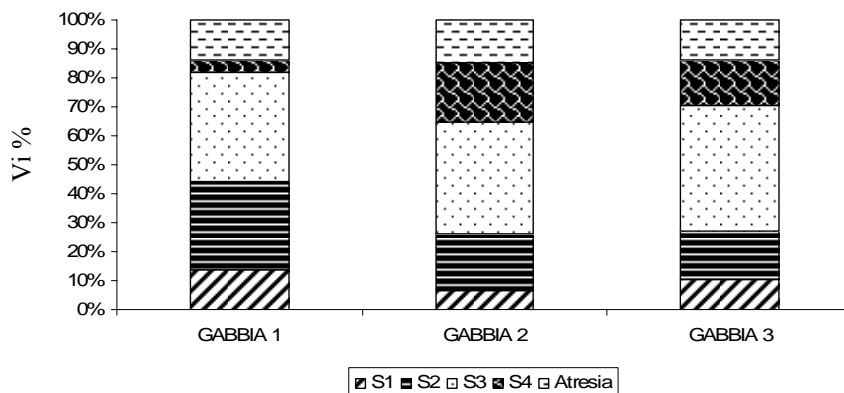


Figura 31: Confronto tra i contributi percentuali medi dei valori della frazione di volume (V_i) di ciascuno stadio di maturazione in tonni adattati da circa 2 anni alla cattività (gabbia 1) e tonni mantenuti in gabbia per circa 10 giorni (gabbia 2 e 3), tutti campionati nello stesso periodo di inizio giugno, nel 2005 e 2006.

Quando questi dati vengono convertiti in valori numerici (figura 32) si osserva che i tonni mantenuti in cattività per un breve periodo di tempo hanno un più alto numero di oociti allo stadio 3 e 4, rispetto ai tonni abituati alla cattività da circa due anni. Il numero di oociti allo stadio perinucleare e ad alveoli corticali è invece molto simile in entrambe le condizioni di cattività, sia se viene espresso come numero per individuo che per g di massa corporea.

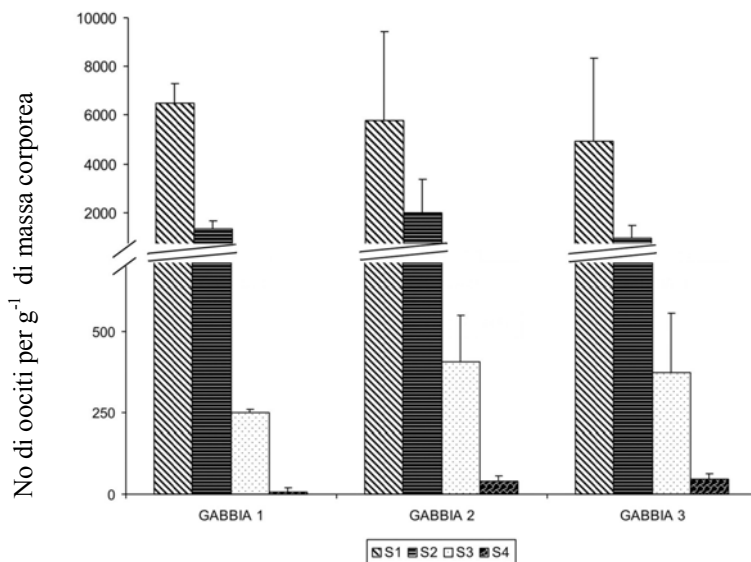


Figura 32: Numero medio (\pm S.D.) delle differenti categorie di oociti per g di massa corporea di tonni adattati alla cattività per un lungo periodo (gabbia 1) e per un breve periodo (gabbia 2 e 3), tutti campionati ad inizio giugno.

Infine, i sei campionamenti eseguiti sui tonni della gabbia 2 hanno permesso di seguire la cinetica dello stato di maturazione della gonade da giugno a luglio in animali appena trasferiti in gabbie di allevamento (Tabella 8).

Tabella 8. Dati stereologici relativi alle gonadi di femmine di tonni rossi prelevati tra il 12 giugno e il 27 luglio 2005 in animali che si trovavano in condizione di cattività dal 3 giugno 2005 (gabbia 2). I valori sono espressi come *media* ± *S.D.*; *n* è il numero di individui esaminati.

	Inizio Giugno (n=3)	Fine giugno (n=1)	Metà Luglio (n=3)	Fine luglio (n=9)
Ovociti stadio 1				
Vi	0.037 ± 0.009	0,12	0.09 ± 0.06	0.24 ± 0.02
Nv (ml ⁻¹) (x 10 ³)	164.65 ± 72.43	956	843.42 ± 636.56	2036.9 ± 410.2
No per individuo (x 10 ⁸)	7.6 ± 1.8	17,55	23.3 ± 5.5	34.5 ± 10.4
No g ⁻¹ (x 10 ³)	5.76 ± 3.67	6,66	9.54 ± 0.46	15.36 ± 5.9
Ovociti stadio 2				
Vi	0.109 ± 0.008	0,06	0.17 ± 0.04	0.04 ± 0.04
Nv (ml ⁻¹) (x 10 ³)	51.78 ± 8.63	101	121.73 ± 24.58	45.42 ± 40.29
No per individuo (x 10 ⁶)	253.1 ± 29.9	186,04	414.7 ± 165.9	71.3 ± 65.7
No g ⁻¹ (x 10 ³)	1.99 ± 1.37	0,7	1.88 ± 1.13	0.29 ± 0.27
Ovociti stadio 3				
Vi	0.21 ± 0.03	0	0.03 ± 0.05	0
Nv (ml ⁻¹) (x 10 ³)	11.99 ± 3.28	0	4.23 ± 7.33	0
No per individuo (x 10 ⁶)	58.7 ± 14.2	0	21.2 ± 36.7	0
No g ⁻¹	406.17 ± 145.22	0	83.87 ± 145.27	0
Ovociti stadio 4				
Vi	0.11 ± 0.04	0	0	0
Nv (ml ⁻¹) (x 10 ³)	1.7 ± 0.64	0	0	0
No per individuo (x 10 ⁶)	9.0 ± 5.6	0	0	0
No g ⁻¹	38.54 ± 17.86	0	0	0
Atresia				
Vi	0.08 ± 0.05	0,11	0.07 ± 0.03	0.01 ± 0.008

Gli animali campionati a inizio giugno sono risultati gli unici con oociti al 3° e 4° stadio, anche se mostravano comunque un elevato grado di atresia (fig. 33).

A partire da fine giugno, si osserva una forte regressione della gonade, con la scomparsa degli oociti negli stadi di migrazione del nucleo e di vitellogenesi ed un'elevata presenza dei follicoli atresici.

A metà luglio si riduce la percentuale dei follicoli atresici e gli oociti allo stadio 2 sono prevalenti insieme a quelli perinucleari.

A fine luglio si riduce il numero di oociti ad alveoli corticali e sono presenti quasi esclusivamente oociti allo stadio perinucleare, anch'essi in numero nettamente inferiore rispetto a quello di metà giugno.

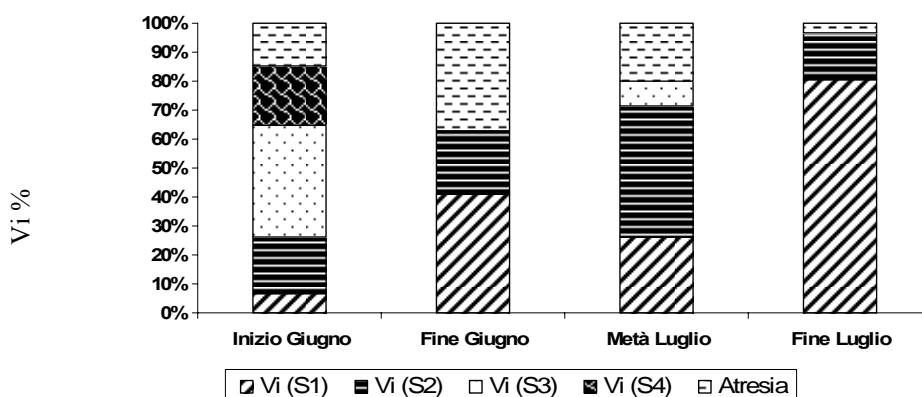


Figura 33: Contributi percentuali dei valori della frazione di volume (Vi) di ciascuno stadio di maturazione degli oociti dei tonni prelevati nelle 6 date di campionamento della stagione 2005 (vedi testo).

Esemplari di sesso maschile

Dati biometrici

In tabella 9 sono riportate le biometrie e gli indici biologici dei maschi prelevati nelle due stagioni di campionamento. Gli animali macellati sono risultati, come per le femmine, tutti tonni adulti. I pesci delle gabbie 2 e 3 possedevano dimensioni simili (t-test: $p=0,10$), con $LF = 240,0 \pm 12,2$ cm. I maschi prelevati in gabbia 1 erano di dimensioni inferiori ($174,0 \pm 8,5$ cm).

Le gonadi dei maschi campionati a giugno di entrambe le stagioni sono risultate più grandi rispetto a quelle campionate a luglio.

Quando l'insieme dei dati di giugno è stato comparato con quello di luglio è stata riscontrata una differenza significativa nell'IG (t-test: $p=3,4 \times 10^{-10}$). L'IG decresce anche di oltre 4 volte già a partire da fine giugno, riflettendo una evidente differenza nel grado di maturità sessuale tra i due mesi di campionamento.

Tabella 9: Codice identificativo di ciascun tonno campionato (ID), gabbia da cui è stato prelevato, data di campionamento, numero di giorni in cattività, biometrie (LF lunghezza alla forca, PT peso totale, PG peso gonade) ed indice gonadosomatico (I_G). I valori più elevati sono evidenziati in grassetto .

ID	Gabbia	Data	Giorni cattività	LF (cm)	PT (kg)	PG (kg)	I_G
1206-01	G1	12/06/2005	730	168	106,4	3,6	3,38
1206-02	G1	12/06/2005	730	180	111,72	4	3,58
1206-06	G2	12/06/2005	9	235	207,48	/	/
1206-09	G2	12/06/2005	9	224	216,79	10	4,61
1506-01	G2	15/06/2005	12	228	195,51	5,6	2,86
2606-03	G2	26/06/2005	23	250	255,36	2,8	1,10
1807-01	G2	18/07/2005	45	228	226,1	3	1,33
2507-01	G2	25/07/2005	52	240	247,38	1,9	0,77
2507-03	G2	25/07/2005	52	245	295,26	2	0,68
2507-04	G2	25/07/2005	52	230	226,1	2,8	1,24
2507-06	G2	25/07/2005	52	240	226,1	1,8	0,80
2507-08	G2	25/07/2005	52	245	272,65	0,8	0,29
2507-09	G2	25/07/2005	52	230	235,41	2	0,85
2507-11	G2	25/07/2005	52	220	244,72	18	0,73
2507-12	G2	25/07/2005	52	220	292,6	3	1,03
2507-13	G2	25/07/2005	52	245	288,61	2,6	0,90
2507-15	G2	25/07/2005	52	240	236,74	2	0,84
2707-17	G2	27/07/2005	54	240	268,66	2	0,74
2707-19	G2	27/07/2005	54	260	353,78	3,2	0,90
2707-20	G2	27/07/2005	54	240	323,19	1,8	0,56
2707-23	G2	27/07/2005	54	240	256,69	2,2	0,86
2707-25	G2	27/07/2005	54	230	234,08	1,6	0,68
2707-27	G2	27/07/2005	54	248	295,26	1,4	0,47
0406-01	G3	04/06/2006	8	248	268,66	13	4,84
0406-02	G3	04/06/2006	8	235	252,7	12	4,75
0406-03	G3	04/06/2006	8	265	352,45	11	3,12
0406-04	G3	04/06/2006	8	225	271,32	9	3,32
0406-06	G3	04/06/2006	8	230	234,08	6	2,56
0706-02	G3	07/06/2006	11	240	280,63	12,6	4,49
0706-05	G3	07/06/2006	11	250	273,98	8,5	3,10
0706-06	G3	07/06/2006	11	245	281,96	9,4	3,33
0706-07	G3	07/06/2006	11	250	271,32	10	3,69
0706-11	G3	07/06/2006	11	275	327,18	22	6,72

Istologia delle gonadi

Tutti i maschi catturati nel mese di giugno di entrambe le stagioni sono in maturazione o maturi mentre i tonni campionati in luglio si trovano nella fase post-riproduttiva (tabella 10).

Tabella 10: Codice identificativo di ciascun tonno campionato, gabbia da cui è stato prelevato, data di campionamento, numero di giorni in cattività, stadio più avanzato delle cellule germinative e condizione riproduttiva assegnata per i maschi di tonno campionati nelle stagioni 2005-2006.

ID Code	Gabbia	Data	Giorni cattività	Stadio delle cellule germinative	Condizione riproduttiva
1206-01	G1	12/06/2005	730	Spermatozoi	Maturo/fluyente
1206-02	G1	12/06/2005	730	Spermatozoi	Maturo/fluyente
1206-06	G2	12/06/2005	9	Spermatozoi	Maturo/fluyente
1206-09	G2	12/06/2005	9	Spermatozoi	Maturo/fluyente
1506-01	G2	15/06/2005	12	Spermatozoi	Maturo/fluyente
2606-03	G2	26/06/2005	23	Spermatozoi	Maturo/non fluente
1807-01	G2	18/07/2005	45	Spermatozoi	Maturo/non fluente
2507-01	G2	25/07/2005	52	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2507-03	G2	25/07/2005	52	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2507-04	G2	25/07/2005	52	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2507-06	G2	25/07/2005	52	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2507-08	G2	25/07/2005	52	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2507-09	G2	25/07/2005	52	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2507-11	G2	25/07/2005	52	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2507-12	G2	25/07/2005	52	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2507-13	G2	25/07/2005	52	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2507-15	G2	25/07/2005	52	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2707-17	G2	27/07/2005	54	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2707-19	G2	27/07/2005	54	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2707-20	G2	27/07/2005	54	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2707-23	G2	27/07/2005	54	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2707-25	G2	27/07/2005	54	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
2707-27	G2	27/07/2005	54	Lobuli vuoti	post-riproduttivo
0406-01	G3	04/06/2006	8	Spermatozoi	Maturo/fluyente
0406-02	G3	04/06/2006	8	Spermatozoi	Maturo/fluyente
0406-03	G3	04/06/2006	8	Spermatozoi	Maturo/fluyente
0406-04	G3	04/06/2006	8	Spermatozoi	Maturo/fluyente
0406-06	G3	04/06/2006	8	Spermatozoi	Maturo/fluyente
0706-02	G3	07/06/2006	11	Spermatozoi	Maturo/fluyente
0706-05	G3	07/06/2006	11	Spermatozoi	Maturo/fluyente
0706-06	G3	07/06/2006	11	Spermatozoi	Maturo/fluyente
0706-07	G3	07/06/2006	11	Spermatozoi	Maturo/fluyente
0706-11	G3	07/06/2006	11	Spermatozoi	Maturo/fluyente

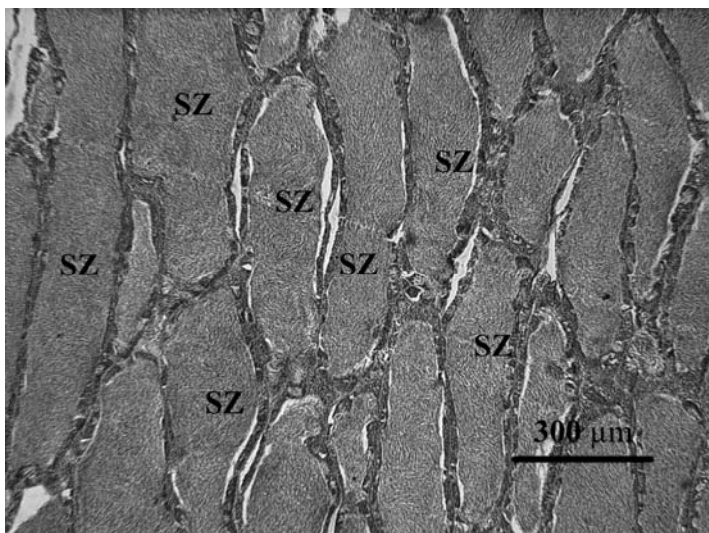


Figura 34: Gonade maschile matura: i tubuli seminiferi sezionati longitudinalmente hanno spermatozoi maturi (SZ) che ne riempiono completamente il lume

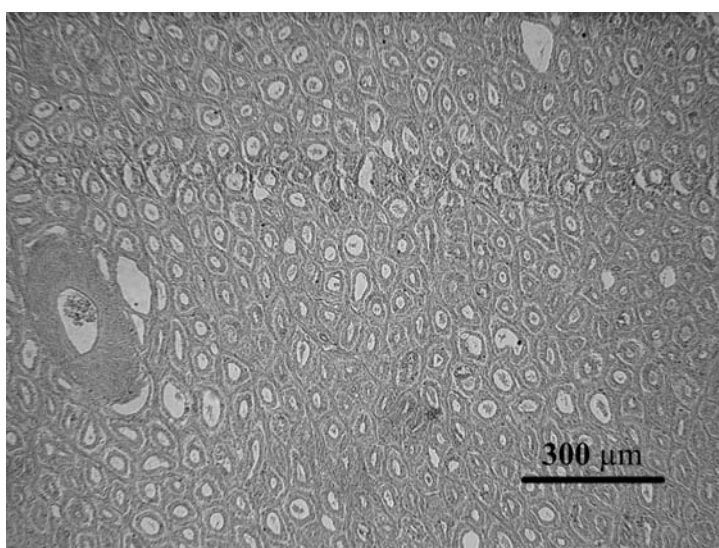


Figura 35: Gonade maschile in fase post-riproduttiva: i tubuli seminiferi sezionati trasversalmente sono vuoti o con pochi spermatozoi residui.

I maschi di giugno mostravano un'elevata presenza di spermatozoi liberi nel lume dei tubuli e del dotto deferente, e di cisti a spermatidi e spermatozoi sulle pareti (fig. 34).

A luglio i tubuli erano vuoti o con rari spermatozoi residui nel dotto deferente (fig. 35).

Anomalie osservate in individui selvatici

Nella porzione centrale della gonade di uno dei campioni classificati a vista come maschi (ID: 1206-09; 225 cm LF e 217 kg di peso, sacrificato il 12 giugno 2005) sono state osservate cellule

germinali femminili (fig. 36). La gonade appariva normale nelle porzioni anteriore e caudale, mentre la porzione centrale conteneva sia spermatozoi completamente metamorfosati, sia oociti a differenti stadi di sviluppo, concentrati in una piccolissima area della gonade dove non era presente alcun elemento maschile. Non sono state osservate cellule germinali femminili allo stadio finale di maturazione. La presenza di spermatozoi maturi nel lume dei tubuli seminiferi indicava che la gonade si trovava in una fase attiva di spermiiazione.

