



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA

E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

**Valutazione dello stato di salute del tonno
rosso in Mar Adriatico (*Thunnus Thynnus*)**

**Evaluation of the Health status of bluefin tuna
in the Adriatic Sea (*Thunnus Thynnus*)**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Simone Gaetano Amato

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Giorgia
Gioacchini

Correlatore:

Dott.ssa Giulia Chemello

**Sessione estiva
Anno Accademico 2022/2023**

RIASSUNTO

Il tonno rosso, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), viene denominato comunemente come il “Re del Mediterraneo”. Le testimonianze della sua presenza in questo mare sono antichissime e per secoli è stato fonte di sostentamento per moltissimi popoli.

In Italia, tale specie è conosciuta comunemente col nome di tonno rosso. In passato, a causa dell’elevatissima richiesta da parte del settore alimentare, soprattutto dal mercato giapponese, la popolazione di tonno rosso ha subito un enorme declino in seguito a fenomeni di sovrasfruttamento. Oggi, tramite numerosi studi di tagging, sappiamo che la dinamica di popolazione di questa specie è estremamente complessa e può variare tra le popolazioni che occupano areali diversi. Inoltre, è ormai evidente come una conoscenza approfondita dello stato di salute di questa specie sia fondamentale per poter attuare dei piani di salvaguardia che adottino delle misure adeguate per la gestione del tonno rosso.

In questo progetto di tesi, è stato valutato lo stato di salute riproduttivo dello stock pescato in Adriatico tramite l’analisi di parametri biometrici e la quantificazione del grasso perigonadale e il numero di melanomacrofagi presenti nelle gonadi.

ABSTRACT

The Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (Linnaeus, 1758), is commonly known as the “king of the Mediterranean”. Proof of its presence in the Mediterranean is ancient, for centuries it has been a source of sustenance for many peoples.

During the past years, the bluefin tuna population was affected by a considerable decline due to overfishing caused by the high demand from the food industry, especially from the Japanese market. To date, thanks to several tagging studies, it is evident that population dynamics are extremely complex and varies among subpopulation inhabiting different areas. Moreover, it is well known that an in-depth knowledge of the health status of this species is fundamental to successfully realizing safeguard plans which take appropriate measures for the management of the bluefin tuna. In this thesis, the reproductive health status of bluefin tuna Adriatic stock was evaluated, through the analysis of biometric parameters and histological analysis to quantify the perigonadal fat and the number of melanomacrophages in the gonads.

INDICE

1	Introduzione	1
1.1	<i>Thunnus Thynnus</i>	1
1.2	Distribuzione	3
1.3	Dieta	6
1.4	Riproduzione	7
1.5	<i>Regolazione ormonale della riproduzione</i>	11
1.6	<i>Sviluppo e maturazione degli ovociti</i>	16
1.7	<i>Lo sviluppo testicolare nei maschi: spermatogenesi, maturazione e spermiazione</i>	19
1.8	<i>Melanomacrofagi</i>	22
1.9	<i>Pesca</i>	25
1.10	<i>Gestione della risorsa</i>	31
2	Scopo della tesi	35
3	Materiali e Metodi	36
3.1	Campionamento	36
3.2	Analisi biometriche, indice gonadosomatico (GSI) ed indice del grasso perigonadale	36
3.3	Analisi Istologica	37
3.4	Analisi statistica	38
4	Risultati	39
4.1	<i>Analisi biometriche, indice gonadosomatico (GSI) e indice del grasso perigonadale</i>	39
4.2	<i>Analisi istologiche</i>	46
4.3	<i>Correlazione di Pearson</i>	50
5	Discussioni	59

1. Introduzione

1.1 *Thunnus thynnus*

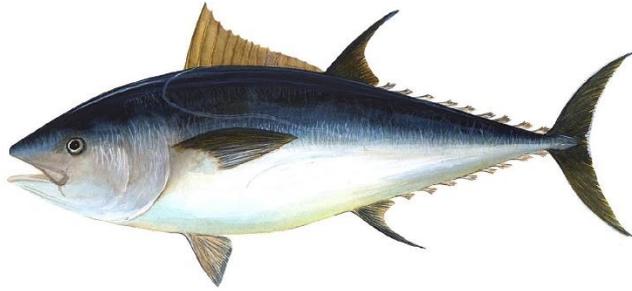


Figura 1. Esemplare adulto di tonno rosso (*Thunnus thynnus*, Linnaeus, 1758).

[Animalia](#) (Kingdom)
[Chordata](#) (Phylum)
[Vertebrata](#) (Subphylum)
[Gnathostomata](#) (Infraphylum)
[Osteichthyes](#) (Parvphylum)
[Actinopterygii](#) (Gigaclass)
[Actinopteri](#) (Class)
[Teleostei](#) (Subclass)
[Scombriformes](#) (Order)
[Scombridae](#) (Family)
[Scombrinae](#) (Subfamily)
[Thunnus](#) (Genus)
[Thunnus thynnus](#) (Species)

Thunnus thynnus (Linnaeus, 1758) (Figura 1) comunemente noto come tonno rosso, è un pesce osseo marino appartenente alla famiglia degli Scombridi di cui rappresenta la specie con la taglia maggiore. L'esemplare più grande

conosciuto è stato trovato in Nuova Scozia, nelle acque settentrionali del Nord Atlantico lungo 340 cm SFL (straight fork length) con un peso di 680 kg (Claro et al., 2014).

Il tonno rosso presenta la classica morfologia degli esemplari appartenenti alla famiglia degli scombridi, è dotato di un corpo allungato e fusiforme associato ad una muscolatura forte e compatta, che lo rende perfetto per il nuoto a lunga distanza (Mather et al., 1995). La colorazione, tipica dei pesci pelagici, è nero/bluastro sul dorso mentre il ventre ha una colorazione argentea. Tale colorazione, detta colorazione disruptiva, rappresenta una forma di mimetismo che permette all'animale di confondersi con l'ambiente e di sfuggire più facilmente ai suoi predatori. Presenta due pinne dorsali ravvicinate, una anteriore giallo-bluastro e una posteriore bruno-rossastra più corta della precedente e in posizione simmetrica rispetto alla pinna anale. Le pinne pettorali sono corte come quelle ventrali e all'altezza del peduncolo caudale sono presenti 8-10 pinnule di colore tendente al giallo disposte sia in posizione ventrale che caudale. La pinna caudale è a forma di falce e possiede una muscolatura molto potente (ICCAT, 2007).

La grande massa di tessuto muscolare che caratterizza questa specie è li rende degli straordinari nuotatori ed è di fondamentale importanza per percorrere migrazioni ripetute e di lunga distanza più volte nel corso della loro vita

(Fromentin & Powers, 2005). Il tonno rosso presenta alcuni adattamenti fisiologici e caratteristiche fisiche che lo rendono uno dei grandi pelagici più affascinanti e adattabili del pianeta. Ad esempio, i tonni non hanno muscoli opercolari e per questo devono nuotare costantemente per respirare. (Carey et al., 1983). Un altro importante adattamento fisiologico è la “rete mirabilis”, una particolare e complessa struttura vascolare che funge da scambiatore di calore in controcorrente che previene l’aumento della temperatura corporea. Il risultato è una conservazione del calore metabolico che alla fine andrebbe perso (Francis et al., 1983).

1.2 Distribuzione

Il tonno rosso popola le acque dell'intero Atlantico e dei mari ad esso adiacenti, come il Mar Mediterraneo (Figura 2).

I tonni sono pesci pelagici migratori, recenti studi hanno rivelato che possono spingersi fino a 1000 metri di profondità anche se questo fenomeno di immersione profonda appare più frequente nei tonni che popolano le acque del Golfo del Messico rispetto agli esemplari presenti negli altri areali di distribuzione (R.K. Bauer et al. 2017).

Le cause di questo comportamento son oda ricercarsi più sulla fisiologia termica dell’animale che per motivi comportamentali quali la ricerca della preda. A questo proposito, Block et al. (2005) ha ipotizzato che *T. Thynnus*, per

evitare il surriscaldamento corporeo, migri nelle acque più fresche al di sotto del termoclino per trovare refrigerio. Altri studi condotti nel Mar Mediterraneo nord-occidentale hanno rivelato che il movimento orizzontale e verticale del tonno è correlato anche alle condizioni oceanografiche (R.K. Bauer et al., 2017). Ad oggi, grazie a procedure di tagging è possibile monitorare gli spostamenti di questa specie. Attraverso i dati di geoposizione sono state identificate due popolazioni di tonno rosso che si riproducono in due zone distinte, quella occidentale nel Golfo del Messico e nella parte orientale del Mar Mediterraneo (Block et al., 2005). I movimenti transatlantici del tonno rosso registrati nella zona occidentale rivelano la fedeltà alle aree di riproduzione conosciute nel Mar Mediterraneo. Mentre le zone di foraggiamento sembrano essere condivisi da queste due popolazioni, entrambe infatti si spostano nelle zone di foraggiamento presenti nell' Atlantico centrale e orientale (Block et al., 2005).

In uno studio di Wilson et al., del 2005 la distanza massima percorsa da parte di un esemplare è stata quella di 5820 km in 304 giorni tra le coste dell' America settentrionale e le acque dell' oceano Atlantico. Esistono inoltre testimonianze antichissime della presenza del tonno rosso all'interno del bacino del Mediterraneo. Francesco Cetti, zoologo e matematico italiano, nel XVIII secolo, fu il primo a ipotizzare l'ingresso nel Mar Mediterraneo di questa specie

in relazione al processo riproduttivo. Oggi, sappiamo attraverso gli studi di tagging che il tonno rosso entra nel Mar Mediterraneo attraverso lo Stretto di Gibilterra, raggiunge i luoghi di riproduzione e al termine della stagione riproduttiva una parte ritorna nell'Atlantico, mentre un'altra rimane nel bacino del Mediterraneo, presumibilmente per il foraggiamento (Richardson et al., 2016).

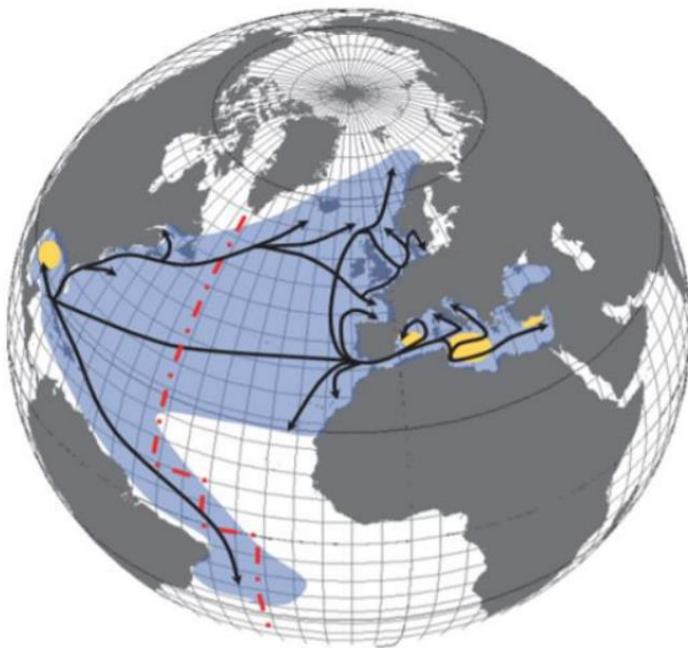


Figura 2. Areale di distribuzione del tonno rosso (ICCAT, 2010).

1.3 Dieta

I tonni sono specie opportuniste (Karakulak et al., 2009), il tonno rosso in particolare, viste le sue dimensioni, si colloca in cima alla catena alimentare e ha pochi predatori (Collette & Nauen, 1983). I tonni sono predati solo da alcune specie di squali, orche e infine dall'uomo. In alcuni studi, realizzati da Dragovich nel 2011, sono stati analizzati i contenuti stomacali di 250 tonni rossi catturati nel Nord Atlantico occidentale dal 1965 al 1966 con palangari e ciancioli. Il contenuto dello stomaco è stato analizzato quantitativamente e qualitativamente e sono stati individuati complessivamente 41 taxa, di cui 22 pesci, 10 molluschi, 8 crostacei e 1 salpa, quasi tutti di origine pelagica. Le specie più rappresentative individuate sono state: sardine (*Sardina pilchardus*), acciughe (*Engraulis encrasicolus*), aringhe (*Clupea harengus*), sgombri (*Scomber scombrus*) e cefalopodi (*Illex* spp, *Loligo* spp) (Dragovich, 2011). La crescita corporea e l'età del tonno rosso sono stimate grazie allo studio della microstruttura degli otoliti, (dal greco *oto-*, orecchio e *lithos*, pietra) minuscole concrezioni di ossalato di calcio inglobate in una matrice gelatinosa. Gli spostamenti degli otoliti, conseguenti alle diverse posizioni della testa e alle accelerazioni lineari, stimolano le cellule ciliate determinando le sensazioni statiche e di equilibrio. Lo studio degli otoliti ci permette di determinare l'età di un individuo (Busawon et al., 2015). Il tasso di crescita non dipende solo

dall'età, ma anche dallo stadio riproduttivo, dal metabolismo lipidico e dalle condizioni ambientali. In alcuni studi è stato dimostrato che il novellame di tonno rosso, in allevamento, sarebbe capace di aumentare il peso due volte più velocemente rispetto al novellame selvatico (Tzoumas et al., 2010). Gli esemplari giovanili crescono più velocemente degli adulti, ciò è dovuto ad un'assimilazione molto più rapida dei nutrienti grazie ad un tasso metabolico più elevato. Il tasso di crescita stimato da La Mesa et al., (2005) era compreso tra i 2.0 e i 2.4 mm/giorno.

1.4 Riproduzione

Il tonno rosso è una specie ovipara e iteropara, le femmine rilasciano uova pelagiche che vengono fecondate in colonna d'acqua durante la stagione riproduttiva che si ripete più volte nel corso del loro ciclo vitale (Schaefer, 2001). Non esiste dimorfismo sessuale, gli esemplari maschili di *Thunnus thynnus* possiedono dei testicoli accoppiati e allungati attaccati alla parete dorsale del corpo tramite un mesentere. I testicoli sono composti da una fitta schiera di lobuli convergenti nel dotto spermatico principale che terminano al di sotto della periferia della tunica albuginea (Abascal et al., 2004).