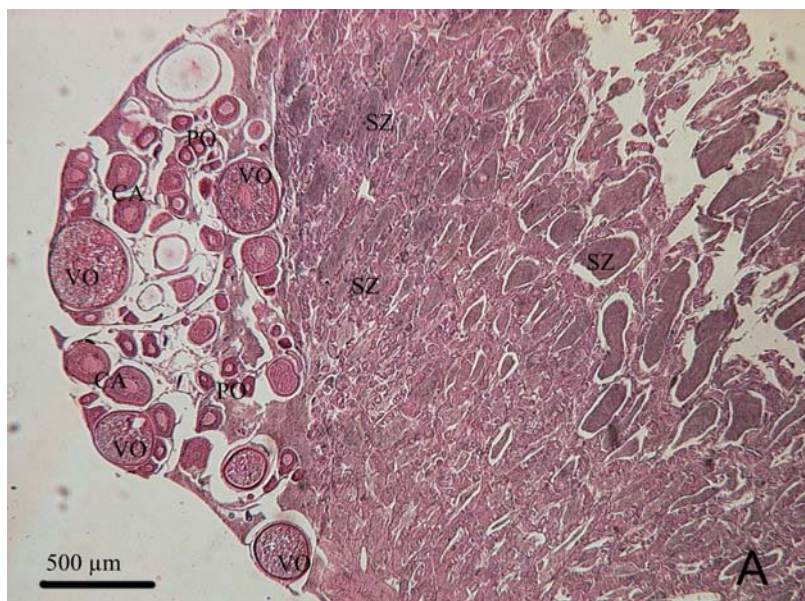


Figura 36: Gonade maschile con cellule germinali femminile a diversi stadi di sviluppo: PO= oociti primordiali, CA= alveoli corticali, VO= oociti in vitellogenesi. I tubuli seminiferi sono ripieni di spermatozoi (SZ).

SVILUPPO SISTEMA DI INDUZIONE ORMONALE

Prove di stimolazione alla riproduzione

Durante il primo anno di sperimentazione la somministrazione dell'ormone è stata tentata 3 volte, il 13, il 14 e il 26 giugno 2005 su tonni che si trovavano in condizioni di cattività da circa 2 anni (gabbia 1). La frequenza dei tentativi è riportata in tabella 11. Complessivamente 15 tonni sono stati trattati con dosi differenti dell'ormone e, più nello specifico, 6 nel tentativo del 13 giugno, 5 il 14 giugno e 4 il 26 giugno.

Tabella 11: Data delle prove di somministrazione, numero di tentativi totali, riusciti, parzialmente riusciti, non riusciti e dose dell'ormone utilizzata.

DATA	13 Giugno	14 Giugno	26 Giugno
N° Tentativi Tot.	7	7	6
N° Tentativi riusciti completamente	3	3	4
N° Tentativi riusciti parzialmente	3	2	-
N° Tentativi non riusciti	1	2	2
0,5 Dose = 1,87 mg di GnRH	3	4	-
1 Dose = 3,75 mg di GnRH	1	-	4
1,5 Dose = 5,62 mg di GnRH	2	1	-
TAG inseriti	2	4	4

Il numero ridotto di tonni trattati è dovuto prevalentemente al fatto che i pesci dopo i primi 2-3 tentativi si spaventavano e sviluppavano un comportamento elusivo nei confronti dell'attività del subacqueo. Di conseguenza, il sommozzatore è stato costretto a muoversi molto lentamente per avvicinare i tonni e far passare molto tempo tra un tentativo e l'altro affinché si calmassero e nuotassero ad una velocità minore. Dopo ogni sparo, il subacqueo ha constatato l'inserimento del *tag* nel muscolo e quanto ormone, rispetto a quello contenuto nella siringa, si fosse scaricato nel pesce. I tentativi sono pertanto stati considerati come "riusciti completamente" quando l'ormone contenuto nella siringa si scaricava del tutto all'interno della muscolatura del pesce; come "riusciti parzialmente" quando la metà o almeno 1/3 del contenuto veniva iniettato nel pesce; "non riusciti" quando lo sparo non aveva esito positivo. Per il subacqueo è stato possibile valutare l'inserimento dell'ormone nel muscolo in quanto il farmaco presentava un colore lattescente. I tentativi non riusciti sono da attribuire prevalentemente al nervosismo, alla rapidità del nuoto ed all'errore di valutazione della distanza dal pesce al momento dello sparo da parte

del sommozzatore. Molti tentativi sono andati a vuoto non arrivando proprio a bersaglio o colpendo un punto o con un angolazione tale che l'ago non è riuscito a penetrare lo spesso tegumento del tonno. I tentativi in cui l'ormone si è scaricato solo parzialmente (fig. 37) sono, invece, dovuti alla fragilità degli aghi ed al peso del complesso siringa-alloggiamento-asta (fig. 38). In questi casi lo scarto repentino del pesce a seguito del colpo ha impedito la liberazione della siringa dall'alloggiamento e l'ago, penetrato nel muscolo del pesce, si



Figura 37: Ago piegato e siringa parzialmente svuotata

è piegato (fig. 37) a causa della sollecitazione generata fra la velocità del nuoto del tonno e il peso del complesso siringa-alloggiamento-asta. Infine gli aghi provvisti di ardiglione e di marcatori visuali (*tags*), legati per mezzo di un monofilo di nylon, dopo poche ore o dopo alcuni giorni, venivano inesorabilmente espulsi dalla muscolatura del tonno rivelandosi non ottimali per una marcatura duratura.

Durante il secondo anno l'obiettivo principale è stato cercare di perfezionare gli strumenti di somministrazione per via intramuscolare e superare i principali problemi riscontrati nella prima stagione di sperimentazione: per tale motivo l'induzione ormonale

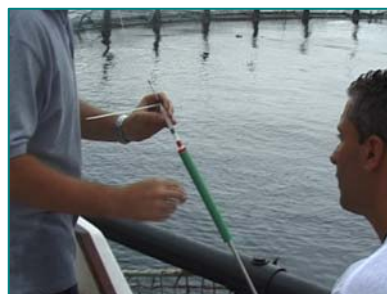


Figura 38: Complesso siringa-alloggiamento-asta

non è stata tentata. Sono stati utilizzati innanzitutto degli aghi più corti (40 mm lunghezza e 2 mm spessore), in modo da offrire una leva meno favorevole al momento dell'impatto col pesce, ed è stato costruito come alloggiamento per la siringa un cilindro in metallo con una molla al suo interno allo scopo di liberare più velocemente la siringa dal complesso asta-alloggiamento e di favorire il rinculo dell'asta dopo che l'ago fosse penetrato nel tonno; inoltre gli aghi non possedevano né ardiglioni né fascette, ma sono stati inseriti *tags* a forma di testa di freccia in polietilene (Floy Tag and Manufactured Company, USA), i quali, una volta penetrati, avrebbero dovuto garantire un tempo di permanenza più prolungato di quelli usati precedentemente.

Sfortunatamente, dei 15 tentativi effettuati nella seconda stagione, nessuno ha avuto un esito positivo o parzialmente positivo. Le cause principali sono state sicuramente la dimensione dei *tags* e la fragilità delle siringhe in plastica. I *tags*, infatti, erano molto più grandi dell'ardiglione utilizzato nel primo anno e hanno impedito la penetrazione dell'ago nel muscolo. Si è tentato, allora, di utilizzare un fucile più potente e di sparare ad una distanza più ravvicinata, in modo da avere una forza d'urto maggiore per farli penetrare. In questo caso il problema riscontrato è stato la fragilità delle siringhe in plastica che si piegavano, a seguito dell'impatto troppo violento,

all'altezza della camera posteriore in cui è presente l'aria a pressione, che ha il compito di svuotare l'ormone in una frazione di secondo all'interno della muscolatura del tonno.

L'alloggiamento costruito su misura ha ridotto notevolmente l'attrito prodotto dal complesso asta-alloggiamento-siringa consentendo una gittata del fucile più elevata e più rapida; ha anche permesso di liberare più velocemente la siringa dal complesso asta-alloggiamento e di favorire il rinculo dell'asta dopo che l'ago fosse penetrato nel tonno, ma, probabilmente, proprio la presenza della molla potrebbe aver ridotto la capacità di penetrazione dell'ago provvisto di *tag*.

MESSA A PUNTO DI TECNICHE DI RACCOLTA DI UOVA FECONDATE

Nei giorni successivi ai tentativi di induzione ormonale, l'acqua superficiale è stata campionata lungo la circonferenza interna della gabbia 1, dove era stata fissata la rete da plancton con la funzione di trattenere e concentrare le uova eventualmente rilasciate dai tonni (fig. 39).



Figura 39: Campionamento del plancton e delle uova presenti all'interno della gabbia dei tonni trattati.

L'osservazione allo stereomicroscopio del materiale raccolto ha consentito di identificare molti organismi planctonici appartenenti a taxa differenti (Tabella 12, fig. 40).

Tabella 12: Taglia media e indice di motilità degli organismi planctonici raccolti all'interno della gabbia dei tonni trattati

TAXA	Taglia Media (cm)	Motilità
Anfipode	0.36	1
Copepode 1	0.07	1
Copepode 2	0.29	1
Nauplio di copepode 2	0.12	1
Eufasiaceo	0.26	1
Larva di Decapode	0.12	2
Zoea	0.19	1
Cladocero	0.05	1
Chetognati	0.65	1
Appendicularia	0.26	1
Diatomee	0.08	1
Dinoflagellati	0.01	0
Idromeduse	0.07	0
Sifonoforo	0.2	0
Nectochete	0.04	1
Ostracode	0.05	1
Uova di teleosteo 1	0.07	0
Uova di teleosteo 2	0.12	0
Uova di teleosteo 3	0.03	0
Larva di teleosteo	0.22	2

Legenda:

0 = trasporto completamente passivo

1= trasporto passivo orizzontalmente, attivo verticalmente

2 = trasporto attivo sia orizzontalmente che verticalmente

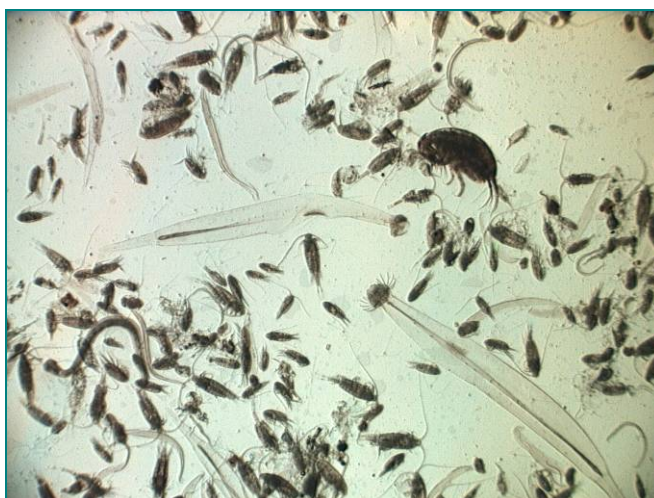


Figura 40: Alcuni degli organismi planctonici campionati nella gabbia dei tonni trattati

Tra gli organismi planctonici sono state trovate uova e larve di pesci, ma nessuna di queste è stata identificata fino a livello di specie. Dalle dimensioni e dalla morfologia è stato comunque possibile escludere che si trattasse di uova o di giovanili di tonno rosso. Sono state rinvenute almeno tre tipi di uova differenti e larve di varie dimensioni (fig. 41).

Il monitoraggio del comportamento dei riproduttori a seguito dell'induzione ormonale non ha messo in evidenza alcun atteggiamento particolare né sono stati individuati segnali di eventi di deposizione (nuoto veloce, inseguimento tra pesci, salti fuori dall'acqua).

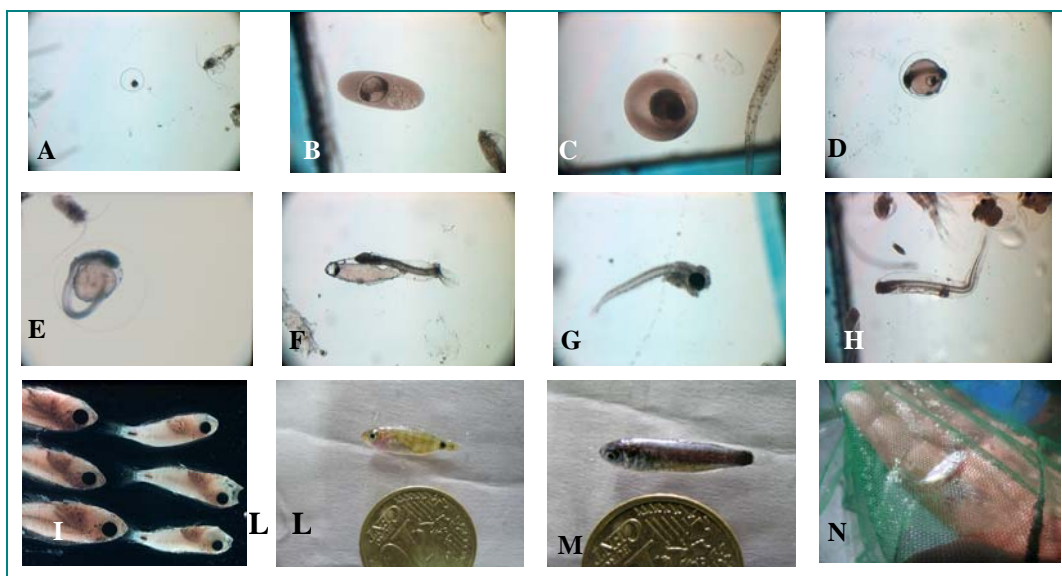


Figura 41: A: uovo diafano di piccole dimensioni (diametro medio $0,35 \pm 0,05$ mm) e privo di sostanze lipidiche di riserva, B: uova con una goccia oleosa in fase di sviluppo e di forma allungata (diametro medio $1,25 \pm 0,08$ mm), C: uovo fecondato di forma sferica (diametro medio $0,70 \pm 0,13$ mm), D: embrione in fase di sviluppo, E: larva in fase di schiusa, F: larva con sacco del tuorlo non riassorbito, G: larva con il sacco del tuorlo riassorbito, H: larva con plica dorsale formata, I, L: giovanili di *Oblada melanura*, M: giovanile di mugilide, N: giovanile di *Trachurus sp.*

DISCUSSIONE

BIOLOGIA RIPRODUTTIVA DEL TONNO ROSSO IN ACQUACOLTURA

La domanda sempre crescente di tonno rosso, soprattutto per il mercato del sushi e del sashimi, e contemporaneamente la necessità di ridurre la pressione esercitata dalla pesca sugli *stocks* selvatici sta spingendo molti ricercatori ed aziende private a ‘chiudere’¹ il ciclo vitale di questa specie in cattività (Doumenenge, 1996; Lioka *et al.*, 2000). Come illustrato nell’Introduzione, lo studio dettagliato della biologia riproduttiva dei tonni selvatici e di quelli mantenuti in cattività per periodi di tempo più o meno lunghi rappresenta un aspetto fondamentale verso il controllo del ciclo vitale e quindi verso la “domesticazione” di questa specie.

La maggior parte degli studi riguardanti lo sviluppo delle gonadi nei tonni consultati, che intendevano descrivere la maturazione, la tempistica e le modalità degli eventi di deposizione, erano basati sullo studio degli ovari, utilizzando varie formulazioni dell’indice gonadosomatico per la classificazione della condizione riproduttiva (Schaefer, 2001b). L’importanza della calibrazione dell’indice gonadosomatico, ad esempio per mezzo di analisi istologiche, risiede nella possibilità di poter essere, potenzialmente, utilizzato per l’individuazione dei tempi e dei luoghi in cui si verificano gli eventi di deposizione, ma non fornisce informazioni accurate ai fini della classificazione dello stato di maturità o dell’attività riproduttiva (de Vlaming *et al.*, 1982). Altre metodologie più appropriate per l’interpretazione e la classificazione dello sviluppo delle gonadi e dell’attività riproduttiva includono la rilevazione del diametro degli oociti che si trova nello stadio più avanzato nell’ovario (Ramon & Bailey, 1996; Schaefer, 2001a) del lotto in esame. L’esame istologico e stereologico di sezioni di ovari e testicoli rappresenta il metodo che garantisce una maggiore affidabilità per la valutazione dello stato riproduttivo (Schaefer, 1998) dei tonni e per questo motivo è stato utilizzato sui tonni oggetto di questa tesi.

Femmine

L’esame istologico delle gonadi femminili dei tonni affrontato in questo studio ha permesso di:

- 1) confermare che l’ovario del tonno rosso è costituito da lamelle ovigere con numerosi follicoli a differenti stadi di sviluppo (Corriero *et al.*, 2003);

¹ chiudere: comprendere l’intero ciclo vitale (riproduzione, fase embrionale, larvale, giovanile, subadulta).

- 2) osservare la simultanea presenza in un singolo individuo di tutti gli stadi di sviluppo degli oociti durante il periodo riproduttivo (confermando quanto riportato da Medina *et al.*, 2002; Corriero *et al.*, 2003), caratteristica che indica che questa specie ha uno sviluppo asincrono degli oociti ed è un *multiple spawner* (Tyler and Sumpter, 1996);
- 3) evidenziare come l'aumento del peso e del volume dell'ovario sia dovuto principalmente all'aumento del numero di oociti che si trovano nello stadio di vitellogenesi attiva.

E' stato infatti osservato un aumento progressivo della densità di volume degli oociti con tuorlo all'aumentare dell'indice gonadosomatico: l'IG significativamente più basso di tutti quelli rilevati è stato rilevato nei tonni della gabbia 2, campionati a fine giugno e luglio ($1,03 \pm 0,26$ $n=13$), ossia nei pesci in cui non erano stati trovati oociti in stadio vitellogenetico. Tra i tonni campionati ad inizio giugno, sono risultati con un IG più basso quelli della stagione 2005, in particolar modo le femmine in cattività da 2 anni ($2,45 \pm 0,19$ $n=2$). Queste infatti mostravano un valore percentuale di oociti del secondo stadio più alto ed un valore percentuale di oociti nello stadio di migrazione nucleare più basso rispetto a quello rilevato nei tonni mantenuti in cattività da poco tempo e campionati nello stesso periodo (vedi figura 9.7 in risultati). Anche quando questi dati vengono convertiti in valori numerici ($No\ g^{-l}$), si osserva che i tonni mantenuti in cattività per un breve periodo di tempo hanno un numero più elevato di oociti allo stadio S3 e S4 rispetto ai tonni adattati alla cattività da circa due anni e campionati nel medesimo periodo di inizio giugno (vedi figura 9.8 in risultati). Dopo 2 anni di cattività (IG: $2,45 \pm 0,19$ $n=2$), ma anche dopo pochi giorni (circa 10 gg) di cattività (IG gabbia 2: $2,65 \pm 0,25$ $n=3$; IG gabbia 3: $3,94 \pm 0,98$ $n=7$) i tonni presentavano valori di IG nettamente più bassi rispetto a quelli dei tonni selvatici, sia che fossero stati pescati nelle aree di deposizione del Mediterraneo occidentale (IG = $4,12 \pm 1,65$ $n = 24$; Medina *et al.*, 2002), sia nelle aree del Mediterraneo orientale (IG = $5,16 \pm 0,48$ $n = 23$ Karakulak *et al.*, 2004), ma contemporaneamente molto simili ai valori registrati nei tonni mantenuti in gabbia da 1 fino a 3 anni (Corriero *et al.*, 2007).

- 4) Queste differenze nell'IG potrebbero indicare che le condizioni di allevamento provocano uno sviluppo incompleto dell'ovario, sebbene sia avvenuta comunque una crescita normale degli oociti.

Del resto, anche il *T. orientalis*, mantenuto in condizioni di cattività, mostra le medesime difficoltà nel raggiungere elevati valori di IG. Valori medi di $I_G > 5$ sono stati riportati per i tonni rossi selvatici del Pacifico durante la stagione riproduttiva (Chen *et al.*, 2006), mentre la maggior parte dei tonni selvatici del Pacifico mantenuti in condizioni di cattività non raggiunge valori di $I_G > 2$ anche dopo 5–12 anni di cattività (Miyashita *et al.*, 2000).

- 5) Il ridotto reclutamento di oociti in vitellogenesi nei tonni mantenuti in cattività rispetto ai selvatici, potrebbe essere dovuto ad un'alterazione nella produzione degli ormoni che regolano la riproduzione. I bassi livelli plasmatici di 17- β -estradiolo ($< 1 \text{ ng ml}^{-1}$) osservati nei tonni campionati in gabbia suggerisce che la condizione di confinamento determini una limitazione nello sviluppo finale della gonade.

Nessuno dei lavori trovati in letteratura affronta l'analisi comparativa tra le diverse porzioni lungo l'asse longitudinale della gonade del tonno rosso: la maggior parte degli studi sono stati effettuati su sezioni trasversali che interessano l'intero spessore della parete ovarica della porzione centrale, dalla periferia fino al lume dell'organo (Baglin, 1982; Medina *et al.*, 2002).

- 6) Questo studio rappresenta, quindi, una prima valutazione del grado di omogeneità nella distribuzione degli oociti nell'ovario di tonno rosso. Questa informazione è fondamentale per eseguire correttamente dei prelievi finalizzati alla valutazione del grado di maturazione e di fecondità. Dai dati ottenuti sembra che gli oociti si distribuiscano in modo omogeneo lungo l'asse antero-posteriore della gonade.

In tutte e tre le porzioni della gonade esaminate (anteriore, centrale e posteriore) sono stati rinvenuti oociti ai quattro stadi di maturazione. La presenza di un numero superiore di oociti allo stadio S4 riscontrata nella porzione anteriore della gonade dei 2 tonni campionati dopo 2 anni di cattività, permette però di ipotizzare che per almeno gli oociti a questa stadio esistano delle differenze nella distribuzione. I dati ottenuti dall'analisi delle diverse porzioni della gonade, quindi, forniscono dei risultati solamente preliminari. Il numero esiguo di esemplari su cui è stato effettuato lo studio non permette di generalizzare l'esistenza di disomogeneità o di omogeneità nella distribuzione di oociti tra le diverse porzioni di gonade e tra differenti individui. Ulteriori studi, preferibilmente su un numero maggiore di tonni selvatici appena catturati, sono necessari per valutare queste differenze e quanto eventualmente siano legate ad una variabilità intraspecifica o ad effettive differenze anatomo-funzionali all'interno della gonade, o a tempi di maturazione differente.

- 7) Le analisi istologiche hanno permesso di seguire lo sviluppo gonadico in tonni in cattività durante il periodo riproduttivo.

Durante le prime due settimane di giugno le gonadi dei pesci si trovano nella fase di maturazione attiva, con molti oociti in fase di vitellogenesi avanzata e alcuni in fase di migrazione del nucleo. Questo è in accordo con quanto osservato da Rodríguez-Rota (1964, 1967) e Susca *et al.* (2000, 2001a), che affermano che la fase di deposizione nell'area centrale del Mediterraneo non inizia prima della metà di giugno.

- 8) Nello stesso periodo però nei tonni in cattività si osserva anche un'elevata presenza di oociti atresici di taglia simile agli oociti in avanzata vitellogenesi.

Nei Teleostei, un'alta incidenza di oociti atresici è stata interpretata come un segnale di arresto dell'attività di deposizione (Hunter *et al.*, 1986; Schaefer, 1998) o come fallimento nel completamento della maturazione finale degli oociti (Mylonas *et al.* 1997a). Pertanto, anche la presenza di oociti atresici in stadi di avanzata vitellogenesi potrebbe essere messa in relazione, come il numero di oociti in vitellogenesi significativamente più basso nei tonni mantenuti in cattività rispetto ai selvatici, ai bassi livelli ormonali di estradiolo ($<1 \text{ ng ml}^{-1}$) rilevati in questi tonni, paragonabili ai valori osservati in tonni selvatici catturati ad agosto e quindi in fase post-riproduttiva (Susca *et al.*, 2001a). I bassi livelli di estradiolo durante la fase di maturazione o immediatamente prima della fase di deposizione sono probabilmente dovuti alla cattura ed alla cattività.

- 9) D'altra parte, i dati relativi alla concentrazione ematica dell'estradiolo, simili nei gruppi mantenuti in cattività 9 giorni e 2 anni e campionati nello stesso periodo, sembrano indicare che l'effetto della stagionalità sia comunque forte nonostante lo stress dovuto alla cattività.

- 10) Già a partire da fine giugno, periodo che in molte aree del Mediterraneo corrisponde alla principale fase di deposizione (Susca *et al.*, 2001a; Corriero *et al.*, 2003), la gonade si trova in una fase di forte regressione e non si osservano più oociti in vitellogenesi ma solamente oociti atresici, nel primo e nel secondo stadio.

Nelle date di luglio tutte le gonadi esaminate, eccetto una che presentava ancora pochi oociti in vitellogenesi, contenevano oociti allo stadio perinucleare e pochi oociti nello stadio ad alveoli corticali, indicando che i tonni erano entrati definitivamente in una fase post-riproduttiva.

- 11) Durante il periodo monitorato non sono stati osservati né follicoli post-ovulatori né oociti idratati e questo fa ritenere che non siano avvenute deposizioni.

Questa eventualità non può comunque essere esclusa completamente, vista la difficoltà di cogliere questi eventi e la rapidità con cui avviene il riassorbimento dei follicoli post-ovulatori nella gonade (meno di 24 ore) (Matsuyama *et al.*, 1988). Anche la probabilità di trovare oociti completamente idratati è molto bassa, dato che il processo di idratazione avviene poche ore prima della deposizione e quindi gioca un ruolo importante l'ora del giorno in cui si effettua la cattura (Farley & Davis, 1998). Nell'area dove è stato effettuato il campionamento, però, non sono disponibili sufficienti evidenze scientifiche dell'esatto periodo riproduttivo del tonno rosso e per tale motivo non si può escludere una seconda ipotesi: i tonni catturati in data 03/06/2005 potrebbero essere stati pescati proprio al momento della deposizione e quindi nei campionamenti successivi sarebbero state osservate gonadi parzialmente svuotate, essendo già stati rilasciati lotti

di uova mature. I valori di IG più elevati osservati nei tonni pescati il 28/05/06 e campionati il 4 e il 7/06/06 ($IG=3,94 \pm 0,98$ $n=7$), potrebbero far supporre che nell'area del basso Tirreno la riproduzione avvenga tra la fine di maggio e l'inizio di giugno. Per verificare che l'area davanti al Golfo di Sant'Eufemia sia realmente un sito di deposizione per i tonni e che il periodo riproduttivo sia concentrato tra la fine di maggio e l'inizio di giugno sarà necessario in futuro effettuare dei campionamenti specifici su tonni selvatici pescati in questa zona e in un arco temporale sufficientemente ampio da poter caratterizzare senza dubbi il pattern riproduttivo.

12) L'aspetto, forse più interessante, che questa tesi ha affrontato è stato l'effetto del mantenimento per brevi e lunghi periodi di cattività sulla maturazione finale della gonade.

A tale scopo sono stati confrontati i tonni mantenuti in cattività per 2 anni (gabbia 1) e quelli trasferiti in gabbia da pochi giorni (gabbia 2 e 3), ma campionati comunque nello stesso periodo di inizio giugno. I parametri presi in esame per tale confronto sono stati: i valori di IG , Vi , Nv , No per individuo e $No_{s4} g^{-1}$.

13) L'insieme dei dati ottenuti fa supporre che la cattività giochi un ruolo negativo sui tonni, tanto che la fecondità relativa media per lotti ottenuta partendo da Nv degli oociti allo stadio S4 nei tonni della gabbia 1 ($No_{s4} g^{-1} = 8,1 \pm 11,5$ $n=2$) è circa 5 volte inferiore rispetto a quella osservata nei tonni della gabbia 2 ($No_{s4} g^{-1} = 38,55 \pm 17,84$ $n=3$) e quasi 6 volte inferiore alla fecondità relativa media per lotti stimata nei tonni pescati nella stagione 2006 e campionati circa nello stesso periodo ($No_{s4} g^{-1} = 45,45 \pm 18,55$ $n=7$).

Ulteriori informazioni si possono ricavare confrontando questi dati con quelli disponibili in letteratura. Uno studio condotto da Medina *et al.* (2002), su tonni rossi selvatici pescati nel periodo riproduttivo, ed in particolare sulla porzione centrale della gonade (come nel nostro studio), indicano valori di fecondità relativa media per lotti del tonno rosso di 93 oociti g^{-1} , quindi valori molto più elevati rispetto anche ai tonni da poco mantenuti in cattività utilizzati in questa tesi come controllo ($No_{s4} g^{-1} = 43,38 \pm 17,65$ g^{-1} $n=10$). Tali esemplari sono stati pescati ad inizio giugno e campionati dopo circa 10 giorni di cattività e sono pertanto stati sottoposti allo stress acuto dovuto alla pesca, al trasferimento in gabbia e ai primi giorni senza alimentazione. Potrebbero quindi non rappresentare un vero gruppo di controllo. Inoltre, sugli esemplari di tonno oggetto di questa tesi hanno agito stress diversi: mentre i tonni mantenuti in cattività per 2 anni sono ragionevolmente sottoposti ad uno *stress cronico*, dovuto al confinamento e al frequente rapporto con l'uomo, i tonni pescati ad inizio giugno e campionati dopo circa 9 giorni di cattività hanno subito uno *stress acuto* a causa della cattura e dell'immissione in gabbia. Entrambi i tipi di stress influiscono sulla regolazione endocrina,

fondamentale in questa fase di maturazione, così determinando in entrambi i casi una netta riduzione della fecondità e della qualità delle uova. Del resto gli effetti dello stress sulla riproduzione e sulla crescita dei pesci è particolarmente ben documentata in letteratura (Pankhurst & Van Der Kraak, 1997).

Maschi

Le analisi istologiche condotte sui testicoli dei tonni maschi hanno mostrato che:

- 1) tutti i pesci, campionati a inizio giugno, hanno completato la gametogenesi e le gonadi sono risultate mature e fluenti. La cattività, almeno nei tonni maschi, sembra non influenzare la spermatogenesi, potrebbe però aver accorciato il periodo in cui i tonni maschi sono potenzialmente fecondi, in quanto già nel campionamento di fine giugno i tubuli contenevano un numero visibilmente inferiore di spermatozoi maturi e la gonade, sebbene contenesse al suo interno ancora numerosi spermatozoi, non era più fluente. Infine, nelle date di fine luglio i tubuli seminiferi apparivano vuoti o con pochi spermatozoi residui, rari nel dotto deferente.

La cattività potrebbe anche aver ridotto la quantità (densità) e qualità dello sperma (motilità) ma su questo punto non sono state effettuate analisi e sarà necessario in futuro effettuare degli studi.

- 2) Fenomeni di ermafroditismo sono stati riportati in molte specie ittiche pelagiche (Sawada *et al.*, 2002; De Metrio *et al.*, 2003), ma in questa tesi è stata fornita la prima descrizione di un caso di intersex in un esemplare maschio di tonno rosso.

Finora infatti, un solo caso di ermafroditismo era stato descritto nella famiglia dei tunnidi, in particolare nel *T. orientalis* da Sawada *et al.* (2002). La presenza di cellule germinali femminili potrebbe rappresentare un fenomeno naturale ma la rarità delle segnalazioni depongono a sfavore di questa ipotesi. Si potrebbe quindi ipotizzare che la causa più probabile di questa alterazione nella fisiologia riproduttiva stia nella presenza di condizioni ambientali stressanti. Considerato il breve periodo intercorso tra la cattura e il prelievo, appare improbabile che le condizioni di cattività possano aver indotto un'alterazione così importante. Non è invece possibile escludere un ruolo dell'inquinamento ambientale nello sviluppo di questo caso di intersex. Gli effetti negativi di contaminanti quali surfattanti, pesticidi, bifenili policlorinati, idrocarburi aromatici policiclici e plastificanti sulle funzioni riproduttive dei pesci sono ampiamente riportati in letteratura (Jobling *et al.* 1998; Fossi *et al.* 2002; De Metrio *et al.*, 2003). Il tonno rosso, essendo un predatore al vertice della piramide trofica, è una specie particolarmente sensibile all'accumulo di composti tossici. Studi più approfonditi sono necessari per stimare la frequenza dei fenomeni di ermafroditismo nello stock di tonno rosso, in individui di taglie diverse, ed individuarne le possibili cause di induzione.

SVILUPPO DI UN METODO DI SOMMINISTRAZIONE ORMONALE E STIMOLAZIONE DELLA RIPRODUZIONE

Nei pesci gli eventi riproduttivi sono estremamente dipendenti dalle condizioni ambientali; pertanto, nei pesci allevati spesso giungono a compimento solamente nei riproduttori mantenuti in cattività per periodi di tempo molto lunghi (Mylonas & Zohar, 2001). I primi tentativi di allestimento di un parco di riproduttori del genere *Thunnus* sono iniziati alla fine degli anni settanta in Giappone, dove tonni rossi del Pacifico (*T. orientalis*) immaturi (< 1kg) sono stati mantenuti per un lungo periodo di tempo (7 anni) in grandi gabbie a mare od in insenature naturali artificialmente confinate prima di ottenere una deposizione spontanea (Kumai, 1998; Lioka *et al.*, 2000, Miyashita *et al.*, 2000; Masuma *et al.*, 2003; Sawada *et al.*, 2005; Masuma *et al.*, 2006). Questo primo evento riproduttivo è stato però poco consistente e non ha consentito di mettere a punto metodi di allevamento larvale per questa specie. Un numero adeguato di uova furono ottenute nel 1990 dall'Università di Kinki (Sawada *et al.*, 2005) sulla stessa specie, ed i pesci allevati da queste uova raggiunsero la maturità riproduttiva nel 2004, deponendo a loro volta 1 milione di uova (Sawada *et al.*, 2005). La chiusura del ciclo riproduttivo è stato un importante avanzamento verso l'allevamento su larga scala di questa specie.

Le condizioni di cattività sembrano, invece, non inibire la maturazione e la deposizione nel tonno pinna gialla (*T. albacares*). Eventi riproduttivi di questa specie in allevamento si sono verificati a Panama (Wexler *et al.*, 2003) ed in Giappone (Kaji *et al.*, 1999). Esemplari selvatici adulti di tonno pinna gialla, infatti, hanno iniziato a deporre uova in modo regolare dopo circa 6-8 mesi dalla cattura e dal trasferimento in grandi vasche a terra (Wexler *et al.*, 2003).

In Mediterraneo, dove le prime gabbie di allevamento del tonno rosso sono comparse solo nel 1996, non è ancora stata registrata alcuna riproduzione spontanea. Solamente nel 2005, nell'ambito del progetto europeo REPRO-DOTT, a seguito della somministrazione di GnRH α , si è riusciti ad ottenere il rilascio e la raccolta di un numero ridotto di uova fecondate da tonni mantenuti in gabbia ed a realizzare una fecondazione *in vitro* di uova di tonno rosso in cattività (Mylonas *et al.*, 2007).

Nel nostro caso, il progetto si proponeva di effettuare uno dei primi tentativi di induzione ormonale ai fini della riproduzione di tonni mantenuti in gabbie di stoccaggio, senza immobilizzare, anestetizzare o manipolare fuori dall'acqua i pesci. Studi precedenti hanno mostrato l'estrema difficoltà e il rischio di manipolare ed anestetizzare pesci della famiglia dei tunnidi che non posseggono una muscolatura branchiale sviluppata e quindi hanno difficoltà a ventilare quando non nuotano attivamente (Sakurai *et al.*, 1997; Takii *et al.*, 2005).

Il range del dosaggio ormonale utilizzato è stato volutamente molto ampio ($20-80 \mu\text{g kg}^{-1}$), in quanto in letteratura al momento della sperimentazione non era ancora disponibile un dato preciso sulla quantità da somministrare per ottenere la FOM e la deposizione in gabbia nel tonno rosso. Solo nel 2007, infatti, sono stati resi disponibili i dati conclusivi relativi al progetto REPRO-DOTT, dove la dose di ormone effettiva utilizzata nell'esperimento del 2004 aveva un intervallo compreso tra $40-80 \mu\text{g kg}^{-1}$, mentre nel 2005 è stata volutamente incrementata e portata a $50-100 \mu\text{g kg}^{-1}$, consentendo non solo la FOM e la fecondazione in vitro, come già nel 2004, ma anche un evento spontaneo di deposizione (Mylonas *et al.*, 2007).