Nelle femmine sono presenti due ovari oblunghi e sospesi attraverso un mesentere all'interno della cavità addominale che si estendono per quasi tutta la lunghezza della parete dorsale del celoma. Sono uniti a livello caudale, dove

le cavità si uniscono per formare un piccolo dotto ovarico che termina all'esterno aprendosi nell'apertura anale (Mourente et al., 2001).

La quantità di gameti rilasciata da ciascun individuo dipende principalmente dalla loro dimensione. Studi effettuati su esemplari selvatici di tonno rosso hanno stimato che una femmina è in grado di produrre una media di 93.000 uova per kg di peso corporeo durante la singola stagione riproduttiva. Durante la riproduzione spesso la superficie dell'acqua si colora di bianco assumendo un aspetto lattiginoso per alcuni minuti a causa dell'elevata quantità di gameti rilasciati (Medina et al., 2002).

Le uova di tonno rosso hanno una galleggiabilità ben definita, dovuta alla presenza della goccia lipidica che permette alle uova fecondate di mantenere una determinata posizione in colonna d'acqua indipendentemente dalla profondità di rilascio. In seguito alla fecondazione, al termine dello sviluppo embrionale che dura circa 32 ore alla temperatura di 24 °C, le larve (di circa 3-4 mm) alla schiusa hanno ancora il sacco del tuorlo di cui si nutriranno nei primi giorni di vita. Quando il sacco vitellino è stato completamente assorbito, le larve iniziano la loro vita come componenti del plancton nutrendosi di altri organismi planctonici quali produttori primari (fitoplancton) e consumatori primari (zooplancton e crostacei di piccole dimensioni) che offrono un alto

La stagione riproduttiva del tonno rosso nel Mar Mediterraneo va da maggio a luglio, con eccezioni nel mese di agosto quando talvolta sono state ritrovate uova e larve mature. Tramite lo studio e il campionamento delle larve di *Thunnus thynnus* i ricercatori sono giunti alla conclusione che quasi tutto il Mediterraneo è un'enorme area di spawning, dato che uova o larve di questa specie sono state trovate in quasi tutto il bacino. In alcune zone del Mediterraneo, però, la presenza di uova e larve è maggiore e di conseguenza sono state designate come principali aree di riproduzione. Probabilmente le cause di una massiccia presenza di larve sono da ricercare nelle condizioni climatiche e oceanografiche ottimali. Negli ultimi anni, le acque del Mar Levantino e del Mediterraneo orientale vengono scelte dagli esemplari maturi come le prime zone per la deposizione delle uova per via delle condizioni climatiche favorevoli e della temperatura dell'acqua ottimale. Poiché questo fenomeno, ormai, non è più un caso isolato, la zona del Mar Levantino è stata designata come quarta area riproduttiva aggiungendosi a quelle già note (Karakulak et al., 2004). Le uniche zone dove la presenza di larve e uova è quasi assente sono il Mare di Alboran, il Golfo del Leone, il Bacino ligure-provenzale, l'Adriatico settentrionale e l'Egeo settentrionale (Piccinetti et al., 2013) (Figura 4)

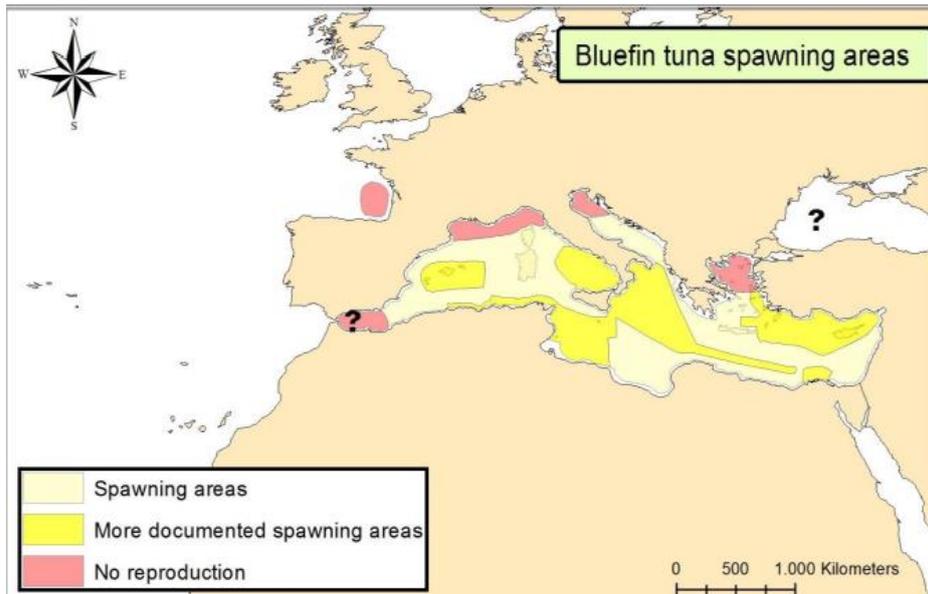


Figura 4. Aree di riproduzione di *Thunnus thynnus*.

1.5 Regolazione ormonale della riproduzione

Nei pesci ossei, come in altri vertebrati, la riproduzione è regolata dall'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi (Figura 5) (Nagahama, 1994).

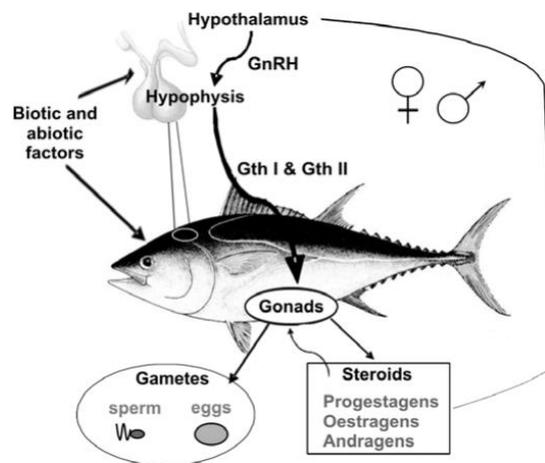


Figura 5. Asse ipotalamo-ipofisi-gonade.

Il processo riproduttivo inizia nell'ipotalamo, che stimolato da informazioni esterne (ad esempio gli stimoli ambientali) e interne (riserve energetiche) risponde con la sintesi e il rilascio dell'ormone rilasciante le gonadotropine (GnRH). Il GnRH stimola la sintesi e il rilascio delle gonadotropine ipofisarie (GTHs): l'ormone follicolo-stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH), che agiscono entrambi sulla gonade per stimolare la sintesi di steroidi sessuali, gli effettori ultimi dello sviluppo delle gonadi (Carnevali et al., 2019; Medina et al., 2016).

Lungo questo asse, le gonadotropine ipofisarie, cioè gli ormoni follicolo-stimolante (FSH) e luteinizzante (LH), sono gli attori chiave nel controllo della riproduzione endocrina. Nelle fasi iniziali, la stimolazione delle GTHs (principalmente di FSH) induce la secrezione di ormoni androgeni (testosterone (T) e 11-ketotestosterone (11KT)) nei maschi ed estrogeni (estradiolo (E2)) nelle femmine, che agiscono in concomitanza con FSH nel controllo della gametogenesi (Yu et al., 1997).

L'estradiolo, ad esempio, gioca un ruolo importante nella gametogenesi della femmina, con la stimolazione della sintesi della VTG nel fegato. Così, il periodo della gametogenesi è caratterizzato da elevati livelli ematici di FSH e livelli crescenti di androgeni nei maschi, e l'aumento di E2 e VTG nelle femmine. Alla fine della gametogenesi, la secrezione di LH dall'ipofisi induce

un cambiamento nella via steroidogenica della gonade, stimolando la sintesi e la secrezione di progestinici che inducono la maturazione (MIS). L'azione concomitante di LH e MIS stimola il processo di maturazione delle gonadi. La maturazione è caratterizzata da una riduzione dei livelli ematici di FSH e androgeni /estrogeni e da un aumento dei livelli ematici di LH e MIS. Una volta che la maturazione delle gonadi è completata, il GnRH encefalico stimola un forte aumento della secrezione di LH dall'ipofisi, che induce l'ovulazione nelle femmine mentre nei maschi i livelli relativamente stabili, ma elevati di LH inducono la spermiazione (Slater et al., 1994).

Il successo della maturazione e il rilascio dei gameti dipendono dal corretto funzionamento di tutti i componenti dell'asse riproduttivo durante l'intero ciclo riproduttivo, dalla gametogenesi alla deposizione delle uova.

L'azione stimolante del GnRH sulla produzione di GTH è legata alla presenza di recettori del GnRH (GnRH-R) nell'ipofisi. Nei mammiferi sono stati identificati due tipi di recettori, uno e due, che mostrano una certa specificità per ogni variante di GnRH. Neuroni GnRH-3 inviano proiezioni all'ipofisi, sollevando il potenziale coinvolgimento nella regolazione della secrezione ipofisaria.

I pesci presentano numerosi recettori GnRH e, rispetto ai mammiferi, mostrano la stessa affinità per cGnRH-II, sGnRH e la forma ipofisiotropica. La reattività

della ghiandola ipofisaria ai GnRH è influenzata dall'andamento stagionale dei livelli di espressione dei geni GnRH-R. Questi raggiungono il loro apice durante il periodo di pre-deposizione delle uova, mentre sono più bassi durante il riposo e le prime fasi di sviluppo gonadico

La steroidogenesi avviene nelle cellule somatiche della gonade, le cellule della granulosa e della teca nell'ovario e le cellule interstiziali di Leydig e cellule di Sertoli nei testicoli (Miura et al., 1991).

Come descritto precedentemente, i principali ormoni steroidei nella regolazione della gametogenesi dei pesci sono l'estradiolo (E2) nelle femmine e l'androgeno 11ketotestosterone (11KT) nei maschi (Carnevali et al., 2018).

L'ovario dei pesci sintetizza anche T, che svolge altre funzioni correlate riproduttive. Allo stesso modo, anche i maschi sintetizzano E2, ma questo si trova a livelli molto più bassi rispetto alle femmine. Oltre al loro ruolo nella regolazione dello sviluppo delle gonadi, gli ormoni steroidei sessuali esercitano anche feedback sia positivi che negativi sull'asse ipotalamo-ipofisi e quindi, regolano il rilascio di GTH. Un'importante azione positiva degli steroidi è quella di migliorare la risposta ipofisaria al GnRH, probabilmente stimolando GnRH-R. Un'importante azione negativa di questi ormoni steroidei viene esercitata attraverso il sistema dopaminergico, aumentando il turnover di dopamina e migliorando così il tono inibitorio sulla secrezione di GTH. In

questo modo, il cervello è costantemente informato circa l'evoluzione dello sviluppo delle gonadi, attraverso l'azione della fluttuazione dei livelli di steroidi circolanti durante il ciclo riproduttivo.

Il ciclo riproduttivo è un insieme di processi sequenziali che portano alla formazione di gameti maturi a partire da cellule germinali immature. Il processo di crescita e differenziamento dei gameti è chiamato gametogenesi, e porta alla formazione dell'ovocita femminile (oogenesi) e dello spermatozoo maschile (spermatogenesi). Sia i gameti maschili che quelli femminili hanno un'origine comune nella popolazione di cellule germinali embrionali primordiali (PGCs) che migrano durante lo sviluppo embrionale fino al luogo della formazione della gonade (Maggi., 2010).

Le PGCs proliferano attraverso divisioni mitotiche e formano gli oogoni o spermatogoni a seconda del sesso dell'individuo. Con l'ultima divisione mitotica, oogoni e spermatogoni entrano in meiosi e diventano ovociti o spermatoцитi.

Sia nei maschi che nelle femmine, il ciclo riproduttivo prevede due fasi principali, la fase di crescita della gonade durante la quale la gametogenesi procede, e la fase di maturazione, che culmina nella ovulazione/spermiazione.

Il rilascio di gameti maturi nell'ambiente esterno è un evento altamente

sincronizzato che porta alla fecondazione dell'uovo e allo sviluppo dell'embrione.

1.6 Sviluppo e maturazione degli ovociti.

All'inizio del ciclo riproduttivo, l'ovario immaturo contiene gruppi di oogoni, lungo le lamelle ovigere che proliferano attraverso divisioni mitotiche (Figura 6). In seguito, una parte della popolazione di oogoni entra in meiosi e diventa ovocita primario arrestandosi allo stadio di profase I, la meiosi non riprenderà fino alla maturazione finale. Gli ovociti primari attraversano una fase di crescita primaria o previtellogenesi che comporta un aumento delle dimensioni, la comparsa di materiale chiaro nel citoplasma e la comparsa delle cellule della granulosa e della teca e circonda l'ovocita formando il follicolo ovarico. Questa è una fase ormone-indipendente che si verifica prima del periodo di sintesi della VTG indotta dall'estradiolo (Nagahama, 1983).

La fase di crescita secondaria, o vitellogenesi, si caratterizza per la sintesi e per l'accumulo di VTG e proteine correlate alle vitelline nel citoplasma dell'ovocita, con conseguente aumento di 10 volte in termini di dimensioni dell'ovocita. Questo periodo si può dividere in una fase di vitellogenesi precoce caratterizzata da ovociti di piccole dimensioni, con un citoplasma opaco quasi privo di inclusioni, ad eccezione di alcune gocce lipidiche. Con la progressione della vitellogenesi, nuove inclusioni appaiono nel citoplasma, come le

vescicole corticali, le gocce lipidiche ed i granuli di tuorlo. L'ordine di inclusione e di comparsa delle inclusioni è specie-specifico (Pousis et al., 2015). Queste inclusioni aumentano in dimensioni e numero durante la vitellogenesi, promuovendo l'aumento delle dimensioni degli ovociti. Inoltre, la zona radiata, come gli strati della granulosa e della teca diventano sempre più spessi per sostenere la rapida crescita dell'ovocita. Alla fine del periodo di vitellogenesi, l'ovocita post-vitellogenico è caratterizzato da un ampio citoplasma trasparente completamente pieno di granuli di tuorlo e globuli lipidici, un nucleo centrale (o vescicole germinale, GV), e una spessa zona radiata, avvolta dagli strati follicolari della granulosa e della teca. Dopo la vitellogenesi, gli ovociti sono sottoposti a maturazione, con la ripresa della meiosi fino alla metafase II, momento in cui il primo corpo polare è rilasciato e l'ovocita diventa un ovocita secondario. A maturazione precoce, i globuli lipidici e i granuli di tuorlo iniziano la coalescenza e la vescicola germinale inizia la sua migrazione verso il polo animale (migrazione GV, GVM). Con il progredire della maturazione, si osserva una massiccia coalescenza di inclusioni di tuorlo e la localizzazione delle GV in una posizione periferica. La maturazione finale degli ovociti (FOM) è caratterizzata dalla dissoluzione della membrana nucleare, un processo chiamato GV break down (GVBD). La trasformazione dei lipidi e delle inclusioni di tuorlo modifica la composizione

ionica del citoplasma, provocando una drastica incorporazione di acqua all'interno dell'ovocita, attraverso un aumento della pressione osmotica. Questa forte idratazione è particolarmente rilevante nei pesci pelagici e provoca un rapido aumento di 2-3 volte del volume degli ovociti. Dopo l'idratazione, la parete follicolare si rompe e l'ovocita viene ovulato nella cavità ovarico/addominale per poi essere rilasciato nell'acqua durante la deposizione delle uova (Pousis et al., 2012).