La scelta di adottare un sistema a lento rilascio in soluzione (microsfere biodegradabili, copolimero DL-acido lattico-glicolico) del GnRH α ha richiesto lo sviluppo di un nuovo protocollo di somministrazione dell'ormone. Nel progetto REPRO-DOTT (2005) era stato infatti utilizzato un impianto solido a base di etilene-vinil-acetato e quindi una predisposizione differente del sistema di somministrazione (Mylonas *et al.*, 2007). I tentativi di induzione ormonale effettuate nel corso di questo lavoro di tesi in entrambe le stagioni di sperimentazione sono stati particolarmente difficoltosi e non hanno consentito di indurre un elevato numero di pesci. La somministrazione dell'ormone, infatti, è risultata una procedura lenta che ha richiesto sempre più tempo, man mano che si succedevano i tentativi. Questo era dovuto al fatto che i tonni, identificando il pericolo nella figura del subacqueo, avevano assunto un comportamento sfuggente. Il subacqueo è stato costretto, per ogni tentativo, ad avvicinarsi ai pesci molto lentamente ed aspettare fino a quando non si fossero in parte calmati ed abituati alla sua presenza, riducendo la velocità di nuoto. I pesci, inoltre, reagivano sempre più rapidamente al suono prodotto dallo sparo del fucile evitando così la traiettoria dell'asta. L'intera procedura ha richiesto tra i 2 ed i 30 minuti per pesce.

Nel secondo anno di sperimentazione, nonostante le modifiche apportate al dispositivo di somministrazione, nessun tonno è stato inoculato o marcato nei 3 tentativi effettuati. Gli aghi, probabilmente per la presenza dei *tags*, non sono mai riusciti a penetrare la spessa pelle del tonno. Da prove di marcatura a secco tentate su tonni morti si è infatti capito che per far penetrare i *tags* inseriti negli aghi è necessaria una forza di impatto maggiore rispetto a quella fornita dal fucile subacqueo che avevamo a disposizione. Inoltre, sebbene la molla abbia svolto egregiamente il proprio dovere, ha probabilmente ridotto la forza di impatto della siringa. Un altro fattore che ha influenzato la penetrazione dell'ago nel muscolo del tonno è stato il punto del corpo colpito e la distanza variabile del pesce dal subacqueo al momento dello sparo. La porzione anteriore del tonno risulta molto dura e difficilmente penetrabile, al contrario della parte caudale che presenta una cute più sottile: i tentativi che hanno raggiunto quella zona, infatti, sono andati più frequentemente a segno.

A seguito di queste prove, sembra che l'utilizzo di un numero maggiore di palloni di sollevamento della rete della gabbia, che riducano maggiormente il volume di acqua a disposizione dei tonni, potrebbe rendere più facile l'avvicinamento del subacqueo all'animale. Mylonas *et al.* (2007) suggeriscono come profondità ideale della gabbia per l'induzione ormonale 4-5 m e un'area complessiva di 150-200 m². L'utilizzo di fucili più potenti è possibile solamente se verranno utilizzate delle siringhe più resistenti, che non si flettano o rompano al momento dell'impatto con il pesce. I *tags* dovranno essere di piccole dimensioni per facilitare la loro penetrazione nel tegumento e nella muscolatura del pesce e contemporaneamente provocare un danno minore all'animale.

Un'accurata programmazione del periodo in cui deve avvenire il trattamento ormonale è essenziale per il successo dell'induzione e dell'ovulazione in pesci allevati. Perciò, negli esperimenti di induzione dell'ovulazione mediante GnRH α l'ormone dovrebbe essere somministrato quando i pesci hanno completato la fase di accumulo della vitellogenina; se la stimolazione è ritardata, il trattamento mediante GnRH α può non avere successo a causa della degenerazione degli oociti in vitellogenesi in follicoli atresici (Mylonas *et al.*, 2007). L'esperimento di induzione ormonale del 2005 è stato condotto durante il periodo di deposizione naturale della specie nel centro del Mediterraneo (Medina *et al.*, 2002; Corriero *et al.*, 2003), quando la temperatura superficiale dell'acqua era maggiore di 22°C, considerata la temperatura limite per la deposizione di molte specie di tonni (Schaefer, 2001a). L'elevata percentuale di follicoli atresici e i bassi livelli di 17- β -estradiolo rinvenuti nei due tonni campionati dalla gabbia 1, un giorno prima del primo tentativo di induzione ormonale, indicano che la condizione riproduttiva di questi pesci non fosse ottimale al momento del trattamento. Inoltre, proprio lo stress dovuto al campionamento ed alle successive procedure per l'induzione ormonale, che consistono nel sollevamento del fondo della gabbia e nel costringere i pesci a nuotare in uno spazio ristretto per alcune ore mentre un subacqueo tenta di indurli sparando con un fucile, può aver ulteriormente compromesso un quadro di per sé già non buono. Anche nel progetto REPRO-DOTT (Corriero *et al.*, 2007) è stato osservato l'arresto dell'attività riproduttiva, nei pesci utilizzati come controllo, dopo aver indotto con GnRH α parte dei pesci della gabbia. Sembra quindi, che i tonni, almeno dal punto di vista riproduttivo, siano molto sensibili a qualunque procedura che possa generare un qualsiasi grado di disturbo. Per ottenere dei risultati migliori potrebbe essere utile testare le diverse dosi di GnRH α su tonni appena trasferiti in gabbia, in quanto mostravano un quadro riproduttivo complessivo nettamente migliore rispetto ai tonni mantenuti in cattività da due anni, o su animali che siano in cattività da un più lungo periodo di tempo o quanto meno avendone migliorato le condizioni di allevamento (densità in

gabbia, alimentazione) e limitando al minimo indispensabile le operazioni da svolgere in gabbia per ridurre lo stress nei pesci.

MESSA A PUNTO DI TECNICHE DI RACCOLTA DI UOVA FECONDATE ALL'INTERNO DI GABBIE DI STOCCAGGIO

Il sistema ideato per la raccolta di uova fecondate, rilasciate a seguito di un evento spontaneo di deposizione o indotto dalla somministrazione dell'ormone, all'interno delle gabbie di stoccaggio ha dimostrato di possedere un'elevata capacità di trattenimento e di aggregazione degli organismi planctonici. La rete di maglia fine fissata lungo la circonferenza interna della gabbia ha, infatti, bloccato e concentrato diverse uova di Teleostei, probabilmente appartenenti ai pesci opportunisti che vivono intorno alla gabbia, evitando che queste venissero trascinate lontano dalle forti correnti presenti nella zona.

In Giappone, l'utilizzo di un sistema analogo, montato su gabbie simili a quella utilizzata in questo esperimento, dove alcuni esemplari di tonno rosso del Pacifico avevano deposto, ha permesso di raccogliere un gran quantitativo di uova per evento di deposizione (da 1×10^5 a 8×10^6 uova per evento: Kumai, 1998; Sawada *et al.*, 2005) e fino a 36×10^7 uova per stagione riproduttiva (Masuma *et al.*, 2006). Nel progetto europeo REPRO-DOTT, Mylonas *et al.* (2007) invece, hanno incontrato molte difficoltà a trattenere le uova fecondate emesse in modo spontaneo a seguito dell'induzione ormonale. In questo caso le cause principali erano da attribuire all'azione combinata della forte corrente e delle onde che consentivano alle uova di superare facilmente l'ostacolo costituito dalla rete sottile. Le località in cui sono ubicate le gabbie in Giappone sono molto protette, limitando in questo modo gli effetti delle forti correnti e dell'azione delle onde sulla dispersione delle uova nella colonna d'acqua, consentendo così una più semplice raccolta delle uova con la rete da plankton dallo strato d'acqua superficiale. In Mediterraneo, siti simili a quelli giapponesi non forniscono acqua di alta qualità e bassa torbidità necessaria per la sopravvivenza di grandi pesci pelagici e quindi non possono essere adottati (Mylonas *et al.*, 2007).

L'utilizzo di aree esposte a venti e a forti correnti d'altra parte aumenta di molto la possibilità che le uova rilasciate si disperdano o fuoriescano dalla gabbia prima di essere raccolte e, contemporaneamente, evidenzia alcuni punti di debolezza della rete a maglia fine:

- il primo punto è una scarsa resistenza strutturale alle forti correnti e alle mareggiate: la rete di maglia fine non è in grado di sopportare le sollecitazioni dovute all'alterazione

della forma della gabbia ad opera delle correnti e quindi tende a strapparsi nei punti in cui subisce una tensione maggiore.

- Il secondo punto è la necessità di effettuare una continua pulizia della rete per evitare l'occlusione delle sue maglie a causa del fenomeno del bio-fouling. Questo aspetto richiede un grande dispendio di personale e di tempo.
- Infine, la rete utilizzata ricopre una superficie ridotta della gabbia (primi 2 m dalla superficie) e, sebbene i tonni sono considerati pesci che depongono in superficie (Iverson *et al.*, 1970; Schaefer, 2001a), eventi di deposizione possono avvenire ben al di sotto della superficie dell'acqua.

Tonni rossi del Pacifico mantenuti in cattività sono stati visti deporre a significative profondità con un movimento a spirale dal fondo verso la superficie dell'area in cui erano confinati (Masuma, 2006). In questi casi, se un evento di deposizione avvenisse nella colonna d'acqua in un momento di forte corrente, le uova verrebbero rapidamente disperse passando al di sotto della rete senza essere intercettate.

L'utilizzo di grandi impianti a terra, simili a quelli utilizzati per il tonno pinna gialla (Wexler *et al.*, 2003) sembra essere la sola alternativa per mantenere i tonni rossi ed essere sicuri di raccogliere tutte le uova emesse dopo che si verifica un evento di deposizione. Del resto tonni rossi adulti sono già mantenuti in grandi vasche a terra di acquari pubblici nel mondo (Farwell, 2003; Minori *et al.*, 2006) e recentemente in un allevamento in Australia (Fish Farming International, 2006). Lo sviluppo di impianti di allevamento di tonni a terra consentirà di intercettare con sicurezza ogni evento riproduttivo, sia dovuto ad una deposizione spontanea sia indotto dalla somministrazione di GnRH esogeno. Inoltre, consentirebbe di controllare tutti i parametri ambientali che influenzano le funzioni riproduttive, in particolar modo la temperatura, che è un segnale importante che regola la funzione riproduttiva (Lioka *et al.*, 2000; Schaefer, 2001b), oltre a semplificare, se necessario, la somministrazione dei trattamenti ormonali per indurre la deposizione.

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Le prime forme di acquacoltura storicamente sono state basate sulla raccolta di giovanili in natura, poi trasferiti in ambienti di accrescimento controllati e spazialmente definiti. L'allevamento del tonno, attualmente, si trova ancora ad uno stadio iniziale, in quanto basato sull'ingrasso di individui adulti e sub-adulti per periodi di tempo relativamente breve (Lioka *et al.*, 2000). Le forme di piscicoltura basate sul seme naturale, generalmente hanno possibilità di sviluppo molto limitate. La disponibilità di giovanili, a maggior ragione nel caso del tonno di

animali adulti, diventa infatti un fattore limitante per la crescita di questa attività. Per questa ragione gli sforzi di gran parte dell'attuale ricerca sono indirizzati a comprendere i meccanismi necessari per arrivare alla chiusura del ciclo produttivo in cattività (Mylonas *et al.*, 2007; Sawada *et al.*, 2005). L'allevamento di una specie ittica assume un ruolo strategico ed esprime tutti i potenziali di sviluppo solo nel momento in cui si riesce a svincolare dal prelievo in natura. Il controllo della riproduzione è la priorità in acquacoltura, infatti tale meccanismo è alla base della rinnovabilità della vita e quindi dei prodotti biologici intesi come risorse. Una risorsa rinnovabile è tale se può consentire un prelievo con continuità nel tempo, dunque se può ricostituire correttamente la componente prelevata.

Le prime specie marine ad essere allevate sono state le specie eurialine con tecniche di allevamento inizialmente di tipo estensivo all'interno delle lagune per poi arrivare a forme altamente intensive in vasche a terra o in gabbie a mare (Cataudella & Bronzi, 2001). Tali specie sono per definizioni animali tolleranti (eurieci) alle variazioni di una serie di parametri abiotici e biotici e quindi risentono meno dello stress dovuto alla cattura, al confinamento, alla stabulazione ad alte densità e ad una dieta differente rispetto al normale (Jobling, 1995). Questo ha consentito di chiudere il ciclo produttivo in tempi relativamente brevi. I tonni, al contrario, sono pesci stenoeici che hanno sviluppato nel corso di migliaia di anni una serie di specializzazioni e adattamenti per vivere in mare aperto e per compiere notevoli migrazioni per scopi trofici, ma soprattutto per scopi riproduttivi (Graham & Dickson 2001). Questa e altre ricerche (Corriero *et al.*, 2007) hanno dimostrato che la cattività, sia breve che prolungata, ha l'effetto di arrestare la maturazione della gonade, riducendo i livelli degli ormoni che regolano la riproduzione, e di bloccare il processo di ovulazione e deposizione. Un altro Teleosteo che mostra grandi deficienze riproduttive in condizione di allevamento è l'anguilla, nonostante sia una specie eurialina (Fontane, 1975). In comune con il tonno l'anguilla ha l'esigenza di compiere ampie migrazioni a scopo riproduttivo, il lungo tragitto e la specificità delle aree di deposizione in entrambi i pesci sembrano due fattori importanti per la maturazione finale della gonade e per innescare lo stimolo della deposizione.

Nel tonno, fino a questo momento sono state adottate due strategie differenti per superare questi ostacoli:

- In Giappone, dove i primi tentativi di allevamento del tonno del Pacifico sono iniziati nel 1970, giovanili del peso medio di circa 1 kg sono stati pescati e trasferiti inizialmente in ampie gabbie e successivamente, con l'aumento delle dimensioni dei pesci, in insenature naturali artificialmente confinate. Dopo 9 anni di allevamento è stato registrato il primo evento di deposizione spontanea e 6 anni dopo i tonni della prima generazione, cresciuti in cattività, si sono riprodotti spontaneamente chiudendo il

ciclo riproduttivo (Kumai, 1998; Sawada *et al.*, 2005). Questa strategia prevede lunghi periodi di adattamento “domesticazione” e la selezione nel tempo di riproduttori che meglio si adattano ad una condizione di cattività.

- In Europa, dove la specie bersaglio è il tonno rosso Atlantico e l'allevamento è cominciato solo alla fine degli anni novanta, non è stato ancora registrato alcun evento di deposizione spontanea e gli unici eventi di deposizione sono avvenuti a seguito di prove di somministrazioni ormonali di GnRHa su animali mantenuti in gabbia da 3 anni (Mylonas *et al.*, 2007).

Sebbene fino ad ora la prima strategia abbia prodotto risultati nettamente migliori in termini numerici di uova raccolte, il suo limite maggiore sta nella difficoltà di previsione dell'evento riproduttivo. Gli eventi di deposizione spontanea che si sono verificati in Giappone, infatti sono avvenuti in modo sporadico e non ripetitivo nel corso delle stagioni (Sawada *et al.*, 2005). La messa a punto di un protocollo ormonale efficace, sebbene si presenti come una via più complessa, offre migliori garanzie nella gestione della riproduzione di un parco di riproduttori ed è in grado di ridurre il tempo di cattività necessario per ottenere un evento riproduttivo.

Nell'eventualità in cui venisse messa a punto la tecnica di riproduzione si aprirebbero opportunità di sviluppo teoricamente illimitate. Nel caso del tonno rosso l'elevato numero di uova che una femmina può produrre, e le elevate sopravvivenze che le tecnologie possono consentire, potrebbero sostenere la produzione di milioni di giovani individui, i quali in poco più di un anno potrebbero trasformarsi in centinaia di tonnellate di prodotto vendibile. Questo scenario se da un certo punto di vista è sicuramente esaltante e di prospettiva, dall'altro deve far riflettere sulle implicazioni che si avrebbero sull'ambiente e sugli stessi mercati.

Il fatto che poche coppie di animali potrebbero sostenere da sole la produzione di milioni di avannotti, tra loro tutti molto simili e con bassa variabilità genetica, mette in luce come l'evento riproduttivo sia la fase più delicata per un'acquacoltura responsabile. L'eventualità che avvenga una fuga è tutt'altro che remota visto che verrebbero allevati in gabbie a mare, e si verrebbero a creare i presupposti per una ibridazione con le popolazioni naturali e quindi la possibilità di erodere le caratteristiche genetiche delle popolazioni di origine che sono oltretutto già fortemente minacciate. Una delle modalità teoriche per evitare i possibili danni legati agli eventi di fuga sarebbe quella di produrre pesci sterili, il che però andrebbe in contraddizione con il disegno di disporre di pesci da allevamento con linee genetiche selezionate in modo da permettere un sistema di produzione ottimizzato (accrescimento più rapido, resistenza alle malattie, ecc.). La seconda via da percorrere sarebbe di produrre pesci con caratteristiche il più possibile simili ai selvatici. Per ottenere questo risultato bisognerebbe affiancare ad una produzione di quantità anche una di qualità come suggerisce il CCPR, all'art. 9. Punto 9.3.3

(FAO, 1995), non considerando come indice esclusivo di successo riproduttivo il numero di giovanili prodotti. Lo sviluppo di tecniche di riproduzione controllata responsabili devono tener conto di alcuni aspetti di produzione di qualità: aumento delle performances dei riproduttori e della qualità dei gameti, utilizzo di un alto numero di riproduttori al fine di aumentarne la variabilità genetica, creazione di condizioni di allevamento idonee che non producano alterazioni macroscopiche del fenotipo e di gravi deformazioni negli avannotti allevati, limitazione degli impatti ambientali mantenendo densità adeguate in gabbia, utilizzando mangimi formulati in maniera corretta e limitando l'uso di antibiotici e chemioterapici utilizzati in molte avannotterie a scopo profilattico fin dalle prime fasi di allevamento larvale.

La messa a punto delle tecniche di riproduzione e allevamento del tonno apre una serie di prospettive nuove dal punto di vista economico che richiedono regolamentazione. Sarà importante che il mercato premi le produzioni di qualità, in quanto l'elevata disponibilità della risorsa sul mercato implicherebbe inevitabilmente un'abbassamento dei prezzi, cosa che per altro già sta avvenendo con l'attuale espansione degli impianti di ingrasso, condizionando seriamente sia la pesca che gli stessi acquacoltori. Sarà utile l'introduzione di un marchio di qualità di filiera. Una possibile strategia potrebbe essere quella di puntare sullo sviluppo del mercato locale con iniziative volte alla promozione della tipicità attraverso la promozione di un marchio di qualità, l'organizzazione di eventi ecc. Solo diversificando, infatti, sarà possibile attenuare i rischi legati all'incertezza ed alla variabilità nel prezzo di vendita del prodotto, determinati attualmente da un mercato unico di riferimento, quello giapponese.