Durante la stagione riproduttiva, follicoli post-ovulatori (POF) possono essere trovati nell'ovario. Si tratta degli involucri follicolari che rimangono vuoti dopo il rilascio degli ovociti, hanno l'aspetto di strutture ripiegate, e scompaiono durante la riorganizzazione ovarica pochi giorni dopo l'ovulazione. Ovociti atresici o apoptotici sono anch'essi presenti. Si tratta di ovociti che hanno interrotto il processo di vitellogenesi o FOM a causa di un errore nella regolazione ormonale del processo riproduttivo (Gilkey, 1981). Quando gli ovociti muoiono, il rivestimento vitellino è frammentato e le cellule follicolari ipertrofiche invadono l'ooplasma per la fagocitosi. Il numero di ovociti atresici aumenta durante la pre-deposizione e la deposizione delle uova e riflette in parte il successo riproduttivo della femmina (Medina et al., 2021).

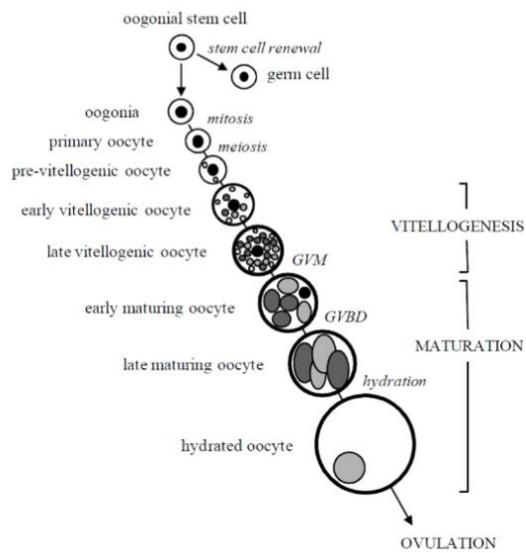


Figura 6. Schema esemplificativo dello sviluppo e maturazione degli ovociti.

1.7 Lo sviluppo testicolare nei maschi: spermatogenesi, maturazione e spermiazione

Le gonadi maschili sono anch'esse composte di tessuto germinale e somatico (Figura 7). Le cellule germinali si sviluppano durante la spermatogenesi per dare origine agli spermatozoi. Il tessuto somatico dei testicoli forma i tubuli seminiferi e sostiene il tessuto connettivo, così come le cellule somatiche specializzate, le cellule di Leydig e del Sertoli (Schulz et al., 2010). Queste cellule somatiche offrono un supporto strutturale e funzionale alle cellule germinali e giocano un ruolo cruciale nella produzione di ormoni e altri fattori necessari alla differenziazione delle cellule germinali. Le cellule del Sertoli avvolgono le cellule germinali per formare unità chiamate cisti o spermatocisti.

La somma di tutte le cisti costituisce l'epitelio germinale dei testicoli. Le cellule del Sertoli sono attaccate ad una membrana basale, che separa l'epitelio germinale dal compartimento interstiziale. Il compartimento interstiziale è formato da tessuto somatico, in cui si trovano le cellule di Leydig, tra i tubuli seminiferi. Le cellule di Leydig, come le cellule del Sertoli, sono anche cellule endocrine specializzate, con un ruolo importante nella produzione degli ormoni necessari per lo sviluppo delle cellule germinali (Abascal et al., 2004). Il processo della spermatogenesi può essere suddiviso in tre fasi principali, 1) la proliferazione mitotica degli spermatogoni, 2) la divisione meiotica degli spermatociti, e 3) la trasformazione degli spermatidi aploidi in spermatozoi flagellati (spermiogenesi). Attraverso queste fasi, le cellule germinali passano attraverso differenti stadi dello sviluppo: spermatogoi A e B, spermatociti primari (2n) e secondarie (1n), spermatidi e spermatozoi (Lancieri, 2007).

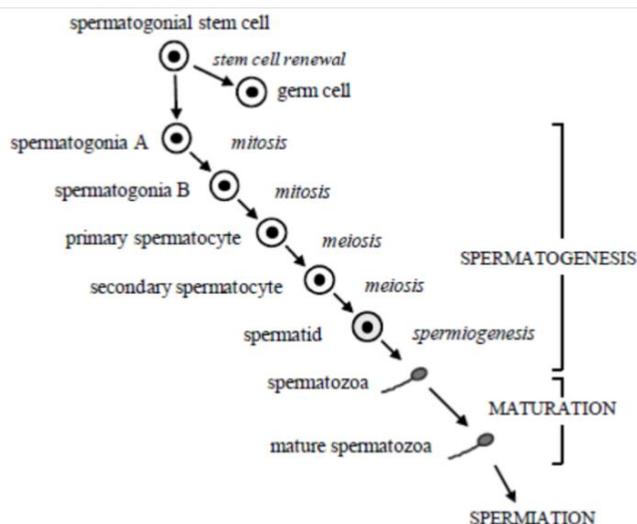


Figura 7. Schema degli stadi di spermatogenesi, maturazione e spermiazione.

Durante la fase di proliferazione mitotica degli spermatogoni (fase 1), ciascun spermatogonio passa attraverso diversi cicli di divisioni mitotiche, che vanno da cinque a quindici, a seconda della specie. Durante la divisione, la citodieresi è incompleta e le cellule figlie mantengono ponti citoplasmatici diretti tra loro, rimanendo insieme in un cluster, chiamato spermatocisti. Questo gruppo di cellule figlie è quindi formato da cloni di spermatogoni, poiché provengono tutti da una singola cellula originale. Ogni cisti è avvolta da una parete di cellule somatiche del Sertoli che mantengono i diversi cloni separati l'uno dall'altro. Durante questa fase di proliferazione mitotica, gli spermatogoni passano prima attraverso una fase di divisione lenta (spermatogoni A) e poi attraverso una fase di divisione rapida (spermatogoni B). L'ultima divisione mitotica di spermatogoni B dà luogo a spermatociti primari, che entrerà nel processo della meiosi (fase 2). Durante la seconda fase, gli spermatociti primari procedono alla prima divisione meiotica, in cui avviene la duplicazione del DNA e la ricombinazione delle informazioni genetiche, portando alla formazione di spermatociti secondari. Questi entrano rapidamente nella seconda divisione meiotica, senza duplicazione del DNA, che porta alla formazione di cellule germinali aploidi, gli spermatidi. Gli spermatidi entrano nel processo di spermatogenesi (fase 3), in cui gli spermatidi aploidi differenziano in spermatozoi flagellati. Questo processo non comporta proliferazione cellulare,

ma solo trasformazione cellulare, che include una riduzione drastica delle dimensioni (più dell'80%) a causa della condensazione del nucleo e l'estrusione del contenuto citoplasmatico alle cellule del Sertoli circostanti. Inoltre, la concentrazione di mitocondri, la formazione del collo e del flagello avviene in questo momento. Una volta che la spermiogenesi è completata, gli spermatocisti rompono la parete cellulare del Sertoli e gli spermatozoi flagellati vengono rilasciati nel lume del testicolo. Qui, gli spermatozoi subiranno il processo finale di maturazione o di capacitazione, con cui acquisiscono la capacità fertilizzante (capacità della motilità). La maturazione si verifica durante la migrazione degli spermatozoi lungo il dotto efferente e consiste esclusivamente in cambiamenti fisiologici. Contemporaneamente alla maturazione dello sperma, il dotto efferente produce una elevata quantità di liquido (idratazione degli spermatozoi), portando alla formazione del fluido contenente gli spermatozoi in sospensione (Abascal et al., 2008).

1.8 Melanomacrofagi

I macrofagi sono cellule che svolgono un ruolo fondamentale nella difesa dell'organismo. Si occupano della rimozione dei “detriti” durante le fasi di involuzione e riparazione dei tessuti, eliminano microrganismi estranei per mezzo del processo di fagocitosi, assorbono ed elaborano gli antigeni, eliminano cellule danneggiate o apoptotiche (cellule che vanno incontro a

morte programmata per il mantenimento del numero di cellule di un sistema).

I Melanomacrofagi (MMs) sono macrofagi contenenti tre diversi pigmenti: melanina, lipofuscina/ceroide ed emosiderina, possono trovarsi singoli oppure aggregarsi per formare dei centri (MMCs) e sono generati nei tessuti ematopoietici (milza e rene).

Gli MMCs e MMs sono presenti non solo nei tessuti ematopoietici, ma anche nelle gonadi attraverso meccanismi di diapèdesi e migrazione all'interno dei vasi sanguigni (Roberts & Agius, 2008).

La densità dei melanomacrofagi, sia essa dei singoli o dei centri, è regolata da fattori intrinseci quali età, peso, sesso, condizione nutrizionale e la presenza di infezioni (batteriche, virali e/o parassitarie).

In un interessante studio sulla caratterizzazione 3D dei MMCs nel pesce marino *Myoxocephalus scorpius*, gli autori hanno analizzato la presenza di MMCs nel fegato, nel pancreas e nelle branchie: è stato osservato che i centri erano ben strutturati e la maggior parte dei centri nel fegato erano strettamente associati alla parete dei vasi sanguigni o ai numerosi dotti biliari o ad aree necrotiche (Mai Dang et al., 2019). Nel fegato di *Thunnus thynnus*, gli MMCs sono osservabili in prossimità dei vasi sanguigni per questo motivo si può dedurre che una delle loro funzioni possa essere lo stoccaggio e la raccolta degli agenti patogeni provenienti dal sangue ed essere coinvolti nel riciclo del ferro

fagocitando gli eritrociti danneggiati (Roberts & Agius, 2008; Agius & Roberts, 2003). Uno studio condotto da Qualhatoa et al., (2018) su *Poecilia reticulata* ha utilizzato gli MMCs come biomarcatori istopatologici dell'impatto ambientale delle nanoparticelle di ossido di ferro in ambiente acquatico. MMs e MMCs quindi, possono essere utilizzati come biomarkers dello stato di salute degli animali. Lo studio condotto da Widdicombe et al., (2020) su milza, rene e fegato di *Thunnus maccoyii* ha evidenziato che gli MMCs non erano correlati con il condition factor index (indice frequentemente utilizzato negli allevamenti per monitorare l'aumento di peso degli animali) ma che tra gli stessi individui allevati c'erano delle differenze nella densità e nella struttura dei MMCs, probabilmente dovute alla mancanza di una dieta variegata come in natura. Inoltre, lo stesso studio ha osservato una correlazione positiva tra l'area degli MMCs e la dimensione degli animali (Saha et al., 2002). Uno studio recente ha valutato il numero di MMCs nel fegato di giovanili e adulti di pesce gatto di mare, *Sciades herzbergii*, proveniente da aree con diversi livelli di inquinamento, riscontrando un numero maggiore di MMCs negli animali provenienti dalle zone più inquinate, osservando inoltre una correlazione tra l'aumento di MMCs e la frequenza delle piogge che portano ad un aumento delle sostanze organiche e tossiche provenienti da attività di acquacoltura tramite il terreno (Viana et al., 2021).

1.9 PESCA

Il tonno rosso si annovera come una delle specie con il più alto valore commerciale tra i grandi pesci pelagici che vivono nell'Oceano Atlantico e nel Mar Mediterraneo (Api et al., 2018).

La pesca del tonno è documentata fin dall'antichità. Le pitture rupestri, presenti nella Grotta di Levanzo, testimoniano l'attività di pesca fin dal Neolitico. Numerosi scritti greci, come il "Faone" di Platone (Mastromarco, 1998) testimoniano come gli antichi studiassero e cercassero di perfezionare la pesca del tonno. Negli anni, infatti, si è assistito a una trasformazione da una pesca primitiva, effettuata con ami, lance e reti, ad una più tecnologica per aumentare la quantità del pescato.

Il perfezionamento e la ricerca di un metodo di pesca più efficiente hanno portato allo sviluppo della tonnara. La tonnara è un antico sistema di pesca costituito da una complessa barriera di reti, prima di fibra vegetale e ora di fibra sintetica, disposte verticalmente dalla superficie al fondo, raggiungendo generalmente una distanza di circa due chilometri. Questo sistema intercetta i tonni lungo le loro rotte migratorie e li intrappola convogliandoli verso un unico ambiente chiamato "camera della morte" (Figura 8). Oggi questo metodo è ancora utilizzato, ma a causa del traffico costiero, del rumore e

dell'attrezzo (Figura 9) (Sassu et al., 2001).

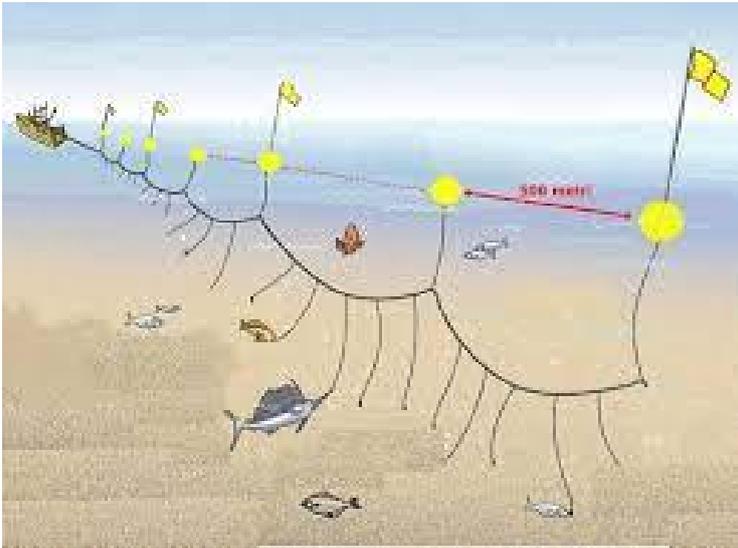


Figura 9. Rappresentazione grafica dell'utilizzo di un palangaro.

La pesca del tonno rosso tramite la circuizione prevede l'utilizzo di grosse imbarcazioni che trainano le reti con cui verranno catturati i banchi di tonno. Tali imbarcazioni, che possono raggiungere anche i 42 metri di lunghezza, sono denominate tonnare volanti (Sassu et al., 2001).

Le tonnare volanti sono inoltre dotate di speciali apparecchiature tecnologiche per l'individuazione dei banchi di tonno. L'attrezzatura delle reti a circuizione è composta da una rete di grandi dimensioni che accerchia il banco di tonni per poi catturarli chiudendo le reti dal basso. La rete misura circa 2 km in lunghezza e 250 m in profondità. Le dimensioni della maglia delle tonnare volanti utilizzate nel Mediterraneo raggiungono i 20 cm nella parte inferiore della rete, fino a diminuire a circa 12 cm nella parte centrale. La base superiore della rete

viene armata con una lima munita di galleggianti e la base inferiore con una lima munita di piombi, su cui sono sistemati degli anelli in ferro, in modo che la rete possa essere chiusa (Figura 10).

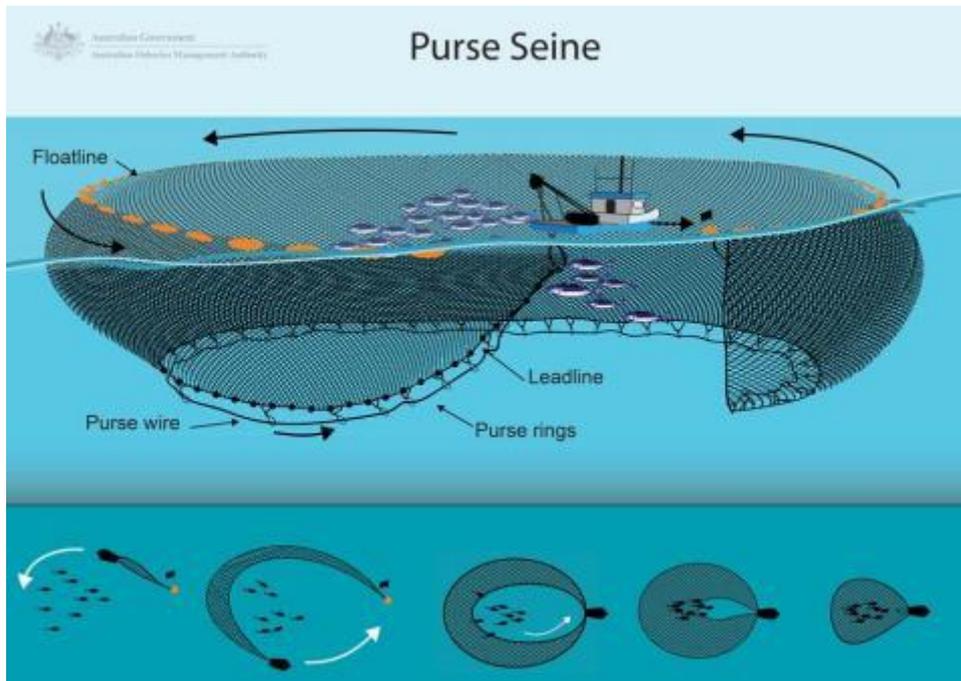


Figura 10. Rappresentazione grafica di una tonnara volante (*Purse Seine*) e il suo relativo meccanismo di azione.

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).

Negli ultimi anni, l'80% delle catture italiane di tonno rosso nel Mediterraneo avviene utilizzando reti a circuizione, catture pari a 3.961 t (stimate nel 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). 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 giapponese (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 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 una volta avvistati vengono raggiunti dall'imbarcazione che si trova più vicino. Il peschereccio prossimo all'area raggiunge la zona dove si trova il banco, 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. 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. Il peschereccio stringe la rete, il diametro del cerchio si riduce e, dal varco aperto, i tonni passano dalla rete alla gabbia. Il rimorchiatore traina negli impianti le gabbie contenenti i tonni. Il trasporto è un processo molto delicato, per non ferire gli esemplari, avviene alla velocità di un nodo marino e può durare anche diverse settimane, addirittura mesi, in relazione alla distanza dall'impianto. 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. Durante tale periodo, il contenuto di grasso 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.

1.10 Gestione della risorsa

Negli ultimi decenni si è assistito ad una diminuzione dell'abbondanza del tonno rosso, in particolare, lo sviluppo del mercato giapponese del sushi-sashimi durante gli anni '80 è stato l'evento più straordinario degli ultimi decenni, poiché ha reso lo sfruttamento del tonno rosso molto più redditizio di prima (Fromentin & Ravier 2005; Porch, 2005). Le catture annuali di tonno sono passate da 500.000 tonnellate negli anni '50 a oltre 400.000 tonnellate nel 2002, con un valore di esportazione che si avvicina ai 5 miliardi di dollari (Seconda Riunione del Comitato Tecnico Consultivo del Progetto FAO). La crescente domanda di tonno e di prodotti a base di tonno ha portato a un sovrasfruttamento, o addirittura all'esaurimento, di alcuni stock di tonno. Il tonno rosso, avendo un comportamento riproduttivo molto complesso e un brevissimo e preciso periodo di deposizione delle uova, è una specie estremamente vulnerabile. Il rischio di collasso dello stock sta generando un interesse particolare per la creazione di un'industria dell'acquacoltura per il tonno adeguata e sostenibile. Per poter sviluppare ciò però è richiesto lo sviluppo di tecnologie specifiche per l'acquacoltura del tonno date le numerose difficoltà che si riscontrano nell'allevamento di questa specie, che ad oggi si basa sulla cattura di individui giovanili dagli stock selvatici (Mylonas et al., 2010). L'Unione Europea, in seguito al sovrasfruttamento della risorsa, ha

deciso di regolamentare la pesca del tonno rosso, attribuendo ad ogni Stato membro il totale ammissibile di cattura (TAC) da parte delle flotte comunitarie. Dal 1982 al 1996 le catture di tonno rosso dell'Atlantico orientale e del Mediterraneo sono triplicate, raggiungendo la quota di 50.000 tonnellate annue, successivamente sono diminuite notevolmente, attestandosi intorno alle 32.000 t (Figura 11). Per questo motivo, nel 1997 è stata fondata la Commissione Internazionale per la Conservazione del Tonno dell'Atlantico, nota anche come ICCAT.

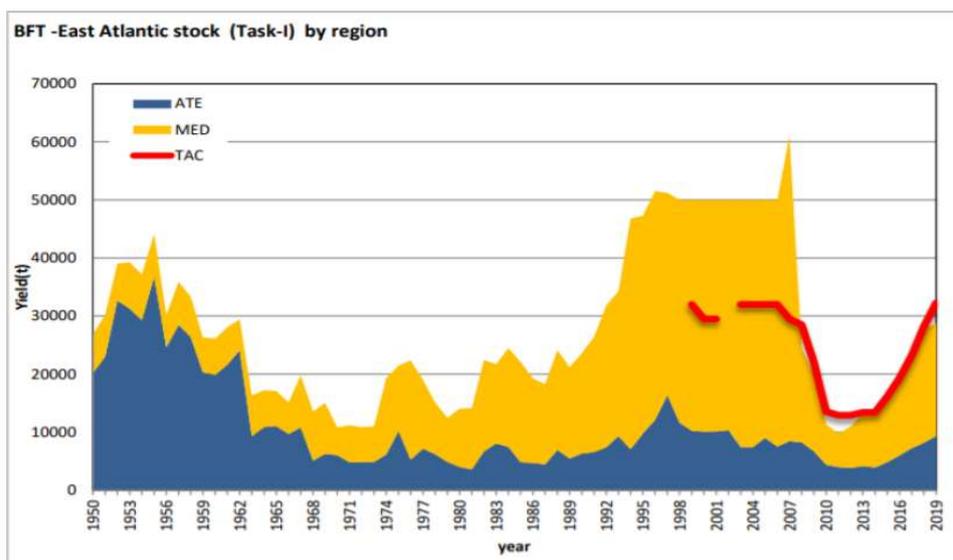


Figura 11. Catture totali dello stock orientale di *Thunnus thynnus* e zone di pesca. TAC, totale ammissibile di catture; MED, Mediterraneo; ATE, Atlantico.

L'ICCAT ha adottato un approccio pluriennale tramite 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 degli individui maturi della popolazione ed un incremento del tasso di mortalità imputato alla pesca. Tale declino sembra dovuto in larga parte alla domanda giapponese (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 di 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.

Per l'applicazione e il controllo complessivo di tutte queste misure, l'ICCAT ha avviato un progetto al fine di garantire l'efficacia e il rispetto di tali pratiche, stabilendo un controllo degli osservatori in tutte le operazioni che comportano il trasferimento o il trasbordo del tonno.

L'ICCAT ha anche una regolamentazione sulla pesca sportiva. Le normative in vigore sono le seguenti:

- divieto di catturare più di un esemplare al giorno;
- periodo di pesca consentito dal 16 giugno al 14 ottobre, con possibilità di proseguire fino al 31 dicembre, solo ed esclusivamente con la tecnica del catch and release;
- taglia minima del pescato fissata a 30 kg. o 115 cm. di lunghezza al patibolo (misurata, cioè, dalla punta della mascella superiore alla punta del raggio più corto della coda);
- obbligo di presentare la relativa dichiarazione di cattura all'Autorità Marittima entro 24 ore dallo sbarco;
- divieto di commercializzazione di esemplari catturati

2. Scopo della tesi

Thunnus thynnus è una specie sottoposta ad un intenso sfruttamento dovuto all'elevato valore economico che ricopre a livello globale. Il sovrasfruttamento di questa risorsa minaccia la stabilità della popolazione e portare al collasso dello stock se questo non viene gestito in maniera ottimale. Lo scopo di questa tesi è stato quello di valutare lo stato di salute riproduttiva dello stock pescato in

Adriatico tramite l'analisi dei parametri biometrici e tramite la quantificazione del grasso perigonadale e il numero di melanomacrofagi presenti nelle gonadi.

3. Materiali e Metodi

3.1 Campionamento

La raccolta dei campioni utilizzati in questo lavoro è stata resa possibile dalla collaborazione tra Università Politecnica delle Marche e i pescatori autorizzati alla pesca del tonno. Gli animali sono stati catturati tramite utilizzo del palangaro, una tipologia di pesca selettiva per tonni e pesci spada, all'interno del bacino del Mar Adriatico nel periodo febbraio-novembre 2021. Gli esemplari sono stati eviscerati e pesati a bordo dei pescherecci ed i loro organi adeguatamente conservati per le successive analisi condotte presso l'Università Politecnica delle Marche. I campioni sono stati prelevati nei mesi di febbraio, aprile, agosto, settembre, ottobre e novembre. Dei 197 esemplari pescati, sono stati selezionati almeno 5 maschi e 5 femmine per ogni mese di campionamento per un totale di 64 individui. Il criterio di selezione degli individui per ogni mese si è basato sulla rappresentazione eterogenea delle classi di taglia.

3.2 Analisi biometriche, indice gonadosomatico (GSI) ed indice del grasso perigonadale.

Per ogni animale analizzato in questo studio sono stati raccolti: peso eviscerato, lunghezza totale, peso della gonade e peso del grasso perigonadale.

L'indice gonadosomatico (GSI) è stato calcolato tramite la seguente formula:

$$\text{GSI} = (\text{GW}/\text{BW}) * 100$$

Dove GW è il peso della gonade e BW corrisponde al peso dell'animale eviscerato

3.3 Analisi Istologica

Per ogni animale sono state prelevate porzioni di gonade maschile e femminile per le analisi istologiche. I campioni sono stati fissati e conservati in una soluzione di formaldeide/glutaraldeide (NaH_2PO_4 - H_2O + NaOH + Formaldeide (36.5%) + Glutaraldeide (25%) + H_2O). In seguito, i campioni sono stati immersi in etanolo al 70% per 3 volte (15 min ciascuna) e infine conservati in etanolo al 70%.

Successivamente, i campioni sono stati sottoposti ad immersioni in concentrazioni crescenti di etanolo (80%, 95% e 100%) come previsto dal protocollo di inclusione istologica. In seguito, i campioni sono stati immersi in xilene e successivamente inclusi in paraffina. Per ogni campione sono state tagliate 3 sezioni di 4 μm di spessore con l'utilizzo del microtomo (Leica RM2125 RTS). Per ogni campione sono stati preparati 3 vetrini ciascuno con 3 sezioni di gonade. per un totale di 9 sezioni per campione. I vetrini sono stati

colorati con ematossilina/eosina e osservati al microscopio ottico (Zeiss, Oberkochen, Germany) con un ingrandimento 10x al fine di indentificarne il sesso e lo stadio riproduttivo. Per ogni vetrino sono state scattate 5 microfotografie ad ingrandimento 20x utilizzando una fotocamera digitale (Axiocam 105 color) per l'analisi dei melanomacrofagi. Per la quantificazione e la misurazione dell'area dei melanomacrofagi all'interno delle sezioni di gonade è stato utilizzato il software ImageJ/Fiji.

3.4 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software GraphPad per l'analisi ANOVA e il software JASP è stato utilizzato per l'analisi di correlazione di Pearson. L'ANOVA unidirezionale seguita dal test post hoc di Tukey è stata eseguita per evidenziare le differenze di tutti i parametri biometrici, dei melanomacrofagi e dei lipidi derivanti dall'analisi istologiche.