In conclusione se l'acquacoltura del tonno rosso sarà gestita in modo responsabile e sostenibile, potrà offrire opportunità per "costruire" con le buone tecnologie e supportata dalle conoscenze scientifiche di base, il meglio per l'economia, per la salute umana e per l'ambiente.

RINGRAZIAMENTI

Voglio dedicare questa tesi ad una persona straordinaria e a cui forse, proprio a causa di questo lavoro, non sono potuto stare vicino nel momento in cui ne aveva più bisogno:

mia NONNA ANNA,

ci manchi tanto e ti vorremo sempre bene.

In primo luogo devo dire grazie al Prof. Stefano Cataudella, che mi ha dato l'opportunità di vivere un'esperienza incredibile, per me la realizzazione di un sogno.

Un ringraziamento speciale va a Valerio, per aver vissuto con me tutti i momenti esaltanti di questa avventura, dal nostro primo incontro con i tonni fino a quando, partendo da Vibo, abbiamo riportato a casa 20 kg di pesce ciascuno.

Grazie al Capitano, senza di lui il primo anno non sarebbe stato lo stesso, a Corrado che si è dimostrato un vero amico sin dal primo giorno che sono arrivato ai Casali, e a tutte le persone conosciute a Vibo Marina che ora posso chiamare amici. Un ringraziamento va al gruppo di sommozzatori: Andrea, Valerio, Angelo, Peppe di Reggio, Erjan, Charly ed in particolare a Marco, un folle dalla forza, resistenza e simpatia fuori dal comune.

Molte grazie alla Dott.ssa Clara Boglione, Irene Ferrante, Emi Castaldi e Domitilla Pulcini che mi hanno aiutato nella stesura e revisione della tesi.

Difficile è ringraziare a sufficienza i miei genitori, che rappresentano per me un punto di riferimento continuo e mi aiutano nelle scelte difficili che si presentano nella vita.

Infine devo dire grazie alla persona che da 10 anni è la mia compagna di vita, perché mi ha sempre dimostrato il suo amore consentendomi di vivere tante esperienze nonostante queste implicassero lunghi periodi di separazione.

BIBLIOGRAFIA

Abascal, F.J., Megina, C., Medina, A., 2004. Testicular development in migrant and spawning bluefin tuna (*Thunnus thynnus* (L.)) from the eastern Atlantic and Mediterranean. Fish. Bull. 102: 407–417.

Aguado F., Martinez F.J., Garcia-Garcia B., 2004. *In vivo* total nitrogen and phosphorous digestibility in atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) under industrially intensive fattening conditions in Southest Spain Mediterranean costal waters. Acquac. Nutrit. 10: 413-419.

Almendras, J.M., Duenas, C., Nacario, J., Sherwood, N.M., Crim, L.W., 1988. Sustained hormone release: III. Use of gonadotropin releasing hormone analogues to induce multiple spawnings in sea bass, *Lates calcarifer*. Aquaculture 74: 97–111.

Alvarado-Bremer, J.R., Naseri, I. & Ely, B., 1997. Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. Journal of Fish Biology 50: 540–554.

Baglin R.E. Jr, 1982. Reproductive biology of western Atlantic bluefin tuna. Fishery bulletin 80: 121-134.

Barbaro A., Francescon Bertotto D., Bozzato A., Di Maria, I., Patarnello P., Furlan F., Colombo L., 2002. More effective induction of spawning with long-acting GnRH agonist in the shi drum, *Umbrina cirrosa* L. (Sciaenidae, Teleostei), a valuable candidate for Mediterranean mariculture. J. Appl. Ichthyol. 18: 192–199.

Barbaro, A., Francescon, A., Bozzato, G., Merlin, A., Belvedere, P., Colombo, L., 1997. Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by long-acting GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning. Aquaculture 154: 349–359.

Barbieri, R.L., 1992. Clinical applications of GnRH and its analogues. Trends Endocrinol. Metab. 3, 30–34.

Barbieri, R.L., Hornstein, M.D., 1999. Assisted reproduction—*in vitro* fertilization success is improved by ovarian stimulation with exogenous gonadotropins and pituitary suppression with gonadotropin-releasing analogues. Endocr. Rev. 20: 249–252.

Bartlett, S.E., and Davidson, W.S., 1991. Identification of *Thunnus* tuna species by the polymerase chain reaction and direct sequence analysis of their mitochondrial cytochrome b genes. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 48: 309–317.

Battaglione, S.C., Selosse, P.M., 1996. Hormone-induced ovulation and spawning of captive and wild broodfish of the catadromous Australian bass, *Macquaria novemaculeata* (Steindachner), (Percichthyidae). Aqua. Res. 27: 191–204.

Bell, J.D., Lyle, J.M., Bulman, C.M., Graham, K.J., Newton, G.M., Smith, D.C., 1992. Spatial variation in reproduction, and occurrence of non reproductive adults, in orange roughy,

Hoplostethus atlanticus Collett (Trachichthyidae), from south-eastern Australia. J. Fish Biol., 40: 107-122.

Berlinsky, D.L., William, K., Hodson, R.G., Sullivan, C.V., 1997. Hormone induced spawning of summer flounder *Paralichthys dentatus*. J. World Aquacult. Soc. 28: 79–86.

Berthelot, S., 1988. Etude sur les pêches maritimes dans la Méditerranée et l'océan. Jean-Pierre Debbane éditeur, Grenoble.

Billard, R., 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. Reprod. Nutr. Dev. 26: 877–920.

Billard, R., 1989. Endocrinology and fish culture. Fish Physiol. Biochem. 7: 49–58.

Billard, R., Reinaud, P., Hollebecq, M.G., Breton, B., 1984. Advancement and synchronization of spawning in *Salmo gairdneri* and *S. trutta* following administration of LRH-A combined or not with pimozide. Aquaculture 43: 57–66.

Block, B.A., Dewar, H., Blackwell, S.B., Williams, T.D., Prince, E.D., Farwell, C.J., Boustany, A., Teo, S.L.H., Seitz, A., Walli, A., Fudge, D., 2001. Migratory movements, depth preferences, and thermal biology of Atlantic bluefin tuna. Science 293: 1310–1314.

Block, B.A., Teo, S.L.H., Walli, A., Boustany, A., Stokesbury, M.J.W., Farwell, C.J., Weng, K.C., Dewar, H., Williams, T.D., 2005. Electronic tagging and population structure of Atlantic bluefin tuna. Nature 434: 1121–1127

Borg, B., 1994. Androgens in teleost fish. Comp. Biochem. Physiol. 109C: 219-245.

Borsellino, V., D'Amico, M., 2004. Analisi tecnico economica e del mercato del tonno rosso allevato in Sicilia. XXXXI Convegno SIDEA Gruppo di lavoro: "Economia e Politica del settore ittico".

Breton, B., Weil, C., Sambroni, E., Zohar, Y., 1990. Effects of acute versus sustained administration of GnRH α on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 91: 371–383.

Bromage, N., Jones, J., Randall, C., Thrush, M., Springate, J., Duston, J., Barker, G., 1992. Broodstock management, fecundity, egg quality and the timing of egg production in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture 100: 141–166.

Bronzi, P., Rampacci, M., Ugolini, R., 2001. L'acquacoltura intensiva. In: Acquacoltura responsabile. Cataudella S.; Bronzi P., Unimar-Uniprom: 330-336.

Broughton, R.E. and Gold, J.R., 1997. Microsatellite development and survey of variation in northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Mol. Mar. Biol. Biotechnol., 6: 308-314.

Brown, L., Siemer, L., Munoz, C., Edelman, E., Langer, R., 1986. Controlled release of insulin from polymer matrices: control of diabetes in rats. Diabetes 35: 692–697.

Carlsson, J., McDowell, J.R., Díaz-Jaimes, P., Carlsson, J.E.L., Boles, S.B., Gold, J.R. and Graves, J.E., 2004. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of Atlantic bluefin tuna

(*Thunnus thynnus thynnus*) population structure in the Mediterranean Sea. *Mol. Ecol.*, 13: 3345-3356.

Carolsfeld, J., Sherwood, N.M., Kreiberg, H., Soawer, S.A., 1988. Induced sexual maturation of herring using GnRH α 'quick-release' cholesterol pellets. *Aquaculture* 70: 169–181.

Carrillo, M., Zanuy, S., Prat, F., Cerda, J., Ramos, J., Mañanos, E., Bromage, N., 1995. Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *In*: Bromage, N.R., Roberts, R.J. (Eds.), *Broodstock Management and Egg and Larval Quality*. Blackwell, Oxford, pp. 138–168.

Catarci, C., 2004. *World Tuna Markets*. Roma, Italy, FAO

Cataudella, S., 2001. Economia ed ecologia aziendale. *In*: Cataudella, S, Bronzi, P, (Ed), *Acquacoltura Responsabile: Verso le Produzioni Acquatiche del Terzo Millennio*. Unimar, Uniprom, pp. 257-270.

Cataudella, S., Bronzi, P., 2001. *Acquacoltura Responsabile: Verso le Produzioni Acquatiche del Terzo Millennio*. Unimar, Uniprom, pp. 257-270.

Chang, C.F., Yueh, W.S., Lee, M.F., Schally, A.V., 1995. A microencapsulated analog of LH-RH accelerates maturation but without stimulating sex reversal in the protandrous black porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Reprod. Nutr. Dev.* 35: 339–349.

Chasin, M., Langer, R., 1990. Biodegradable polymers as drug delivery systems. *In*: Swarbrick, J. (Ed.), *Drugs and the Pharmaceutical Sciences*, vol. 45, Marcel Dekker, New York, pp. 347–365.

Chen, K.S., Crone, P., Hsu, C.C., 2006. Reproductive biology of female Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* from south-western North Pacific Ocean. *Fish. Sci.* 72: 985–994.

Chow, S. & Kishino, H. 1995. Phylogenetic relationships between tuna species of the genus *Thunnus* (Scombridae, Teleostei): inconsistent implications from morphology, nuclear and mitochondrial genomes. *Journal of Molecular Evolution* 41: 741–748.

Chow, S. and Inoue, S., 1993. Intra- and interspecific restriction fragment length polymorphism in mitochondrial genes of *Thunnus* tuna species. *Bulletin of National Research Institute of Far Seas Fisheries*, 30: 207–225.

Chow, S., Nohara, K., Tanabe, T., Itoh, T., Tsuji, S., Nishikawa, Y., Ueyanagi, S. & Uchikawa, K. 2003. Genetic and morphological identification of larval and small juvenile tunas (Pisces, Scombridae) caught by a mid-water trawl in the western Pacific. *Bulletin of Fisheries Research Agency* 8: 1–14.

Chow, S., T. Nakagawa, N. Suzuki, H. Takeyama, Matsunaga T. 2006. Phylogenetic relationships among *Thunnus* species inferred from rDNA ITS1 sequence. *J. Fish Biology* 68 (Supplement A): 24-35.

CIRSPE - Centro Italiano Ricerche e Studi Sulla Pesca (2007).
http://www.cirspe.it/foto_news/31_03-02-07%20tonno%20%20-cirspe-ansa.pdf.

Clark, T.B., Ma, L., Saillant, E. and Gold, J.R., 2004. Microsatellite DNA markers for population-genetic studies of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus*) and other species of the genus *Thunnus*. *Mol. Ecol. Notes*, 4: 70-73.

Claro, R., 1994. Características generales de la ictiofauna. *In*: R. Claro (ed.) *Ecología de los peces marinos de Cuba*. Instituto de Oceanología Academia de Ciencias de Cuba and Centro de Investigaciones de Quintana Roo. 55-70.

Collette, B. B. & Nauen, C. E. 1983. *Fao species catalogue. Vol 2. Scombrids of the World. An annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos and related species known to date*. Rome: FAO Fish Synop. 125 (2). 137 p.

Collette, B. B. 1979. Adaptations and systematics of the mackerels and tunas. *In*: *The Physiological Ecology of Tunas* (Sharp, G. D. & Dizon, A. E., eds), pp. 7–39. New York: Academic Press.

Collette, B. B., Reeb, C. & Block, B. A. 2001. Systematics of the tunas and mackerels (Scombridae). *In*: *Tuna Physiology, Ecology, and Evolution* (Block, B. A. & Stevens, E. D., eds), pp. 1–33. San Diego, CA: Academic Press.

Collette, B.B., 1986. Scombridae (including Thunnidae, Scomberomoridae, Gasterochismatidae and Sardidae). *In*: P.J.P. Whitehead, M-L Bauchot, J-C. Hureau, J. Nielsen and E. Tortonese (eds.). *Fishes of the north-eastern Atlantic and the Mediterranean*. Unesco, Paris. 2: 981-997.

Copeland, P.A., Thomas, P., 1989. Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulates*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *Gen. Comp. Endocrinol.* 74: 474–483.

Corriero, A., De Santis, S., De Florio, M., Acone, F., Bridges, C.R., De la Serna, J. M., Megalofonou, P., De Metrio, G. 2003. Histological investigation on the ovarian cycle of the eastern Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *J. Fish. Biol.* 63: 108-119.

Corriero, A., Medina, A., Mylonas, C.C., Abascal, F.J., Deflorio, M., Aragón, L., Bridges, C.R., Santamaria, N.a, Heinisch, G., Vassallo-Agius R., Belmonte, A., Fauvel, C., Garcia, A., Gordin, H., De Metrio, G. 2007. Histological study of the effects of treatment with gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRH_a) on the reproductive maturation of captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *Aquaculture*, in press. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.08.030

Covino, D. 2003. “Settore ittico e globalizzazione degli scambi: il ruolo della cooperazione internazionale” in *Atti del XL Convegno Annuale SIDEA*. Padova, 18-20 Settembre 2003.

Coward K. & Bromage N. R., 1998. Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zillii*. *Journal of Fish Biology* 53: 285–302. doi:10.1006/jfbi.1998.0701.

Crim, L.W., Bettles, S., 1997. Use of GnRH analogues in fish culture. *In*: Fingerman, M., Nagabhushanam, R., Thompson, M.F. (Eds.), *Recent Advances in Marine Biotechnology*, Vol. 1: Endocrinology and Reproduction. Oxford and IBH Publishing, New Delhi, pp. 369–382.

Crim, L.W., Nestor Jr., J.J., Wilson, C.E., 1988a. Studies of the biological activity of LHRH analogs in the rainbow trout, landlocked salmon, and the winter flounder. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 372–382.

Crim, L.W., Sherwood, N.M., Wilson, C.E., 1988b. Sustained hormone release. II. Effectiveness of LHRH analog (LHRHa) administration by either single time injection or cholesterol pellet implantation on plasma gonadotropin levels in a bioassay model fish, the juvenile rainbow trout. *Aquaculture* 74: 87–95.

Crim, L.W., Sutterlin, A.M., Evans, D.M., Weil, C., 1983b. Accelerated ovulation by pelleted LHRH analogue treatment of spring-spawning rainbow trout (*Salmo gairdneri*) held at low temperatures. *Aquaculture* 35: 299–307.

Dabrowski, K., Ciereszko, A., Ramseyer, L., Culver, D., Kestemont, P., 1994. Effects of hormonal treatment on induced spermiation and ovulation in the yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquaculture* 120: 171–180.

De Leeuw, R., Van't Veer, C., Smit-Van Dijk, W., Goos, H.J.T., Van Oordt, P.G.W.J., 1988. Binding affinity and biological activity of gonadotropin-releasing hormone agonists in the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture* 71: 119–131.

De Metrio, G., Arnold, G. P., Block, B. A., de la Serna, J. M., Deflorio, M., Cataldo, M., Yannopoulos, C., Megalofonou, P., Beemer, S., Farwell, C. & Seitz, A., 2002. Behaviour of post-spawning Atlantic bluefin tuna tagged with pop-up satellite tags in the Mediterranean and Eastern Atlantic. *ICCAT Collective Volume of Scientific Papers* 54: 415–424.

De Metrio, G., Corriero, A., Desantis, S., Zubani, D., Cirillo, F., Deflorio, M., Bridges, C.R., Eicker, J., De la Serna, J.M., Megalofonou, P., Kime, D.E., 2003. Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L.). *Marine Pollution Bulletin* 46: 358-361. doi: 10.1016/S0025-326X.

de Vlaming, V., 1983. Oocyte developmental pattern and hormonal involvements among teleosts. *In: Control processes in fish physiology.* Rankin J.C., Pitcher T.J., Duggan R.T. (eds.). Cromm Helm, London 176-199.

Deflorio, M., Aprea, A., Corriero, A., Santamaria, N., De Metrio, G., 2005. Incidental captures of sea turtles by swordfish and albacore longlines in the Ionian Sea. *Fish. Sci.* 71: 1010–1018.

Delesse, M.A., 1847. Procédé mécanique pour déterminer la composition des roches. *C.r. Acad. Sci. (Paris)* 25: 544.

Desse, J. & Desse-Berset, N, 1994. Strategies de peche au 8^{ème} millénaire: les poissons de Cap Andreas Kastros (Chypre). *In: Fouilles récentes à Khirokitia* (eds A. Le Brun). Editions Recherche sur Civilisations, Paris, pp. 335–360.

Di Natale, A., Mangano, A., Vassallo, R., Ajus., 2006. Blufin tuna (*Thunnus thynnus*) size composition in cages from the Tyrrhenian sea and the strait of Sicily in 2004. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 59(3): 851-857.

Directorate General for Fisheries, FAO, 2004. E.U. Tuna: A global fishing activity. *Fishing in Europe*, 23: 1-12.

Donaldson, E.M., 1973. Reproductive endocrinology of fishes. *Am. Zool.* 13: 909–927.

Donaldson, E.M., Hunter, G.A., 1983. Induced final maturation, ovulation and spermiation in cultured fishes. *In: Hoar, W.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Eds.), Fish Physiology. Reproduction*, vol. IXB, Academic Press, Orlando, FL, pp. 351–403.

Doumenge, F., 1996. Acquaculture of bluefin tuna. *Biologia Marina Mediterranea* 3: 258-288.

Doumenge, F., 1998 L'histoire des pêches thonières. *Collective Volume of Scientific Papers ICCAT 50*, 753–803.

Doumenge, F., 2000. La pêche en Méditerranée. *Centre d'Etudes et de Rencontres Méditerranéennes (CERM), Palavas-Les-Flots (France)*, 42 pp.

Eckert, 1985. *Fisiologia animale: meccanismi e adattamenti*. Zanichelli, Bologna.1

Edmunds, P.H. and Sammons, J.I., 1973. Similarity of genetic polymorphism of tetrazolium oxidase in bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the Atlantic coast of France and the western North Atlantic. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 30: 1031-1032.