4 Risultati

4.1 Analisi biometriche, indice gonadosomatico (GSI) e indice del grasso perigonadale

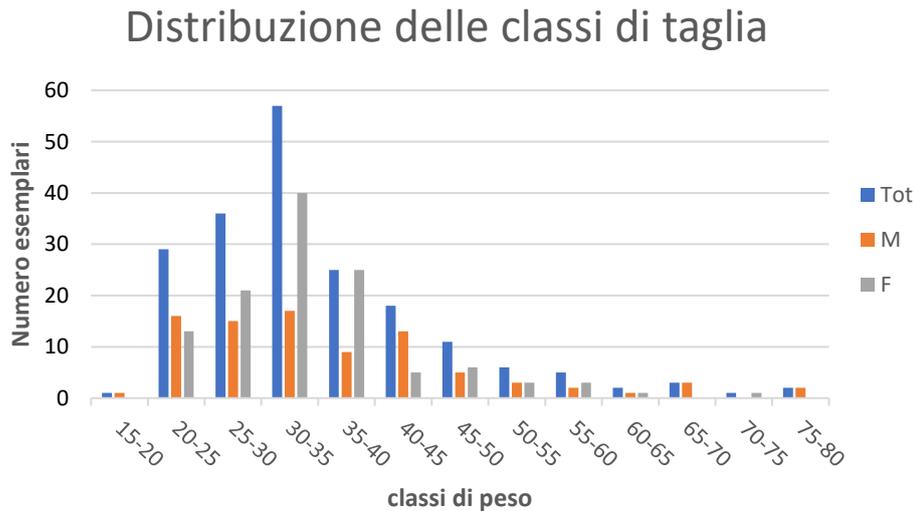


Figura 14. Distribuzione delle classi di taglia degli esemplari di *Thunnus thynnus*.

I dati ottenuti durante il campionamento, come riportato in figura 14, mostrano che all'interno dell'Adriatico la taglia predominante è rappresentata da esemplari nella fascia di peso tra i 30 e i 35 kg, con particolare abbondanza di esemplari femminili.

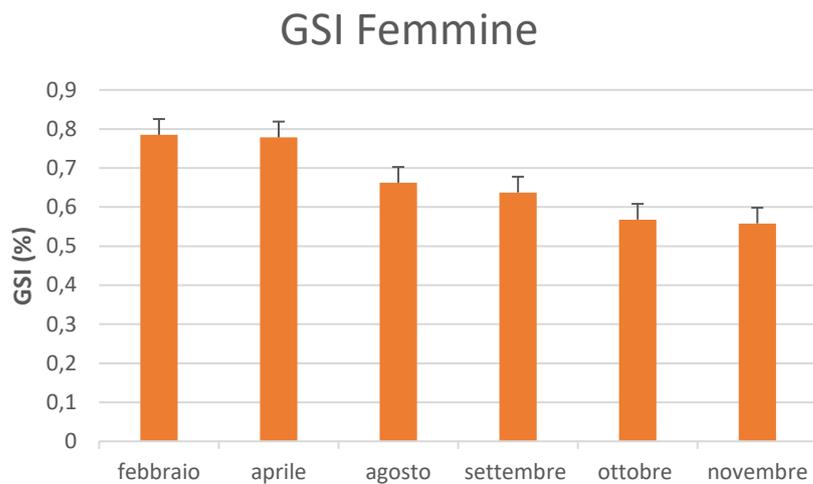


Figura 9 Valori medi dell'indice gonadosomatico (GSI) degli individui femminili nei diversi mesi di campionamento.

Dal grafico in figura 9 si evince che i valori di GSI non differiscono in maniera significativa tra i vari mesi di campionamento con una leggera tendenza a diminuire nei mesi successivi ad aprile. I valori più elevati sono stati osservati nel mese di febbraio, nonostante rimangano in tutti i mesi inferiori all'1.

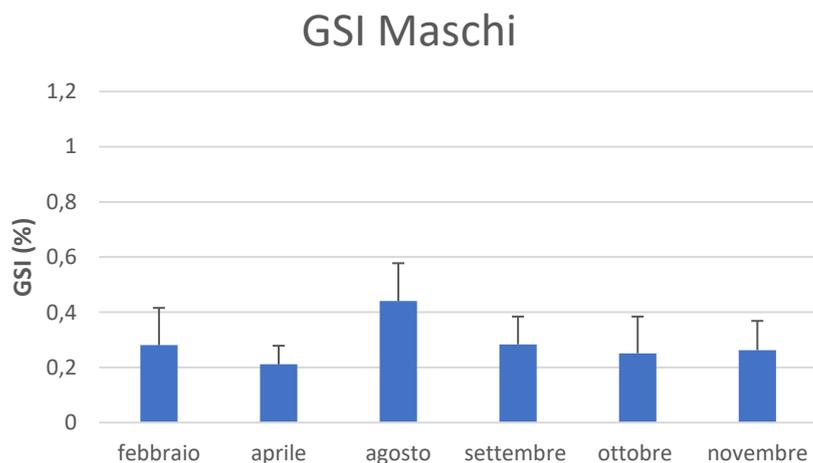


Figura 10. Valori medi dell'indice gonadosomatico (GSI) degli individui maschili nei diversi mesi di campionamento.

In figura 10 si può osservare che il GSI degli individui maschili nei vari mesi non supera mai lo 0.4 fatta eccezione per il mese di agosto.

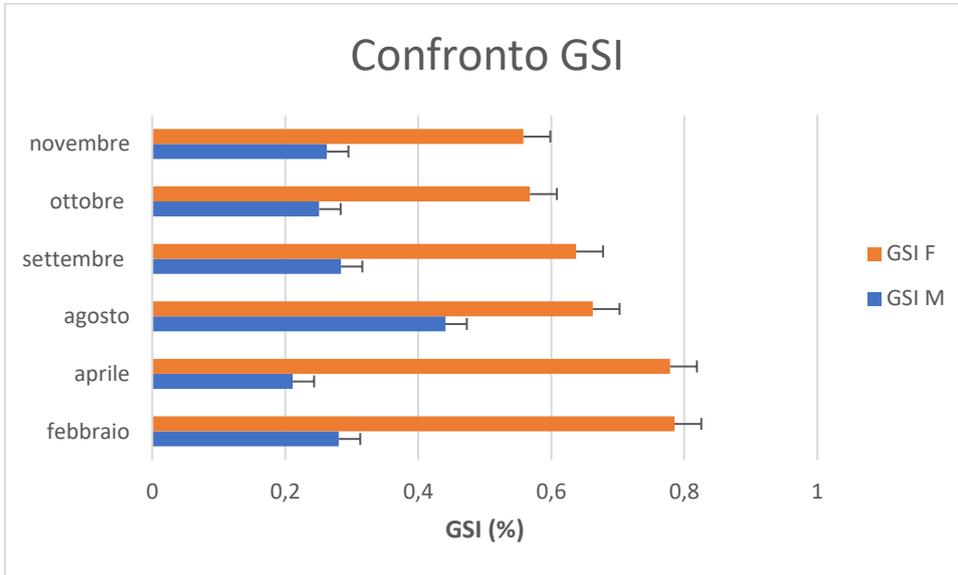


Figura 11. Valori medi di GSI degli individui maschili e femminili di *Thunnus thynnus* nei vari mesi di campionamento.

Il confronto dei valori di GSI tra maschi e femmine nei diversi mesi di campionamento mostra valori mediamente più alti nelle femmine piuttosto che nei maschi in tutti i mesi considerati.

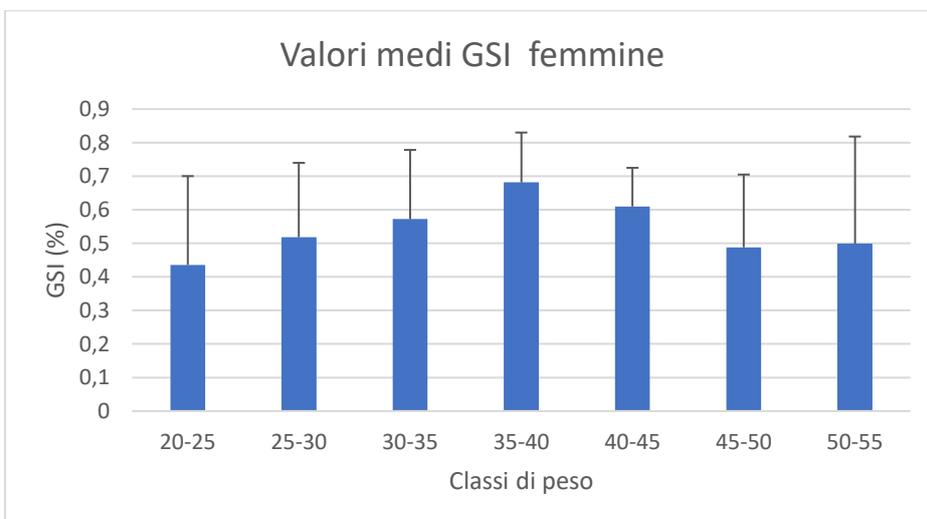


Figura 12. Valori medi di GSI degli individui femminili nelle varie classi di peso.

Nel grafico in figura 12 possiamo notare che nonostante non ci siano differenze significative tra le classi di taglia, il valore più alto di GSI, risiede nella fascia di peso tra i 35 e i 40 con un valore medio di 0,7 %.

Inoltre, è possibile osservare che i valori di GSI hanno un trend in aumento fino alla classe di peso 35-40 per poi diminuire fino alla classe 45-50 e 50-55. Con valori di GSI di 0,5% per entrambi.

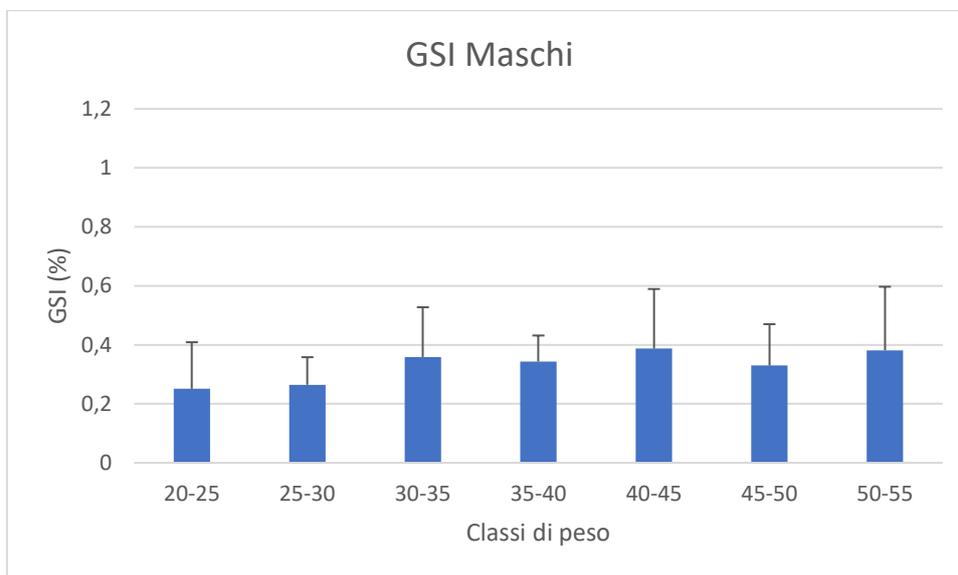


Figura 13. Valori medi di GSI degli individui maschili nelle varie classi di peso.

Nei maschi invece abbiamo una situazione diversa, i valori di GSI non mostrano alcun trend e il valore più alto di GSI è stato osservato nella classe 40-45 (Figure 13).

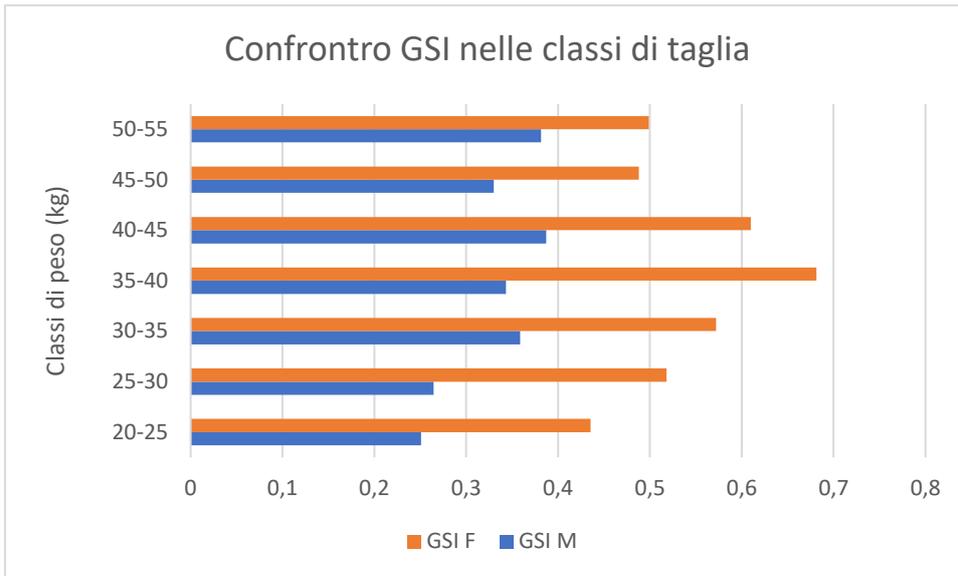


Figura 14. Confronto tra i valori medi di GSI maschile e femminile nelle varie classi di peso. Dall'immagine 14 notiamo come gli individui femminili abbiano un indice GSI con valori superiori a quelli maschili.

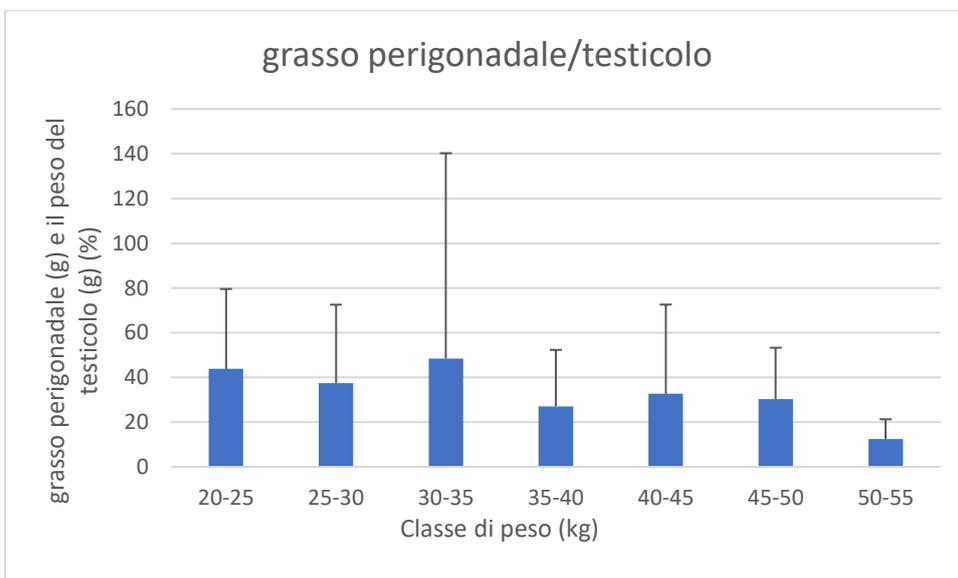


Figura 15. Rapporto tra il grasso perigonadale (g) e il peso del testicolo (g) per classi di peso. Nell'immagine 15 notiamo come per gli individui di sesso maschile i valori più alti li ritroviamo nella classe di peso compresa tra i 35 e i 40kg.

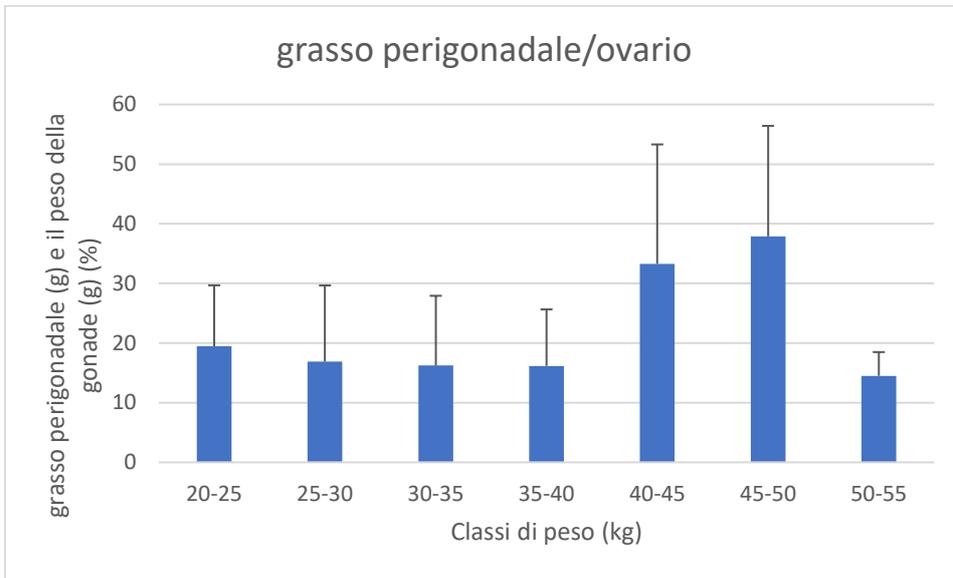


Figura 16. Rapporto tra il grasso perigonadale (g) e il peso dell'ovario (g) per classi di peso. Nell'immagine 16 notiamo che nelle femmine i valori più alti li ritroviamo in quegli individui adulti che vanno dai 40 kg fino ai 50 kg.

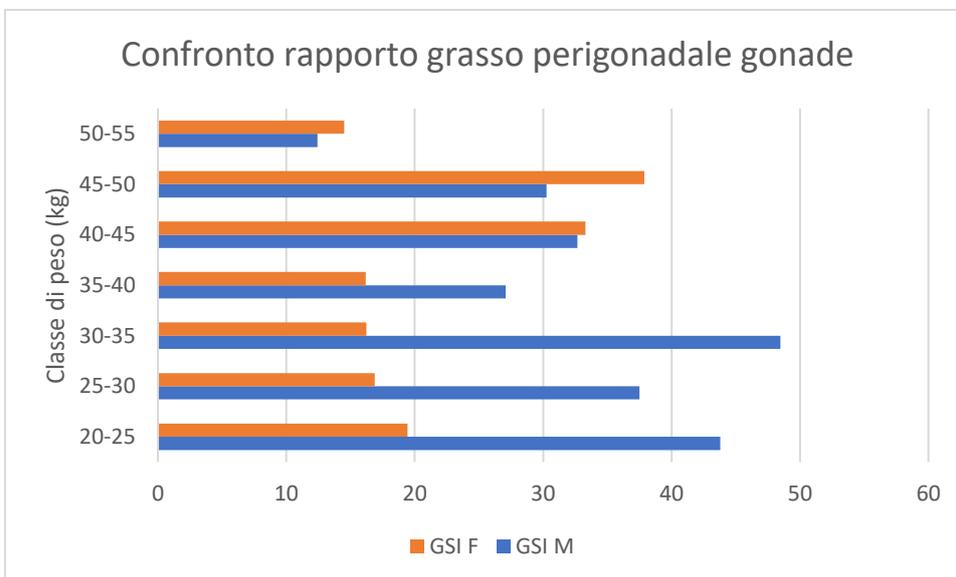


Figura 17. Confronto tra il grasso perigonadale maschile e quello femminile nelle varie classi di peso.

Nell'immagine 17 sono stati confrontati i due sessi e notiamo che comunque gli individui di sesso maschile hanno un rapporto grasso/gonade superiore rispetto agli individui di sesso femminile. Valore ancor più evidente nelle classi di peso compresi tra i 20 e i 40 kg.

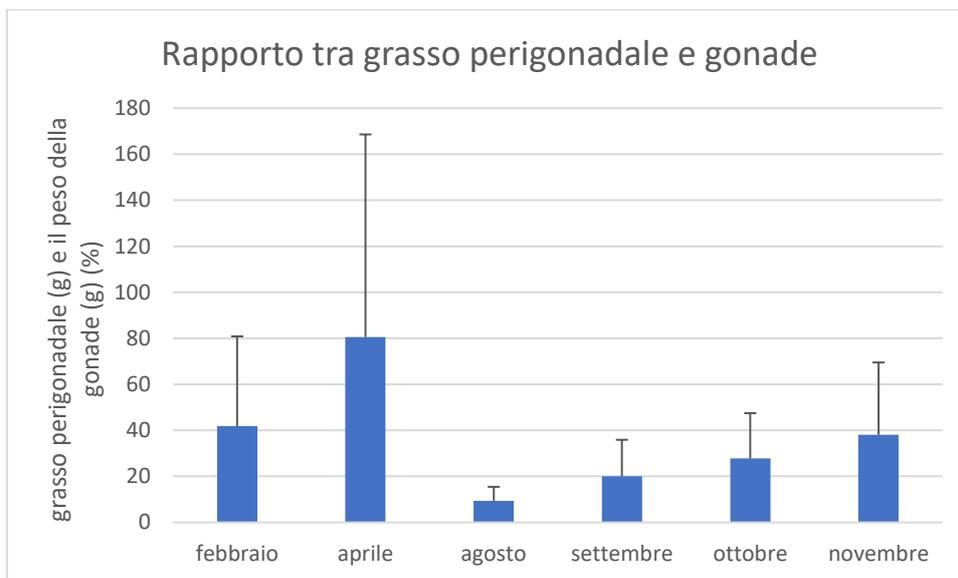


Figura 18. Rapporto tra il grasso perigonadale (g) e il peso della gonade (g) di tutti gli individui tra i diversi mesi di campionamento.

Nell'immagine 18 possiamo notare in modo chiaro come il rapporto grasso/gonade è maggiore nei mesi di febbraio aprile per poi diminuire drasticamente nel mese di agosto per poi successivamente aumentare gradualmente nei mesi successivi.

4.2 Analisi istologiche

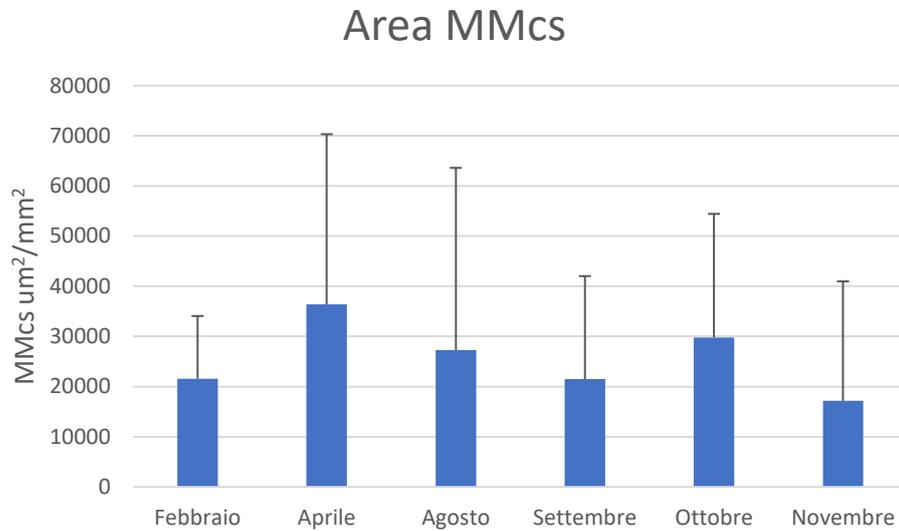


Figura 19. Area dei centri dei melanomacrofagi (MMCs) in campioni di gonade maschile e femminile durante i vari mesi di campionamento.

Dal grafico in figura 19 notiamo come l'area dei melano vari nei mesi di campionamento. I mesi che dimostrano un picco sono quelli di aprile e ottobre nonostante non ci siano differenze statisticamente significative.

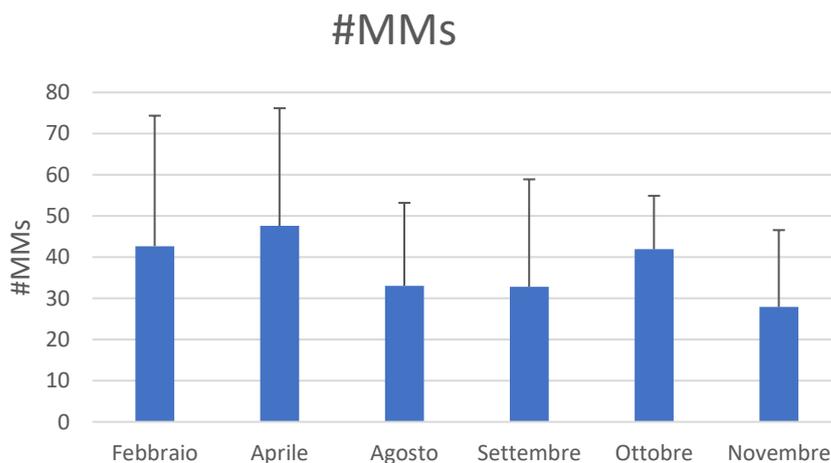


Figura 20. Numero dei melanomacrofagi singoli (#MMCs) in campioni di gonade maschile e femminile durante i vari mesi di campionamento.

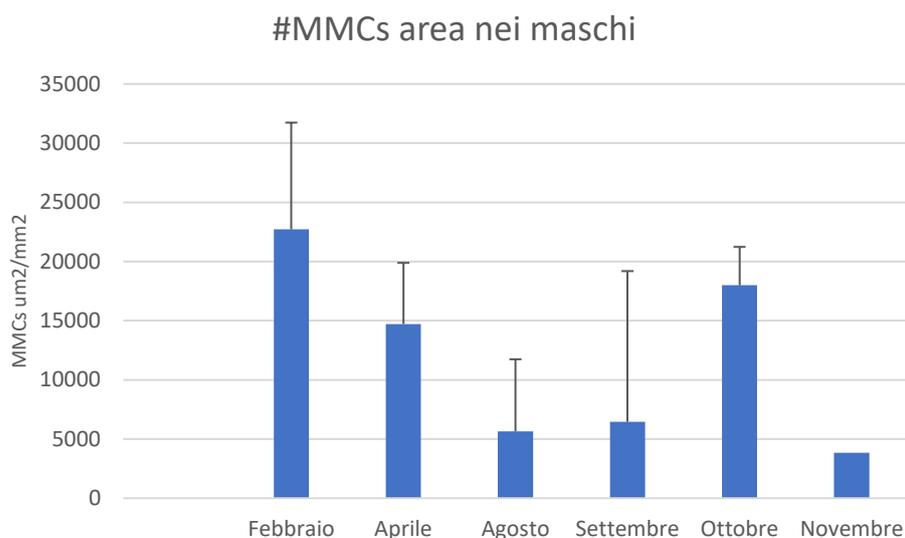


Figura 21. Grafico rappresentativo dell'area dei centri di melanomacrofagi negli individui maschili.

Nella figura 21 notiamo come l'area dei centri dei melanomacrofagi nei maschi raggiunge valori più alti nel mese di febbraio per poi calare fino al mese di agosto e infine risalire nel mese di ottobre.

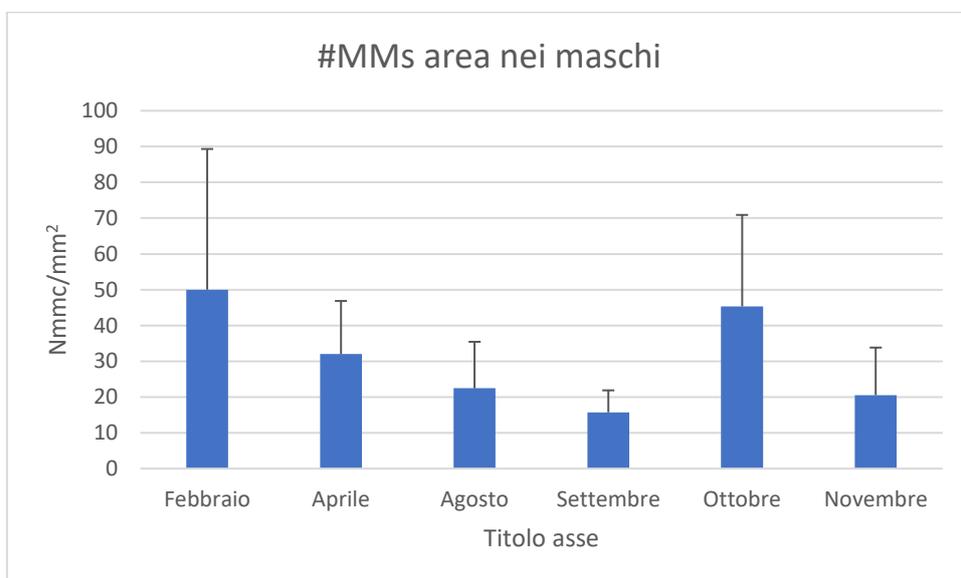


Figura 22. Grafico rappresentativo dell'area dei melanomacrofagi singoli negli individui maschili.