Elizur, A., Meiri, I., Rosenfeld, H., Zmora, N., Knibb, W.R., Zohar, Y., 1995. Seabream gonadotropins: sexual dimorphism in gene expression. *In: Goetz, R., Thomas, P. (Eds.), Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 95, Austin, Texas*, pp. 13–15.

El-Kebir, N.K., Rodríguez-Cabello, C, Tawil, Y., 2002. Age estimation of bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) caught in traps in Libyan waters based in dorsal spine reading ICATT. *SCRS/2001/135. Collective Volume of Scientific Papers, ICCAT, 54 (2): 641-648.*

Elliot, N. G. & Ward, R. D., 1995. Genetic relationships of eight species of Pacific tunas (Teleostei, Scombridae) inferred from allozyme analysis. *Marine and Freshwater Research* 46: 1021–1032.

Ely, B., Stoner, D.S., Alvarado Bremer, J.R. *et al.*, 2002. Analyses of nuclear IdhA gene and mtDNA control region sequences of Atlantic Northern bluefin tuna populations. *Mar. Biotechnol.*, 4: 583-588.

Emerson, L.S., Greer Walker, M. & Withames P.R., 1990. A stereological method for estimating fish fecundity. *Journal of Fish Biology* 36: 721–730.

Emons, G., Schally, A.V., 1994. The use of luteinizing hormone releasing hormone agonists and antagonists in gynaecological cancers. *Hum. Reprod.* 9: 1364–1379.

FAO Fisheries Department, 1997. *Aquaculture development. FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries, No 5, Rome, FAO*, 40 p.

FAO Fishery Resources Division, 1999. Indicators for sustainable development of marine capture fisheries. FAO Technical Guidelines for Responsible Fisheries, No 8, Rome, FAO, 68 p.

FAO, 1995. Code of Conduct for Responsible Fisheries. Rome, FAO, 41 p.

FAO, 2000. The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome, FAO.

FAO, 2002. The State of World Fisheries and Aquaculture: 2002. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations. pp. 124.

FAO, 2004. The State of World Fisheries and Aquaculture: 2004. Rome, Italy, Food and Agriculture Organization of the United Nations. pp. 153.

FAO, 2005. Report of the third meeting of the Ad Hoc GFCM/ICCAT working group on sustainable bluefin tuna farming/fattening practices in the Mediterranean. Rome, 16–18 March 2005. FAO Fisheries Report No. 779. FAO, Rome. 108 p.

Farley, J.H., Davis T.L.O., 1998. Reproductive dynamics of southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii*. Fishery Bulletin 96: 223–236.

Farwell, C.J. 2003. Management of captive tuna: Collection and transportation, holding facilities, nutrition, growth and water quality, pp. 65-69. *In: Cahiers Options Méditerranéennes*, vol. 60: Domestication of the Bluefin Tuna *Thunnus thynnus thynnus* (C.R. Bridges, H. Gordin, and A. Garcia, Eds.). Zaragoza, Spain, CIHEAM, Istituto Agronomico de Zaragoza.

Favero, R.J., Cruz, L.C., Kesler, D.J., 1995. The effect of constant delivery of gonadotropin releasing hormone on fertility of cattle. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 21: 2377–2384.

Fernandez-Delgado, C., Hernando, J.A., Herrera, M. & Bellido, M., 1988. Life-history Patterns of the sandsmelt *Atherina boyeri* Risso, 1810 in the Estuary of the Guadalquivir river, Spain. *Est., Coast. Shelf Sci.*, 27: 697-706.

Fish Farming International, 2006. Bluefin breakthrough! <http://www.fishfarminginternational.com>, 01 October 2006.

Fontaine, M., 1975. Physiological mechanisms in the migration of marine and amphihaline fish. *Adv. Mar. Biol.* 13: 241–355.

Fontenele, O., 1955. Injecting pituitary (hypophyseal) hormones into fish to induce spawning. *Prog. Fish-Cult.* 18: 71–75.

Forster, J., 1999. Aquaculture chickens, salmon: a case study. *World Aquacult.* 30 (3): 33–40.

Fossi, M. C., Casini, S., Marsili, L., Neri, G., Mori, G., Ancora, S., Moscatelli, A., Ausili, A., Notarbartolo-di-Sciara, G. 2002. Biomarkers for endocrine disruptors in three species of Mediterranean large pelagic fish. *Marine Environmental Research* 54: 667-671.

Froese R. and D. Pauly. Editors., 2006. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (10/2006).

Fromentin, J.M., Powers, J.E., 2005. Atlantic bluefin tuna: population dynamics, ecology, fisheries and management. *Fish and Fisheries* 6: 281–306.

Fujino, M., Kobayashi, S., Obayashi, M., Shinagawa, S., Fukuda, T., Kitada, C., Nakayama, R., Yamazaki, I., White, W.F., Rippel, R.H., 1972. Structure-activity relationships in the C-terminal part of luteinizing hormone releasing hormone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 49: 863–869.

Gibbs, R. H. Jr. & Collette, B. B., 1967. Comparative anatomy and systematics of the tunas, genus *Thunnus*. U. S. Fish and Wildlife Service Fishery Bulletin 66: 65–130.

Gilkey, J.C., 1981. Mechanisms of fertilization in fish. *Amer. Zool.* 21: 359-375

Goetz, F.W., 1983. Hormonal control of oocyte final maturation and ovulation in fish. *In: Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M. (eds.), Fish Physiology. Vol. IX, Part B: Reproduction.* Academic Press, Orlando, pp. 117-170.

Gordin, H., Zohar, Y., 1978. Induced spawning of *Sparus aurata* (L.) by means of hormone treatments. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 18: 985–990.

Goren, A., Zohar, Y., Fridkin, M., Elhanati, E., Koch, Y., 1990. Degradation of gonadotropin releasing hormone in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: I. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79: 291–305.

Gothilf, Y., Munoz-Cueto, J.A., Sagrillo, C.A., Selmanoff, M., Chen, T.T., Kah, O., Elizur, A., Zohar, Y., 1996. Three forms of gonadotropin-releasing hormones in a perciform fish (*Sparus aurata*): cDNA characterization and brain localization. *Biol. Reprod.* 55: 636–645.

Gothilf, Y., Zohar, Y., 1991. Clearance of different forms of GnRH from the circulation of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, in relation to their degradation and bioactivities. *In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds.), Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 91, Sheffield, pp. 35–37.*

Graham, J.B., Dickson, K.A., 2001. Anatomical and physiological specializations for endothermy. *In: Tuna. Physiology, Ecology, and Evolution (eds B.A. Block and E.D. Stevens).* Academic Press, San Diego, CA, pp. 121–165.

Greer Walker, M., Withames, P.R. & Bautista de los Santos, I., 1994. Is the fecundity of the Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*: Scombridae) determinate? *Sarsia* 79: 13–26.

Habibi, H.R., Marchant, T.A., Nahorniak, C.S., Van Der Loo, H., Peter, R.E., Rivier, J.E., Vale, W.W., 1989. Functional relationship between receptor binding and biological activity for agonists of mammalian and salmon gonadotropin-releasing hormones in the pituitary of goldfish (*Carassius auratus*). *Biol. Reprod.* 40: 1152–1161.

Han, K. & Ely, B., 2002. Use of AFLP Analyses to Assess Genetic Variation in *Morone* and *Thunnus* Species. *Mar. Biotechnol.*, 4: 141-145.

Harmin, S.A., Crim, L.W., 1993. Influence of gonadotropin hormone-releasing hormone analog (GnRH-A) on plasma sex steroid profiles and milt production in male winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum). *Fish Physiol. Biochem.* 10: 399–407.

Hassin, S., de Monbrison, D., Hanin, Y., Elizur, A., Zohar, Y., Popper, D.M., 1997. Domestication of the white grouper, *Epinephelus aeneus* L. Growth and reproduction. *Aquaculture* 156: 309-320.

Helfman, G.S.; Collette, B.; Facey, D.E. 1997. The diversity of fishes. Blackwell Science, Massachusetts, USA, 529 p.

Hodson, R., Sullivan, C.V., 1993. Induced maturation and spawning of domestic and wild striped bass, *Morone saxatilis* (Walbaum), broodstock with implanted GnRH analogue and injected hCG. *Aquacult. Fish. Manage.* 24: 389–398.

Holland, M.C.H., Gothilf, Y., Meiri, I., King, J.A., Okuzawa, K., Elizur, A., Zohar, Y., 1998a. Levels of the native forms of GnRH in the pituitary of the gilthead seabream, *Sparus aurata*, at several characteristic stages of the gonadal cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 394–405.

Holland, M.C.H., Hassin, S. and Zohar, Y., 1998b. Effects of long-term testosterone, gonadotropin-releasing hormones agonist, and pimozide treatments on gonadotropin II levels and ovarian development in juvenile female striped bass (*Morone saxatilis*) *Biol. Reprod.* 59: 1153–1162.

Holland, M.C.H., Hassin, S. and Zohar, Y., 2000a. Gonadal development and plasma steroid levels during pubertal development in captive-reared striped bass, *Morone saxatilis*. *J. Exp. Zool.* 286: 49-63

Holland, M.C.H., Hassin, S. and Zohar, Y., 2000b. Seasonal variations in the levels of the three native forms of GnRH during juvenile and pubertal development in the striped bass, *Morone saxatilis*. In: Norberg, B., Kjesbu, O.S., Taranger, G.L., Andersson, E. and Stefansson, S.O. (eds.), *Fish reproductive Physiology*. University of Bergen, Bergen, Norway, pp. 56-58.

Horwood, J.W., Bannister, C.A., Howlett, G.J., 1986. Comparative fecundity of North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.) *Proc. R. Soc. Lond. B*, 228: 401-431.

Houssay, B.A., 1930. Accion sexual de la hipofisis en los peces y reptiles. *Rev. Soc. Arg. Biol.* 106: 686–688.

Hsu, T.T.P., Langer, R., 1985. Polymers for the controlled release of macromolecules: Effect of molecular weight of ethylene–vinyl acetate copolymer. *J. Biomed. Mater. Res.* 19: 445–460.

Hunter, J. R., Macewicz, B. & Sibert, J. R., 1986. The spawning frequency of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, from the South Pacific. *Fishery Bulletin* 84: 895–903.

Hunter, J.R., Goldberg, S.R., 1980. Spawning incidence and batch fecundity in northern anchovy, *Engraulis mordax*. *Fish Bull. U.S.*, 77: 641-652.

Hunter, J.R., Macewicz, B.J., 1985. Measurement of spawning frequency in multiple spawning fish. *In: An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: Application to the Northern anchovy, *Engraulis mordax**. R. Lasker (ed.). U.S. Dep. Comm., NOAA Tech. Rep., 36: 79-93.

Hunter, J.R.; Macewicz, B.J.; Kimbrell, C.A., 1992. Fecundity, spawning, and maturity of female Dover Sole, *Microstomus pacificus*, with an evaluation of assumptions and precision. *Fish. Bull., U.S.*, 90: 101-128.

ICCAT, 2005. <http://www.iccat.es>

ICES, 1997. Report of the working group mackerel horse Mackerel Eggs Surveys. ICES C.M. 1997/H:4.

Iverson, R.T., Nakamura, E.L., Gooding, R.M. 1970. Courting behaviour of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 99: 93.

Jackson, L.F. and Sullivan C.V., 1995. Reproduction of white perch: The annual gametogenic cycle. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 124: 563-577.

Jalabert, B., Fostier, A., Breton, B. and Weil, C. 1991. Oocyte maturation in vertebrates. *In: Pang, P.K.T. and Schreiberman, M.P. (eds.), Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implication. Vol. 4, Part A, Reproduction, Academic Press, Inc., San Diego, California, pp. 23-90*

Jobling M., 1995. *Environmental biology of fishes*. Chapman & Hall.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., Sumpter, J.P., 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. *Environmental science and Technology* 32: 2498-2506.

Johnson, L.L., Misitano, D., Sol, S.Y., Nelson, G.M., French, B., Ylitalo, G.M., Hom, T. 1998. Contaminant effects on ovarian development and spawning success in rock sole from Puget Sound, Washington, *Trans. Am. Fish. Soc.*, 127: 375-392.

Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., and Kobayashi, M., 1998. GTH II but not GTH I induces final oocyte maturation and development of maturational competence of oocytes of red seabream *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 80-88.

Kaji, T., Tanaka, M., Oka, M., Takeuchi, H., Ohsumi, S., Teruya, K., Hirokawa, J., 1999. Growth and morphological development of laboratory-reared yellowfin tuna *Thunnus albacares* larvae and early juveniles, with special emphasis on the digestive system. *Fisheries Sci.*, 65: 700-707.

Karakulak, S., Oray, I., Corriero, A., De florio, M., Santamaria, N., Desantis, S., De Metrio, G., 2004. Evidence of a spawning area for the bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) in the eastern Mediterranean. *J. Appl. Ichthyol.* 20: 318-320.

King, W.V., Thomas, P., Harrell, R.M., Hodson, R.G., Sullivan, C.V., 1994. Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 95: 178-191.

Kirk, R., 1987. A History of Marine Fish Culture in Europe and North America. Fishing News Books, Farnham, England, 192 pp.

Kjesbu, O.S., Klungsoyr J., Kryvi, H., Witthames, P.R., Greer Walker, M., 1991. Fecundity, atresia, and egg size of captive Atlantic cod (*Gadus morhua*) in relation to proximate body composition. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 53: 610-620.

Kjesbu, O.S., Witthames, P.R., Solemdal, P., Greer Walker, M., 1998. Temporal variation in the fecundity of Arcto-Norwegian cod (*Gadus morhua*) in response to natural changes in food and temperature. J. Sea Res., 40: 303-332.

Kjørsvik, E., Mangor-Jensen, A., Holmefjord, I., 1990. Egg quality in fishes. Adv. Mar. Biol. 26: 71-113.

Kobayashi, M., Amano, M., Kim, M.H., Yoshiura, Y., Sohn, Y.C., Suetake, H. and Aida, K., 1997. Gonadotropin-releasing hormone and gonadotropin in goldfish and masu salmon. Fish Physiol. Biochem. 17: 1-8.

Kraus, G., Muller, A., Trella, K., Koster, F.W., 2000. Fecundity of Baltic cod: temporal and spatial variation. J. Fish Biol., 56: 1327-1341.

Kucharczyk, D., Kujawa, R., Luczynski, M., Glogowski, J., Babiak, I., Wyszomirska, E., 1997. Induced spawning in bream, *Abramis brama* (L.), using carp and bream pituitary extract and hCG. Aquat. Res. 28: 139-144.

Kumai, H., 1998. Studies on bluefin tuna artificial hatching, rearing and reproduction. Nipp. Suisan Gakk., 64: 601-605 (In Japanese with English abstract)

La Mesa, M., Sinopoli, M., Andaloro, F., 2005. Age and growth rate of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* from the Mediterranean Sea (Sicily, Italy). Scientia Marina, 69 (2): 241-249.

Lam, T.J., 1982. Applications of endocrinology to fish culture. Can. J. Aquat. Fish. Sci. 39, 11-137.

Langer, R., 1991. Polymer implants for drug delivery in the brain. J. Controlled Release 16: 53-60.

Larsson, D.G.J., Mylonas, C.C., Zohar, Y., Crim, L.W., 1997. Gonadotropin releasing hormone-analogue (GnRH-A) advances ovulation and improves the reproductive performance of a cold-water batch-spawning teleost, the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). Can. J. Aquat. Fish. Sci. 54: 1957-1964.

Lasker, R. (ed.), 1985. An egg production method for estimating spawning biomass of pelagic fish: Application to the Northern anchovy, *Engraulis mordax*. U.S. Dep. Comm., NOAA Tech. Rep., 36: 55-58.

Le Gac, F., Blaise, O., Fostier, A., Le Bail, P.Y., Loir, M., Mourot, B., Weil, C., 1993. Growth hormone (GH) and reproduction: a review. Fish Physiol. Biochem. 11: 219-232.

- Le Gall, J. Y., 2004. *In: Marine fisheries gears, technics and methods*. Lavoisier Paris, 467 pp.
- Leclerc, G.M., Han, K.P., Leclerc, G.J., and Ely, B., 1999. Characterization of a highly repetitive sequence conserved among the North American *Morone* species. *Mar. Biotechnol.*, 1: 122–130.
- Lee, C.S., Tamaru, C.S., Kelley, C.D., 1988. The cost and effectiveness of CPH, hCG and LHRH-A on the induced spawning of grey mullet, *Mugil caphalus*. *Aquaculture* 73: 341-347.
- Lewis, D.H., 1990. Controlled release of bioactive materials from lactideryglycolide polymers. *In: Chasin, M., Langer, R. (Eds.), Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems*. Marcel Dekker, New York, pp. 1–41.
- Lin, H.R., Zhou, X.J., Van Der Kraak, G., Peter, R.E., 1991. Effects of gonadotropin-releasing hormone agonists and dopamine antagonists on gonadotropin secretion and ovulation in Chinese loach, *Paramisgurnus dabryanus*. *Aquaculture* 95: 139–147.
- Linard, B., Anglade, I., Bennani, S., Salbert, G., Navas, J.M., Bailhache, T., Pakde, F., Je'go, P., Valotaire, Y., Saligaut, C., Kah, O., 1995. Some insights into sex steroid feedback mechanisms in the trout. *In: Goetz, F.W., Thomas, P. (Eds.), Reproductive Physiology of Fish, 1995. Fish Symposium 95, Austin, Texas*, pp. 49–51.
- Lioka, C., Kani, K., Nhala, H., 2000. Present status and prospects of technical development of tuna sea-farming. *Cahiers Options Méditerranéennes*. 47: 275- 285.
- Livingston, M.E., Vignaux, M., Schofield, K.A., 1997. Estimating the annual proportion of nonspawning adults in New Zealand hoki, *Macruronus novaezelandiae*. *Fish. Bull. U.S.*, 95: 99-113.
- Lutcavage, M.E., Brill, R.W., Skomal, G.B., Chase, B.C., Howey, P. W., 1999. Results of pop-up satellite tagging of spawning size class fish in the Gulf of Maine: do North Atlantic bluefin tuna spawn in mid-Atlantic? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 173–177.
- Macer, C.T., 1974. The reproductive biology of the horse mackerel (*Trachurus trachurus* L.) in the North Sea and English Channel. *J. Fish Biol.*, 6: 415-438.
- Maggio, T., 2000. *Mattanza*. Perseus, Cambridge, MA.
- Malison, J.A., Procarione, L.S., Barry, T.P., Kapuscinski, A.R., Kayes, T.B., 1994. Endocrine and gonadal changes during the annual reproductive cycle of the freshwater teleost, (*Stizostedion vitreum*). *Fish Physiol. Biochem.* 13: 473–484.
- Manchado, M., Catanese, G. and Infante, C., 2004. Complete mitochondrial DNA sequence of the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus*. *Fish. Sci.*, 70: 68-73.
- Marchant, T.A., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., Peter, R.E., 1989. Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone releasing hormone in the goldfish. *Endocrinology* 124: 2509–2518.

Marsac, F., 1999. Changements hydroclimatiques observés dans l'Atlantique depuis les années 50 et impacts sur quelques stocks de thons et leur exploitation. Collective Volume of Scientific Papers ICCAT 49, 346–370.

Marshall, W., Bryson, S.E., Idler, D.R. 1989. Gonadotropin stimulation of K^+ secretion and Na^+ absorption by brook trout (*Salvelinus fontinalis*) sperm duct epithelium. Gen.Comp. Endocrinol. 75: 118-128.

Masuma, S., 2006. Maturation and spawning of bluefin tuna in captivity. Proceeding of the Kinki University International Symposium on Ecology and Aquaculture of Bluefin Tuna, 10-11 November, Amami Ohshima, Japan.

Masuma, S., Tezuka, N., Koiso, M., Jinbo, T., Takebe, T., Yamazaki, H., Obana, H., Ide, K., Nikaïdo, H., Imaizumi, H., 2006. Effects of water temperature on bluefin tuna spawning biology in captivity. Bull. Fish. Res. Agency (Suppl. 4), 157–172 (In Japanese, with English abstract).

Masuma, S., Tezuka, N., Obana, H., Suzuki, N., Nohara, K., Chow, S. 2003. Spawning ecology of captive bluefin tuna (*Thunnus thynnus orientalis*) inferred by mitochondrial DNA analysis. Bull. Fish. Res. Agen., 6: 9-14 (in Japanese, with English abstract).

Mather, F.J., Mason Jr, J.M. and Jones, A., 1995. Historical document: life history and fisheries of Atlantic bluefin tuna. NOAA Technical Memorandum NMFS-SEFSC-370, Miami, Fl, 165 pp.

Matsuyama M., Adachi S., Nagahama Y., Matsuura S., 1988. Diurnal rhythm of oocyte development and plasma steroid hormone levels in the female red sea bream, *Pagrus major*, during the spawning season. Aquaculture, 73: 357-372.

Matsuyama, M., Takeuchi, H., Kashiwagi, M., Hirose, K., Kagawa, H., 1995a. Induced gonadal development and spawning of immature red sea bream *Pagrus major* with LHRH-a administration in different ways during winter season. Fish. Sci. 61: 472–477.

Matsuyama, M., Yoneda, M., Takeuchi, H., Kagawa, H., Kashiwagi, M., Tabata, K., Nagahama, Y., Ijiri, S., Adachi, S. and Yamauchi, K., 1995b. Diurnal periodicity in testicular activity in the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries. Sci. 61: 17-23

May, A.W., 1967. Fecundity of Atlantic cod. J.Fish. Res. Board Can., 24: 1531-1551.

McLean, E., Parker, D.B., Warby, C.M., Sherwood, N.M., Donaldson, E.M., 1991. Gonadotropin release following oral delivery of luteinizing-releasing hormone and its superactive analogue (des-Gly¹⁰ [D-Ala⁶] LHRH ethylamide) to 17 β -oestradiol-primed coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* (Walbaum). J. Fish Biol. 38: 851–858.

Medina A., Abascal F. J., Megina C. & Garcia A., 2002. Stereological assessment of the reproductive status of female Atlantic northern bluefin tuna during migration to Mediterranean spawning grounds through the Strait of Gibraltar. Journal of Fish Biology 60: 203-217.

Minori, R., Tada, S., Arai, H. 2006. Overview of bluefin tuna husbandry in the aquarium with semi-closed system in Tokyo Sea Life Park. Proceedings of the Kinki University

International Symposium of Ecology and Aquaculture of Bluefin Tuna, 10-11 November 2006, Amami Ohshima, Japan.

Miura, T., Kasugai, T., Nagahama, Y., Yamauchi, K., 1995. Acquisition of potential for sperm motility *in vitro* in Japanese eel *Anguilla japonica* Fisheries Sci. 61: 533-534.

Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., Nagahama, Y., 1991. Hormonal induction of all stages of spermatogenesis *in vitro* in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88: 5774-5778.

Miyake, P.M., de la Serna, J.M., Natale, A.D., Farrugia, A., Kativic, I., Miyabe, N., Ticina, V., 2003. General review of bluefin tuna farming in the Mediterranean area. Collective volume of scientific papers. International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas/Recueil de documents scientifiques. Commission internationale pour la Conservation des Thonides de l'Atlantique/Coleccion de documentos científicos. Comision internacional para la Conservacion del Atun Atlantico [Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT/Recl. Doc. Sci. CICTA/Colecc. Doc. Cient. CICAA]. Vol. 55: no. 1, pp. 114-124.

Miyashita, S., Murata, O., Sawada, Y., Okada, T., Kubo, Y., Ishitani, Y., Seoka, M., Kumai, H., 2000. Maturation and spawning of cultured bluefin tuna *Thunnus thynnus*. Suisan Zoshoku 48: 475-488 (In Japanese, with English abstract).

Moberg, G.P., Watson, J.G., Doroshov, S., Papkoff, H., Pavlick, R.J. Jr., 1995. Physiological evidence for two sturgeon gonadotropins in *Acipenser transmontanus* *Aquaculture* 135: 27-39.

Munro, A.D., Scott, A.P., Lam, T.J., 1990. Reproductive Seasonality in Teleosts: Environmental Influences.

Murua, H., Rauss, G., Aborido-Rey, F., Witthames, P.R., Thorsen, A., Junquera, S., 2003. Procedures to estimate Fecundity of Marine Fish Species in Relation to their Reproductive Strategy. J. Northw. Atl. Fish. Sci. 33: 33-54.

Murua, H., Saborio-Rey, F., 2003. Female reproductive strategies of marine fish and their classification in the North Atlantic. J. Northw. Atl. Fish. Sci., 33: 23-31.

Mylonas, C.C., Bridges, C.R., Gordin, H., Belmonte Ríos, A., García, A., De la Gándara, F., Fauvel, C., Suquet, M., Medina, A., Papadaki, M., Heinisch, G., De Metrio, G., Corriero, A., Vassallo-Agius, R., Guzmán, J.M., Mañanos, E., Zohar, Y., 2007. Preparation and administration of gonadotropin-releasing hormone agonist (GnRHa) implants for the artificial control of reproductive maturation in captive-reared Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*). Rev. Fish. Sci. 15: 183-210.

Mylonas, C.C., Hinshaw, J.M., Sullivan, C.V., 1992. GnRHa-induced ovulation of brown trout (*Salmo trutta*) and its effects on egg quality. *Aquaculture* 106: 379-392.

Mylonas, C.C., Magnus, Y., Gissis, A., Klebanov, Y., Zohar, Y., 1997b. Reproductive biology and endocrine regulation of final oocyte maturation of captive white bass. J. Fish Biol. 51: 234-250.

Mylonas, C.C., Magnus, Y., Gissis, A., Klebanov, Y., Zohar, Y., 1996. Application of controlled-release, GnRHa-delivery systems in commercial production of white bass X striped bass hybrids (sunshine bass), using captive broodstocks. *Aquaculture* 140: 265–280.

Mylonas, C.C., Swanson, P., Woods III, L.C., Jonsson, E., Jonasson, J., Stefansson, S., Zohar, Y., 1993. GnRHa-induced ovulation and sperm production in striped bass, Atlantic and Pacific salmon using controlled release devices. Proceedings of the World Aquaculture Congress, Torremolinos, 3–7 June 1993, Spain.

Mylonas, C.C., Tabata, Y., Langer, R., Zohar, Y., 1995a. Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. *J. Controlled Release* 35: 23–34.

Mylonas, C.C., Woods III, L.C., Thomas, P., Schulz, R.W., Zohar, Y., 1998a. Hormone profiles of captive striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation, and long-term enhancement of milt production. *J. World Aquacult. Soc.* 29: 379–392.

Mylonas, C.C., Woods III, L.C., Thomas, P., Zohar, Y., 1998b. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) during post-vitellogenesis, and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRHa-delivery systems. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110: 276–289.

Mylonas, C.C., Woods III, L.C., Zohar, Y., 1997c. Cyto-histological examination of post-vitellogenesis and final oocyte maturation in captive-reared striped bass. *J. Fish Biol.* 50, 34–49.

Mylonas, C.C., Woods, L.C. III, Zohar, Y., 1997a. Cyto-histological examination of post-vitellogenesis and final oocyte maturation in captive-reared striped bass. *Journal of Fish Biology* 50: 34–49.

Mylonas, C.C., Zohar Y., 2001. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. Review in *Fish Biology and Fisheries* 10: 463-491.

Mylonas, C.C., Zohar, Y., 1995: Preparation and evaluation of GnRHa-loaded, polymeric delivery systems for the induction of ovulation and spermiation in cultured fish. In: *Proc Fifth International Symp Reproductive Physiology of Fish*. Goetz, F. W.; Thomas, P. (Eds.), Fish Symposium 95, Austin, TX. p. 130.

Nagahama, Y., 1983. The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, W.S., Randall, D.J. and Donaldson, E.M. (eds.), *Fish Physiology*. Vol. IX, Part A: Reproduction. Academic Press, Orlando, pp. 223-275.

Nagahama, Y., 1994. Endocrine control of gametogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 38: 217-229.

Nagahama, Y., Yoshikuni, M., Yamashita, M., Tanaka, M., 1994. Regulation of oocyte maturation in fish. In: Sherwood, N.M., Hew, C.L. (Eds.), *Molecular Endocrinology of Fish*. Fish Physiology, Vol. XIII. Academic Press, San Diego, California, pp. 393–439.

- Nagatu, Z., Hsiao, S.M., and Wallace, R.A., 1998. Effects of insulin-like growth factor-I on final oocyte maturation and steroid production in *Fundulus heteroclitus*. *Fish Physiol. Biochem.* 19: 13-21.
- Nemerson, D., Berkeley, S., Safina, C., 2000. Spawning site fidelity in Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus*: the use of size-frequency analysis to test for the presence of migrant east Atlantic bluefin tuna on Gulf of Mexico spawning grounds. *Fishery Bulletin* 98: 118-126.
- Nevo, E. (1978). Genetic variation in natural populations: patterns and theory. *Theor. Popul. Biol.*, 13: 121–177.
- Nishida, T., Tsuji, S., Segawa, K., 1998. Spatial data analyses of Atlantic bluefin tuna larval surveys in the 1994 ICCAT BYP. ICCAT Collective Volume of Scientific Papers 48: 107–110.
- Ohta, H., Kagawa, H., Tanaka, H., Okuzawa, K., Iimura, N., Hirose, K., 1997. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.* 17: 163–169.
- Ohta, H., Tanaka, H., 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 153: 123–134.
- Okada, H., Doken, Y., Ogawa, Y., Toguchi, H., 1994a. Preparation of three-month depot injectable microspheres of leuprorelin acetate using biodegradable polymers. *Pharm. Res.* 11: 1143–1147.
- Okada, H., Yamamoto, M., Heya, T., Inoue, Y., Kamei, S., Ogawa, Y., Toguchi, H., 1994b. Drug delivery using biodegradable microspheres. *J. Control. Release* 28: 121–129.
- Omeljaniuk, R.J., Shih, S.H., Peter, R.E., 1987. *In vivo* evaluation of dopamine receptor-mediated inhibition of gonadotropin secretion from the pituitary gland of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Endocrinol.* 144: 449–458.
- Oray, I.K., Karakulak, F.S., 2005. Further evidence of spawning of bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L., 1758) and the tuna species (*Auxis rochei* Ris., 1810, *Euthynnus alletteratus* Raf., 1810) in the eastern Mediterranean Sea: preliminary results of TUNALEV larval survey in 2004. *J. Appl. Ichthyol.* 21: 236-240.
- Ottolenghi, F., Silvestri C., Giordano P., Lovatelli A., New M.B., 2004. Capture-based Aquaculture. The fattening of eels, groupers, tunas and yellowtails. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Pagelson, G., Zohar, Y., 1992. Characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptors in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Biol. Reprod.* 47: 1004–1008.
- Palmer, D.D., Burrows, R.E., Robertson, O.H., Newman, H.W., 1954. Further studies on the reactions of adult blueback salmon to injected salmon and mammalian gonadotropins. *Prog. Fish-Cult.* 17: 99–107.

Pankhurst, N.W. 1994. Effects of gonadotropin releasing hormone analogue, human chorionic gonadotropin and gonadal steroids on milt volume in the New Zeland snapper, *Pagrus auratus* (Sparidae). *Aquaculture* 166: 163-177.

Pankhurst, N.W., and Thomas, P.M., 1998. Maintenance at elevated temperature delays the steroidogenic and ovulatory responsiveness of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* to luteinizing hormone releasing hormone analogue. *Aquaculture* 166: 163-177.

Pankhurst, N.W., Van der Kraak, G., 1997. Effects of stress on reproduction and growth of fish. *In: Fish stress and health in aquaculture*. G.K. Iwama, A.D. Pickering, J.P. Sumpter, C.B. Schreck eds., Cambridge - University press: 73-94.

Pankhurst, N.W., van der Kraak, G., Peter, R.E., 1986. Effects of human chorionic gonadotropin, DES-GLY¹⁰ (D-ALA⁶) LHRH-ethylamide and pimozide on oocyte final maturation, ovulation and levels of plasma sex steroids in the walleye (*Stizostedion vitreum*). *Fish Physiol. Biochem.* 1: 45-54.

Parauka, F.M., Troxel, W.J., Chapman, F.A., McBay, L.G., 1991. Hormone-induced ovulation and artificial spawning of Gulf of Mexico sturgeon (*Acipenser oxyrhynchus desotoi*). *Prog. Fish-Cult.* 53: 113-117.

Parker, K. 1980. A direct method for estimating northern anchovy, *Engraulis mordax*, spawning biomass. *Fish. Bull. U.S.*, 78: 541-544.

Pavesi, P., 1889. L'industria del tonno. Relazione alla commissione reale per le tonnare, Ministero di Agricoltura, Industria e Commercio, Roma.

Pavlik, R.J., Jr., Moberg, G.P., 1997. Dopaminergic influence on gonadotropin secretion in white sturgeon (*Acipenser trasmontanus*). *Fish Physiol. Biochem.* 16: 35-43.

Peter, R.E., Habibi, H.R., Chang, J.P., Nahorniak, C.S., Yu, K.L., Huang, Y.P., Marchant, T.A., 1990. Actions of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the goldfish. *In: Epple, A., Scanes, C.G., Stetson, M.H. (Eds)., Progress in Comparative Endocrinology*. Wiley-Liss, New York, pp. 393-398.

Peter, R.E., Lin, H.R., Van Der Kraak, G., 1988. Induced ovulation and spawning of culture freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture* 74: 1-10.

Peter, R.E., Lin, H.R., van der Kraak, G., Little, M., 1993. Releasing hormones, dopamine antagonists and induced spawning. *In: Muir, J.F., Roberts, R.J. (Eds)., Recent Advances in Aquaculture*. Blackwell Scientific, Oxford, pp. 25-30.

Peter, R.E., Nahorniak, C.S., Sokolowska, M., Chang, J.P., Rivier, J.E., Vale, W.W., King, J.A., Millar, R.P., 1985. Structure-activity relationships of mammalian, chicken, and salmon gonadotropin releasing hormones *in vivo* in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 58: 231-242.

Peter, R.E., Yu, K.L., 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fishes: basic and applied aspects. *Rev. Fish Biol. Fish.* 7: 173-197.

Piccinetti, C, Piccinetti-Manfrin, G., 1979. Occurrence of eggs and larvae of tuna species related to the hydrological condition in the Mediterranean sea. In: F.X. Bard and J.Y. Le Gall (eds.). *Le thon rouge en Méditerranée: biologie pêche et aquaculture. Actes Colloq. CNEXO 8* : 79-86.

Pitcher, T.J.; Hart, P.J.B. 1982. Fisheries ecology. Croom Helm, London, 416 p.

Pujolar, J.M., Roldán, M.I. and Pla, C., 2003. Genetic analysis of tuna populations, *Thunnus thynnus thynnus* and *T. alalunga*. Mar. Biol., 143: 613-621.

Quinteiro, J., Sotelo, C.G., Rehbein, H., Pryde, S. E., Medina, I., Pérez-Martín, R.I., Rey-Méndez, M. and Mackie, I.M., 1998. Use of mtDNA Direct Polymerase Chain Reaction (PCR) Sequencing and PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Methodologies in Species Identification of Canned Tuna. J. Agric. Food Chem., 46: 1662-1669.

Ramon, D., Bailey, K. 1996. Spawning seasonality of albacore, *Thunnus alalunga*, in the South Pacific Ocean. Fish. Bull., 94: 725-733.

Ravier, C. and Fromentin, J.-M., 2001. Long-term fluctuations in the Eastern Atlantic and Mediterranean bluefin tuna population. ICES Journal of Marine Science 58, 1299–1317.

REPRO-DOTT, 2005. <http://www.dottbft.com>.

Rhine, W.D., Hsieh, D.S.T., Langer, R., 1980a. Polymers for sustained macromolecule release: procedures to fabricate reproducible delivery systems and control release kinetics. J. Pharm. Sci. 69: 265–269.

Rhine, W.D., Sukhatme, V., Hsieh, D.S.T., Langer, R.S., 1980b. A new approach to achieve zero-order release kinetics from diffusion-controlled polymer matrix system. Controlled Release Bioact. Mater. 1980: 177–186.

Riede, K., 2004. Global register of migratory species – from global to regional scales. Final Report of the R & D Project 808 05 081. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany. 329 p.

Rijnsdorp, A.D., 1991. Changes in fecundity of female North Sea plaice (*Pleuronectes platessa* L.) between three periods since 1900. ICES J. Mar. Sci., 48: 253-280.

Rodríguez-Roda J., 1964. Biología del atún, *Thunnus thynnus* (L.), de la costa sudatlántica de España. Investigación Pesquera 25: 33–146.

Rodríguez-Roda, J. 1967. Fecundidad del Atún, *Thunnus thynnus* (L), de la costa sudatlántica de España. Investigaciones Pesqueras 31: 33-52.