Situazione analoga per il numero dei melano, che hanno valori più alti nei mesi di febbraio e ottobre (figura 22).

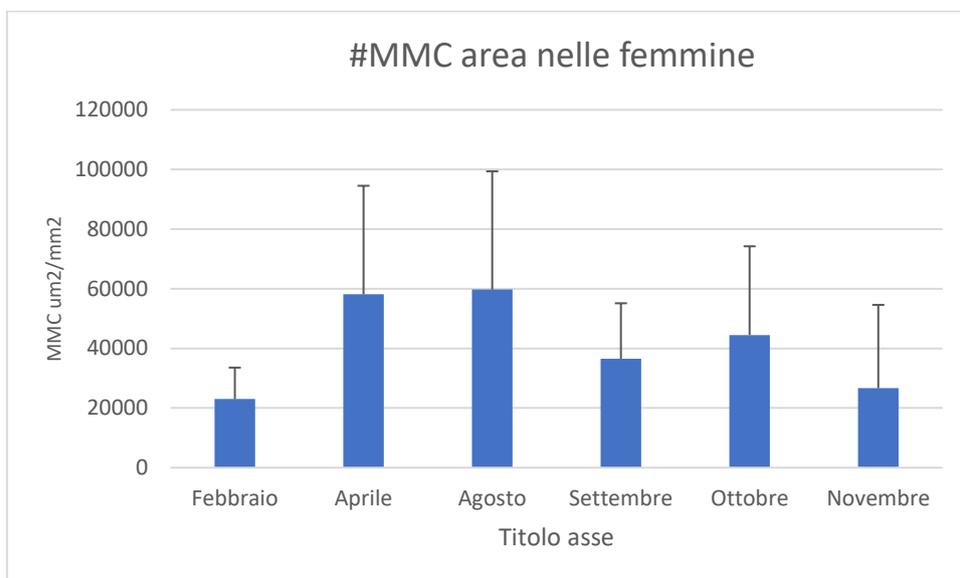


Figura 23. Grafico rappresentativo dell'area dei centri di melanomacrofagi negli individui femminili.

Valutando l'andamento dei melanomacrofagi in individui di sesso femminile i valori più alti si osservano nei mesi di aprile e agosto (Figura 23).

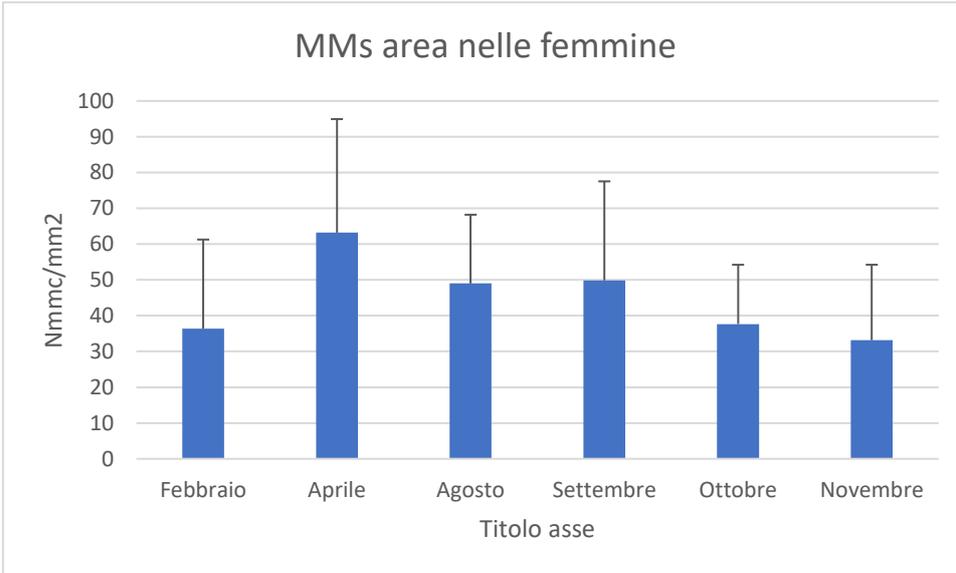


Figura 24. Grafico rappresentativo dell'area dei melanomacrofagi singoli negli individui femminili.

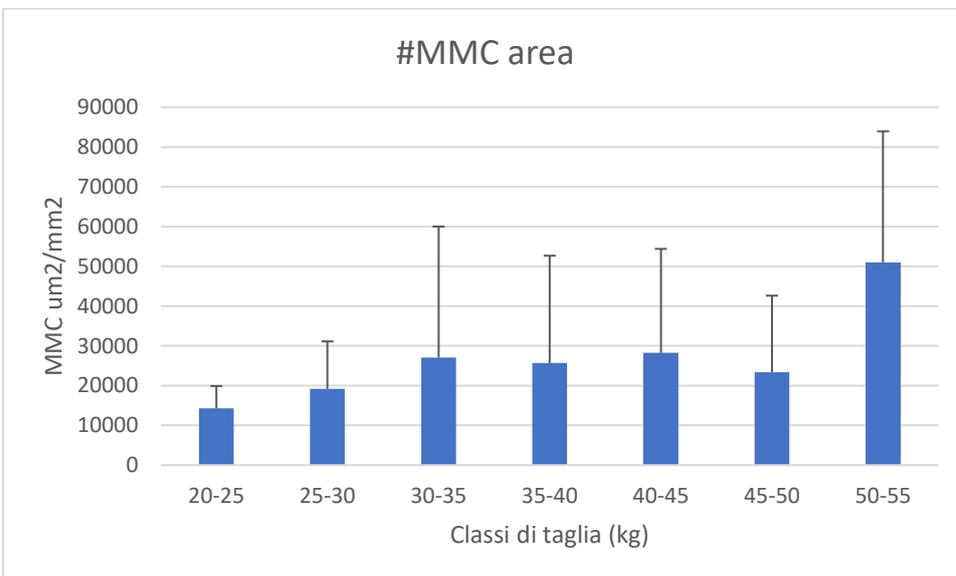


Figura 25. Rappresentazione grafica dell'area occupata dai centri dei melanomacrofagi nelle varie classi di taglia

Come notiamo dal grafico gli animali che hanno una taglia maggiore hanno un'area di melano maggiore rispetto alle classi di taglia inferiore (figura 25).

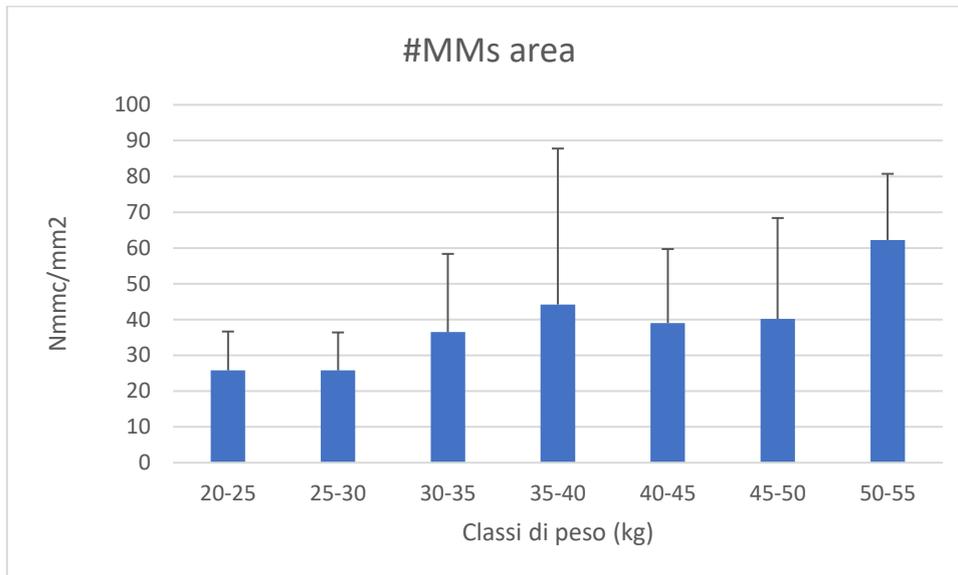


Figura 26. Rappresentazione grafica dell'area dei melanomacrofagi singoli nelle varie classi di taglia.

Situazione analoga per quanto riguarda il numero di melano che rimane più o meno costante nelle varie classi per poi avere un picco in quella più grande (50-55) kg (Figura 26).

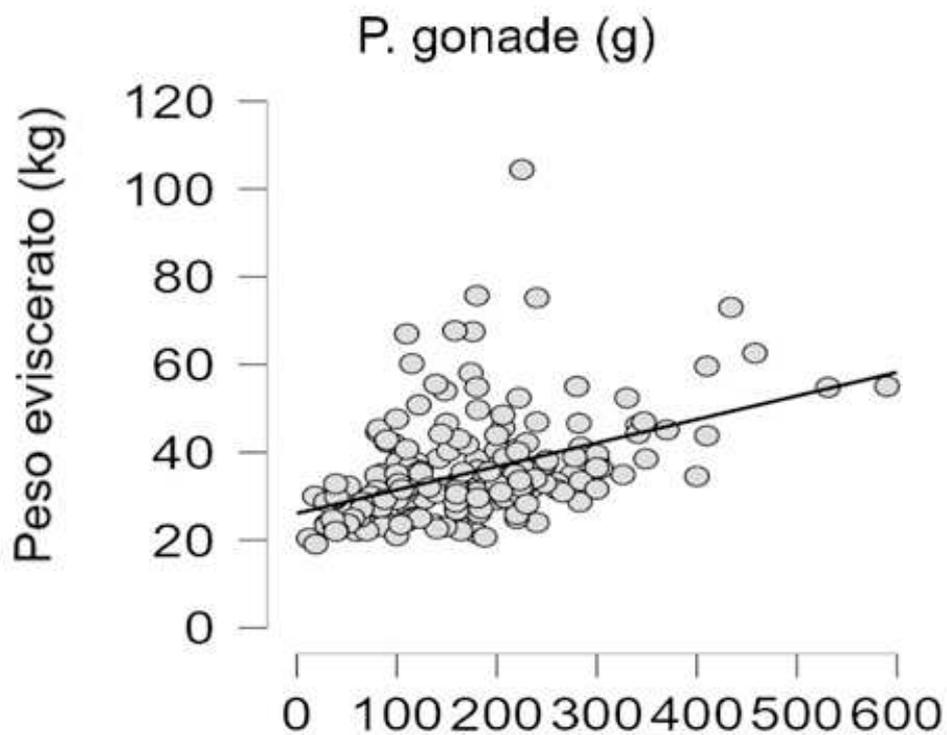
4.3 Correlazione di Pearson

Dall'analisi statistica di correlazione di Pearson utilizzando: peso eviscerato, peso della gonade, peso del grasso perigonadale, indice gonadosomatico, rapporto tra peso del grasso perigonadale e gonade stessa e periodo di pesca, è stata ottenuta la tabella di correlazione riportata in tabella 1.

		Peso eviscerato (kg)	P gonade (g)	Grasso perigon. (g)	GSI	Grasso/gon.	Data
Peso eviscerato (kg)	Pearson's r	—					
	p value	—					
P gonade (g)	Pearson's r	0.430	—				
	p value	< .001***	—				
Grasso perigon. (g)	Pearson's r	0.696	0.422	—			
	p value	< .001***	< .001***	—			
GSI	Pearson's r	-0.056	0.830	0.062	—		
	p value	0.431	< .001***	0.387	—		
Grasso/gon.	Pearson's r	0.281	-0.236	0.550	-0.438	—	
	p value	< .001***	< .001***	< .001***	< .001**	—	
Data	Pearson's r	-0.391	-0.405	-0.416	-0.230	-0.216	—
	p value	< .001***	< .001***	< .001***	0.001**	0.002**	—

Tabella 1. Correlazione di Pearson. Peso eviscerato, peso dell'animale eviscerato in kg; P gonade, peso della gonade in g; Grasso perigon., peso del grasso perigonadale in g; GSI, indice gonadosomatico; Grasso/gon., indice percentuale del rapporto peso grasso/ peso gonade; Data, periodo di campionamento. * p < .05, ** p < .01, *** p < .001.