Sakai, K., Nomura, M., Takashima, F., Oto, H., 1975. The over-ripening phenomenon of rainbow trout-II changes in the percentage of eyed eggs, hatching rate and incidence of abnormal alevins during the process of over-ripening. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish. 41: 855–860.

Santamaria, N., Corriero, A., Desantis, S., Zubani D., Gentile, R., Sciscioli, V., de la Serna, M., Bridges, C.R., De Metrio G., 2002. Testicular cycle of the Mediterranean Bluefin

Tuna (*Thunnus thynnus* L.) Proceedings of the 1st International Symposium on DOTT, 3-8 february, Cartagena (Spain), pp. 160–154.

Saville, A., 1964. Estimation of the abundance of a fish stock from egg and larvae surveys. *ICES Rapp. Proc.-Verb.*, 155: 164-173.

Sawada, Y., Okada, T., Miyashita, S., Murata, O., Kumai, H., 2005. Completion of the Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck et Schlegel) life cycle. *Aquaculture Research*, 36: 413-421, doi:10.1111/j.1365-2109.2005.01222.x

Sawada, Y., Seoka, M., Okada, T., Miyashita, S., Murata, O., Kumai, H., 2002. Hermaphroditism in a captive-raised Pacific bluefin tuna. *Journal of Fish Biology* 60: 263-265. doi:10.1006/jfbi.2001.1831

Scarpato, D., Simeone, M., 2005. La filiera del tonno rosso Mediterraneo: problematiche e prospettive del comparto in Campania. Università degli Studi di Napoli "Parthenope" Istituto di Studi Economici. Working Paper n. 42005. p. 36. http://economia.uniparthenope.it/ise/sito/WP/4_2005.pdf

Schaefer, K.M., 1998. Reproductive biology of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) in the eastern Pacific Ocean. *Inter-Am. Trop. Tuna Comm., Bull.* 21: 489–528.

Schaefer, K.M., 2001a. Assessment of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) spawning activity in the eastern Pacific Ocean. *Fish. Bull.*, 99: 343-350.

Schaefer, K.M., 2001b. Reproductive biology of tunas. *In*: Block, B.A., Stevens, E.D. (Eds.), *Tuna: Physiology, Ecology, and Evolution*. Academic Press, San Diego, pp. 225–270.

Schally, A.V., 1978. Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Science* 202: 18–28.

Scherle, W., 1970. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *J. Microsc.* 26: 57-70.

Schulz, R.W., 1995. Physiology, morphological, and molecular aspects of gonadotropins in fish with special reference to the African catfish, *Clarias gariepinus*. *In*: Goetz, F.W. and Thomas, P. (eds.), *Reproductive Physiology of Fish*. Fish Symposium 95, Austin, Texas, pp. 2-6.

Scott, A.P., Sumpter, J.P., and Hardiman, P.A., 1983. Hormone changes during ovulation in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *Gen. Comp. Endocrinol.* 49: 128-134.

SCRS, 2002. Report of the Standing Committee on Research and Statistics. In ICCAT Report, 2002–2003. Executive Summary BFT, pp. 53–67. <http://www.iccat.es/documents/BFT.pdf>

SCRS, 2007. Report of the Standing Committee on Research and Statistics (SCRS). Madrid, Spain, October 1 to 5, 2007; pp: 57-74

Sharp, G.D., and Pirages, S.W., 1978. The distribution of red and white swimming muscles, their biochemistry, and the biochemical phylogeny of selected scombrid fishes. *In*: The

Physiological Ecology of Tunas, Sharp, G.D., and Dizon, A.E. (eds.). New York, N.Y.: Academic Press, 41–78.

Sherwood, N.M., Crim, L.W., Carolsfeld, J., Walters, S.M., 1988. Sustained hormone release. I. Characteristics of *in vitro* release of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH-A) from pellets. *Aquaculture* 74: 75–86.

Sherwood, N.M., Parker, D.B., McRory, J.E., Lescheid, D.W., 1994. Molecular evolution of growth hormone-releasing hormone and gonadotropin-releasing hormone. *In*: Sherwood, N.M., Hew, C.L. (Eds.), *Fish Physiology. Molecular Endocrinology of Fish*, vol. XIII, Academic Press, New York, pp. 3–66.

Silvani, L., Gazo, M., Aguilar, A., 1999. Spanish driftnet fishing and incidental catches in the western Mediterranean. *Biol. Conserv.* 90: 791 75–85.

Sissenwine, M.P., Mace, P.M., Powers, J.E., Scott, G.P., 1998. A commentary on western Atlantic bluefin tuna assessments. *Transactions of the American Fisheries Society* 127: 838–855.

Skurai, H., Matsuyama, T., Abe, Y., 1997. Transportation of Tuna. *In*: *Proceedings of the Fourth International Aquarium Congress Tokyo*, Tokyo, 23–27 June 1996, pp 57–61.

Slater, C., Schreck, C.B., Swanson, P., 1994. Plasma profiles of the sex steroids and gonadotropins in maturing female spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Comp. Biochem. Physiol.* 109A: 167–175.

Solar, I.I., McLean, E., Baker, I.J., Sherwood, N.M., Donaldson, E.M., 1990. Short communication: induced ovulation of sablefish (*Anoplopoma fimbria*) following oral administration of desGly¹⁰-(D-Ala⁶) LH-RH ethylamide. *Fish Physiol. Biochem.* 8: 497–499.

Springate, J.R.C., Bromage, N.R., Elliot, J.A.K., Hudson, D.L., 1984. The timing of ovulation and stripping and their effects on the rates of fertilization and survival to eying, hatch and swim-up in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture* 43: 313–322.

Stevens, R.E., 1966. Hormone-induced spawning of striped bass for reservoir stocking. *Prog. Fish-Cult.* 28: 19–28.

Sukumasavin, N., Leelapatra, W., McLean, E., Donaldson, E.M., 1992. Orally induced spawning of Thai carp (*Puntius gonionotus Bleeker*), following co-administration of Gly¹⁰ (D-Arg⁶) sGnRH ethylamide and domperidone. *J. Fish Biol.* 40: 477–479.

Sullivan, C.V., Berlinsky, D.L., Hodson, R.G., 1997. Reproduction. *In*: Harrel, R.M. (Ed.), *Striped Bass and Other Morone Culture*. Elsevier, New York, pp. 11–73.

Sullivan, C.V., Bernard, M.G., Hara, A., Dickhoff, W.W., 1989. Thyroid hormones in trout reproduction: enhancement of GnRH α and partially purified salmon GtH-induced ovarian maturation in vivo and in vitro. *J. Exp. Zool.* 250: 188–195.

Sumpter, J.P., Pottinger, T.G., Rand-Weaver, M., Campbell, P.M., 1994. The wide-ranging effects of stress in fish. *In*: Davey, K.G., Peter, R.E., Tobe, S.S. (Eds.), *Perspectives in Comparative Endocrinology*. National Research Council of Canada, Ottawa, pp. 535–538.

Susca, V., Corriero, A., Deflorio, M., Bridges, C.R., De Metrio, G., 2001b. New results on the reproductive biology of the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Mediterranean. ICCAT SCRS/00/91. Collective Volume of Scientific Papers 52: 745–751.

Susca, V., Corriero, A., Bridges, C.R. De Metrio, G., 2001a. Study of the sexual maturity of female bluefin tuna: purification and characterization of vitellogenin and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Fish Biology* 58: 815-831.

Susca, V., Deflorio, M., Corriero, A., Bridges, C.R., De Metrio, G. 2000. Sexual maturation in the bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from the central Mediterranean Sea. In *Proceedings of the 6th International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish* (Norberg, B., Kjesbu, O. S., Taranger, G. L., Andersson, E. & Stefansson, S. O., eds), p. 105. Bergen: Fish Symp. 99.

Takagi, M., Okamura, T., Chow, S., and Taniguchi, N., 1999. PCR primers for microsatellite loci in tuna species of the genus *Thunnus* and its application for population genetic study. *Fish. Sci.*, 65: 571–576.

Takeyama, H., Chow, S., Tsuzuki, H., and Matsunaga, T., 2001. Mitochondrial DNA sequence variation within and between tuna *Thunnus* species and its application to species identification. *J. Fish Biol.*, 58: 1646-1657.

Takii, K. Hosokawa, H, Shimeno, S, Ukawa, M, Kotani, A, Yamada, Y, 2005. Anesthesia, fasting tolerance, and nutrient requirement of juvenile northern bluefin tuna. *Fisheries Science*; 71: 499–503

Tandler, A., 1993: Marine aquaculture in Israel with special emphasis on larval rearing. *J. World Aquacult. Soc.* 24: 241–245.

Thalathiah, S., Ahmad, A.O., Zaini, M.S., 1988. Induced spawning techniques practised at Batu Berendam, Melaka, Malaysia. *Aquaculture* 74: 23–33.

Thomas, P., Boyd, N.W., 1989. Dietary administration of an LHRH analogue induces spawning of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Aquaculture* 80: 363–370.

Thomas, P., Ghosh, S. 1995. Regulation of the maturation-inducing receptor in spotted seatrout. *In: Goetz, F.W. and Thomas, P. (eds).* *Reproductive Physiology of Fish. Fish Symposium 95*, Austin, Texas, pp. 376.

Thompson, H.C. and Contin, R.K., 1979. Electrophoretic Study of Atlantic Bluefin Tuna from Eastern and Western North Atlantic Ocean. SCRS/79/96. International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas, Madrid.

Trippel, E.A. 1999. Estimation of stock reproductive potential: history and challenges for Canadian Atlantic gadoid stock assessment. *J. Northw. Atl. Fish. Sci.*, 25: 61-81.

Tsuji, S., 2002. Comparison of sampling efficiencies and quick calculation of bluefin tuna larval abundance of two spawning grounds based on the collaborative larval survey among the EU, US, and Japan in 1994. *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT*, 54: 407-411.

Tucker, J.W., 1994. Spawning of captive serranid fishes: a review. *J. World Aquacult. Soc.* 25: 345–359.

Tyler, C.R., Sumpter, J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. *Rev. Fish. Sci.* 6: 287–318.

Ueyanagi, J., Mori, K., Nishikawa, Y., Suda, A., 1973. Report on experiments on the development of tuna culturing techniques (April 1970, March 1973). *S. Series, Far Seas Fish. Res. Lab.*, 8: 165 pp.

Van der Kraak, G., Lin, H.R., Donaldson, E.M., Dye, H.M., Hunter, G.A., 1983. Effects of LH-RH and des-Gly¹⁰-[D-Ala⁶]-LH-RH ethylamide on plasma gonadotropin levels and oocyte maturation in adult female coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 49: 470–476.

Van der Kraak, G., Suzuki, K., Peter, R.E., Itoh, H. and Kawauchi, H., 1992. Properties of common carp gonadotropin I and gonadotropin II. *Gen. Comp. Endocrinol.* 85: 217-229.

Vermeirssen, E.L.M., Scott, A.P., Mylonas, C.C., Zohar, Y., 1998. Gonadotrophin-releasing hormone agonist stimulates milt fluidity and plasma concentrations of 17,20 β -dihydroxylated and 5 β -reduced, 3 α -hydroxylated C21 steroids in male plaice (*Pleuronectes platessa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 163–177.

Vermeirssen, E.L.M., Shields, R., Mazonra de Quero, C., Scott, A.P., 2000. Gonadotrophin-releasing hormone agonist raises plasma concentrations of progestogens and enhances milt fluidity in male Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Fish Physiol. Biochem.* 22: 77–87.

Viñas, J., Pla, C., Tawil, N.Y. *et al.*, 2003. Mitochondrial genetic characterization of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) from three Mediterranean (Libya, Malta, Tunisia); and one Atlantic locations (Gulf of Cadiz). *International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas, Collective Volume of Scientific Papers*, 55: 1282-1288.

Von Ihering, R., 1937. A method for inducing spawning in fish. *Prog. Fish-Cult.* 34: 15–16.

Wallace, R.A., Selman, K., 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *Amer.Zool.* 21: 325-343.

Ward, R.D., 1995. Population genetics of tunas. *Journal of Fish Biology* 47: 259–280.

Ward, R.D., Elliott, N.G., Innes, B.H., Smolenski, A.J., and Grewe, P.M., 1997. Global population structure of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, inferred from allozyme and mitochondrial DNA variation. *Fish. Bull.*, 95: 566–575.

Weber, G.M., Borski, R.J., Powell, J.F.F., Sherwood, N.M., Grau, E.G., 1995. *In vivo* and *in vitro* effects of gonadotropin-releasing hormone on prolactin in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Am. Zool. (Abstract)*, 34: 121A.

Weibel, E.R., 1963. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.* 12: 235-202.

Weibel, E.R., 1969. Stereological principles for morphometry in electron microscopy cytology. *International Review of Cytology* 26: 235–302.

Weibel, E.R., Gómez, D.M., 1962. A principle for counting tissue structures on random sections. *Journal of Applied Physiology* 17: 343–348.

Weibel, E.R., Kristler, G.S., Scherle, W.F., 1966. Practical stereological methods for morphometric cytology. *Journal of Cell Biology* 30: 23–38.

Weil, C., Breton, B., Sambroni, E., Zmora, N., Zohar, Y., 1991. Bioactivity of various forms of GnRH in relation to their resistance to degradation at the pituitary level in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds.), *Reproductive Physiology of Fish*. Fish Symposium 91, Sheffield, pp. 51–53.

Weil, C., Breton, B., Sambroni, E., Zmora, N., Zohar, Y., 1992. *In vitro* bioactivities of various forms of GnRH in relation to their resistance to degradation at the pituitary level in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 87: 33–43.

Weil, C., Crim, L.W., 1983. Administration of LHRH analogues in various ways: effect on the advancement of spermiation in prespawning landlocked salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 35: 103–115.

Wexler, J.B., Scholey, V.P., Olson, R.J., Margulies, D., Nakazawa, A., Suter, J.M., 2003. Tank culture of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*: developing a spawning population for research purposes. *Aquaculture* 220: 327–353.

Williams, M.A., 1977. *Quantitative Methods in Biology*: Amsterdam and New York: Elsevir/North Holland Biomedical Press. 243 pp. [Vol. 6(2) of *Practical Methods in Electron Microscopy* (A. Glover, ed.)].

Witthames, P.R., Greer Walker, M., Dinis M.T., Whitnig, C.L., 1995. The geographical variation in the potential annual fecundity of dover sole, *Solea solea*, from European shelf waters during 1991. *Neth.J.Sea Res.*, 34: 45-58.

Wootton, R.J., 1984. Introduction: tactics and strategies in fish reproduction. In: *Fish reproduction: strategies and tactics*. G.W. Potts and R.J. Wootton (eds.). Academic Press, New York, p. 1-12.

WWF, 2006. Tuna in trouble, Major problems for the world's tuna fisheries. WWF/MEDPO. Pp. 22

Yaron, Z., 1995. Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture* 129: 49–73.

Yu, K.L., Lin, X.W., da Cunha Bastos, J. And Peter, R.E., 1997. Neural regulation of GnRH in teleost fish. In: Parthar, I.S. and Sakuma, Y. (eds.), *GnRH Neurons: Gene to behaviour*. Brain Shuppan, Tokyo, pp. 277-312.

Zohar, Y., 1988. Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teleost: basic and applied consideration. In: *Reproduction In Fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics*. INRA Press, Paris, pp. 47–62.

Zohar, Y., 1989a. Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation. *In: Shilo, M., Sarig, S. (Eds.), Fish Culture in Warm Water Systems: Problems and Trends.* CRC Press, Boca Raton, pp. 65–119.

Zohar, Y., 1989b. Endocrinology and fish farming: aspects in reproduction growth, and smoltification. *Fish Physiol. Biochem.* 7: 395–405.

Zohar, Y., 1996. New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquacult., Suppl.* 2: 43–48.

Zohar, Y., Billard, R., Weil, C., 1984. La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*): connaissance du cycle sexuel et controle de la gametogenese et de la ponte. *In: Barnabe, G., Billard, R. (Eds.), L'Aquaculture du bar et des Sparides.* INRA, Paris, pp. 3–24.

Zohar, Y., Doering, D., Langer, B., 1994. Application of controlled release technology in aquaculture. *Controlled Release Bioact. Mater.* 21: 110–112.

Zohar, Y., Elizur, A., Sherwood, N.M., Powell, J.F.F., Rivier, J.E., Zmora, N., 1995a. Gonadotropin-releasing activities of the three native forms of gonadotropin-releasing hormones present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 289–299.

Zohar, Y., Elizur, A., Sherwood, N.M., Rivier, J.F., Zmora, N., 1995b. Gonadotropin-releasing potencies of the three native forms of gonadotropin-releasing hormones present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97: 289–299.

Zohar, Y., Gordin, H., 1979. Spawning kinetics in the gilthead sea bream after low doses of human chorionic gonadotropin (hCG). *J. Fish Biol.* 15: 665–670.

Zohar, Y., Goren, A., Fridkin, M., Elhanati, E., Koch, Y., 1990a. Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream *Sparus aurata*: II. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary, kidney and liver. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79: 306–331.

Zohar, Y., Goren, A., Tosky, M., Pagelson, G., Leibovitz, D., Koch, Y., 1989a. The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata*: *in vivo* and *in vitro* studies. *Fish. Physiol. Biochem.* 7: 59–67.

Zohar, Y., Mylonas, C.C., 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197: 99–136.

Zohar, Y., Pagelson, G. and Tosky, M., 1988. Daily changes in reproductive hormone levels in the female gilthead seabream *Sparus aurata* at the spawning period. *In: Zohar, Y. and Breton, B. (eds.), Reproduction in Fish: Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics.* INRA Press, Paris, pp. 119–125.

Zohar, Y., Pagelson, G., Gothilf, Y., Dickhoff, W.W., Swanson, P., Duguay, S., Gombotz, W., Kost, J., Langer, R., 1990b. Controlled release of gonadotropin releasing hormones for the manipulation of spawning in farmed fish. *Controlled Release Bioact. Mater.* 17: 51–52.

Zohar, Y., Tosky, M., Pagelson, G., Finkelman, Y., 1989b. Induction of spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, using (D-Ala⁶-Pro⁹Net)-LHRH: comparison with the use of HCG. *Israeli J. Aquacult. Bamidgeh* 41: 105–113.

Zubani, D., Corriero, A., Desantis, S., Acone, F., de la Serna, M., Eicker, J., Bridges, C.R., Megalofonou, P., De Metrio, G., 2003. Ovarian cycle of the Mediterranean bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.). *CIHEAM, Cah. Options Méditerr.* 60: 201–203.