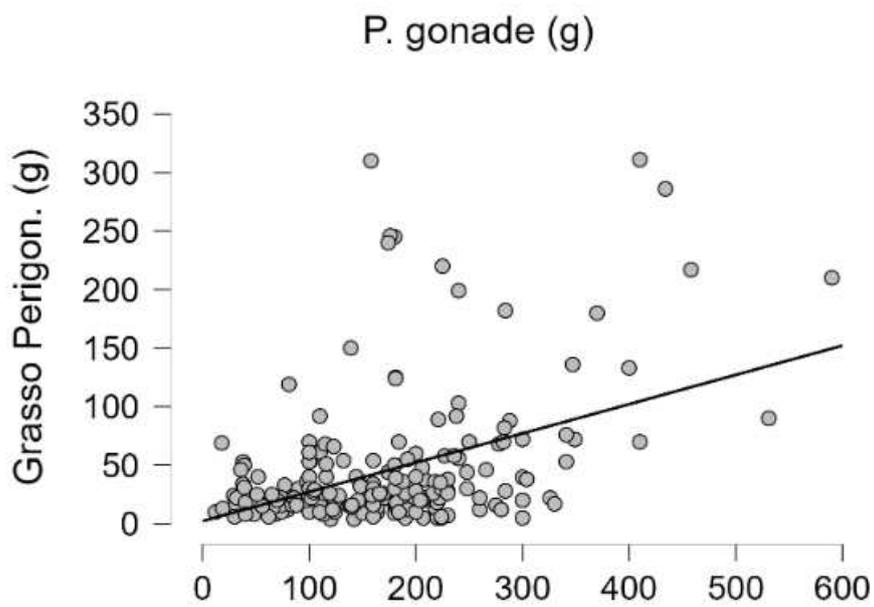
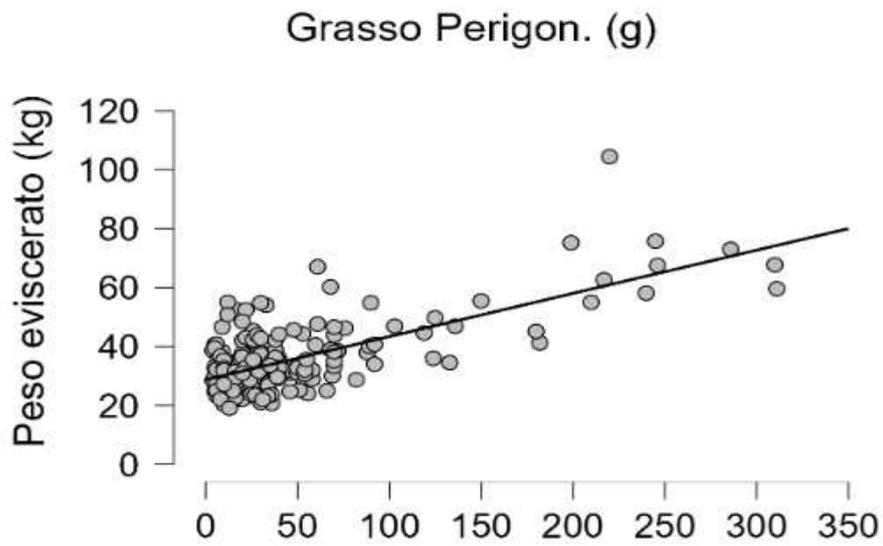
In particolare, dalla tabella in tabella 1 si evince: (1) un rapporto di correlazione positivo tra il peso degli animali campionati e il peso stesso della gonade (evidenziato anche dal grafico riportato in figura 27).



(Indice di Pearson's = 0.430 e p-value < 0.001)

Figura 27. Grafico correlazione tra peso espresso in kg e il peso della gonade

(2) un rapporto di correlazione positivo tra grasso perigonadale e peso sia dell'animale che della gonade (confermata anche dal grafico riportato in figura 28). Anche il grasso perigonadale, che l'animale immagazzina durante il periodo non riproduttivo per poi utilizzarlo durante il periodo di riproduzione, aumenta all'aumentare delle dimensioni corporee e di quelle della gonade (figura 28).



(Indice di Pearson's = 0.696 e 0.422 con p-value <0.001 in entrambi i casi)

Figura 28. Grafici di correlazione tra peso corporeo, peso della gonade e peso del grasso perigonadale.

Un'ulteriore osservazione che possiamo compiere osservando la tabella 1 è che il peso di tutti gli animali campionati ha un rapporto di correlazione negativo con le date di campionamento.

		Data	Peso eviscerato (kg)	P gonade (g)	MMCs area	MMs area	Grasso perigon. (g)	Sex
Data	Pearson's r p value	— —						
Peso eviscerato (kg)	Pearson's r p value	-0.217 0.085	— —					
P gonade (g)	Pearson's r p value	-0.176 0.165	0.341** 0.006	— —				
MMCs area	Pearson's r p value	0.165 -0.104	0.164 0.196	0.275* 0.028	— —			
MMs area	Pearson's r p value	-0.193 0.126	0.252* 0.044	0.154 0.225	0.747*** <.001	— —		
Grasso perigon. (g)	Pearson's r p value	-0.287* 0.021	0.706*** <.001	0.496*** <.001	0.180 0.155	0.172 0.173	— —	
Sex	Pearson's r p value	0.018 0.891	-0.055 0.667	0.420*** <.001	0.525*** <.001	0.249* 0.048	0.157 0.214	— —

Tabella 2. Correlazione di Pearson. Data, periodo di campionamento; Peso eviscerato, peso dell'animale eviscerato in kg; P gonade, peso della gonade in g; MMCs area, area centri melanomacrofagi ($\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$); MMs area, area dei singoli melanomacrofagi ($\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$); Grasso perigon., peso del grasso perigonadale in g; Sex, sesso dell'esemplare. * $p < .05$, ** $p < .01$, *** $p < .001$.

Tra peso della gonade e area dei centri di melanomacrofagi osserviamo una correlazione positiva, come illustrato in tabella 1 e 2 (Indice di Pearson's = 0,275 e p-value < 0,05).

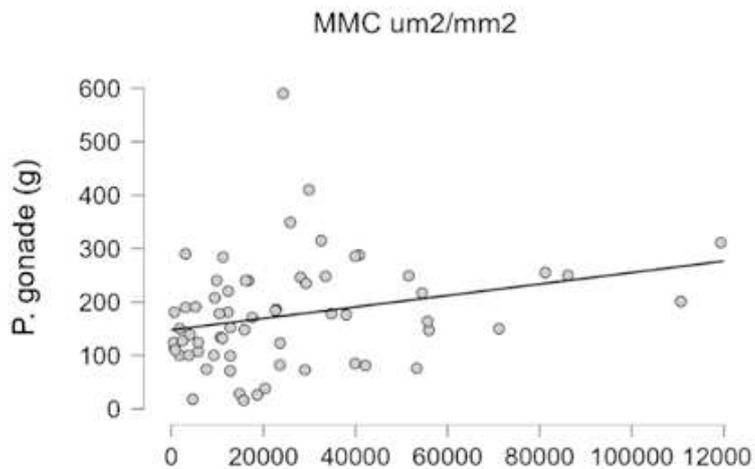
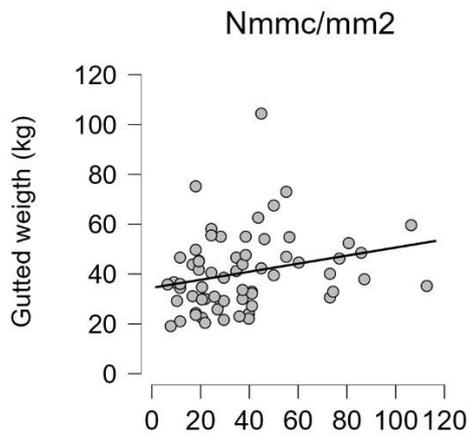


Figura 29. Grafico di correlazione tra peso della gonade e area dei MMCs.

Non abbiamo una correlazione significativa tra peso e l'area dei centri di Melanomacrofagi (figura 29).

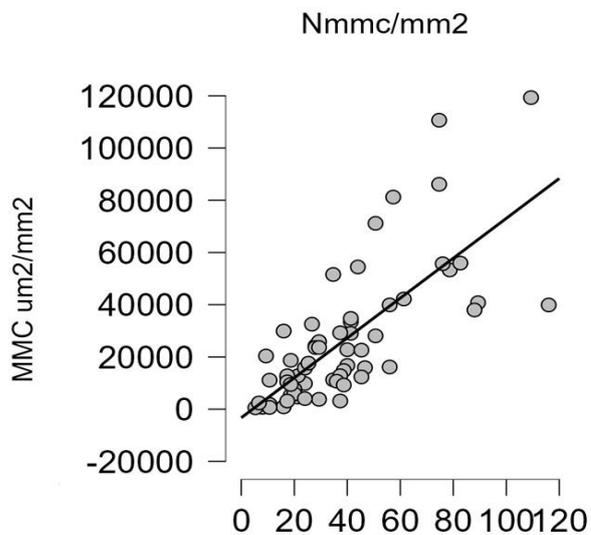
Possiamo osservare una situazione opposta considerando l'area dei melanomacrofagi singoli. Dal grafico in figura 30 si evince che esiste una correlazione debole tra N_{mmc}/mm^2 e il peso dell'animale,



(Indice di Pearson's = 0,252 e p-value < 0,05)

Figura 30. Grafico correlazione tra il peso corporeo e i MMs

Mentre tra l'area dei melanomacrofagi singoli e tra quella dei centri abbiamo una forte correlazione positiva (figura 31).

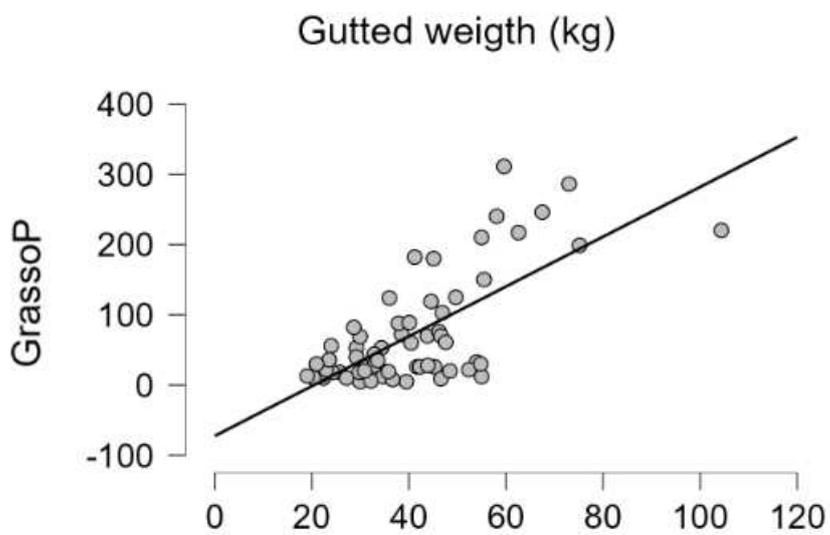


(Indice di Pearson's = 0,747 e p-value < 0,001)

Figura 31. Grafico correlazione tra MMCs e MMs.

Non abbiamo correlazione tra l'area dei singoli melanomacrofagi e il peso della gonade.

Andando ad analizzare il grafico in figura 32 inoltre possiamo osservare come tra il peso del grasso perigonadale e il peso sia dell'animale che della gonade vi è un rapporto di correlazione positiva (p-value <0.001).



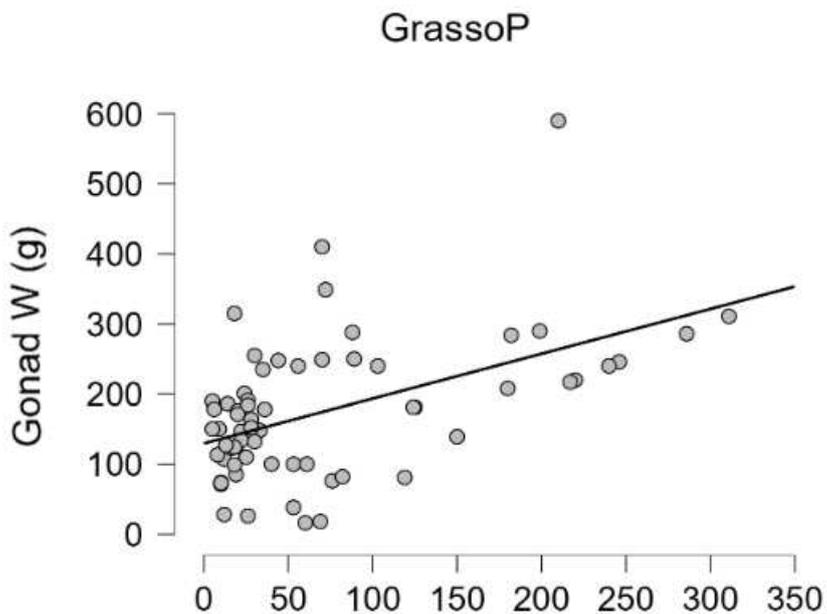


Figura 32. Grafico di correlazione tra peso dell'animale, peso della gonade e peso del grasso perigonadale.

Cosa che invece non osserviamo tra peso del grasso perigonadale e l'area sia dei centri che dei singoli melanomacrofagi.

Tra data di campionamento e gli altri parametri inseriti all'interno del grafico non vi è correlazione, tranne che per il peso del grasso perigonadale, dove osserviamo un rapporto di correlazione positiva con $p\text{-value} < 0.5$.

Infine, possiamo osservare che tra sesso e peso della gonade vi è un rapporto di correlazione positivo con $p\text{-value} < 0.001$, così come tra sesso e l'area dei melanomacrofagi.

Non osserviamo correlazione tra sesso e peso dell'animale, così come tra sesso e peso del grasso perigonadale.

5. Discussioni

Lo scopo di questo progetto di tesi è quello di valutare lo stato di salute riproduttiva degli esemplari di tonno rosso presenti all'interno del bacino dell'Adriatico.

Dai dati ottenuti, è stato possibile osservare che gli esemplari che popolano il bacino dell'Adriatico sono quelli con una taglia compresa tra i 30 e i 35 kg. Tale dato ci fa quindi ipotizzare che gli individui presenti siano principalmente giovanili, che hanno affrontato o stanno per affrontare il loro primo atto riproduttivo (Fromentin & Powers, 2005).

Anche la scarsa presenza di individui che superano il peso corporeo di 50 kg è un dato interessante. La loro assenza è un vantaggio per gli individui più piccoli, poiché fanno sì che la disponibilità di prede sia maggiore. Perciò, possiamo supporre che l'Adriatico sia una zona di foraggiamento per quegli individui che in altri mari potrebbero far fatica a nutrirsi, mentre per quelli più grandi una zona dove recuperare dagli eventi riproduttivi.

La correlazione positiva presente tra il peso dell'animale e il peso della gonade rispecchia quanto capita nel normale sviluppo dell'animale. Addis e

collaboratori (Addis et al 2016) hanno già evidenziato che all'aumentare delle dimensioni corporee corrisponde l'aumento dello sviluppo della gonade sia in termini di dimensioni che di peso.

Studi sull'andamento annuale dell'indice gonadosomatico evidenziano le fluttuazioni delle dimensioni della gonade, permettendo così di caratterizzare il ciclo riproduttivo nel tempo e di individuare i periodi di spawning (Lawrence et al., 1965; Fenaux, 1968; Guettaf e San Martin, 1995; Lozano et al., 1995).

In base ai dati raccolti in questo studio, osserviamo che l'indice gonadosomatico differisce tra individui maschili e femminili.

Nelle femmine non si apprezza un cambiamento significativo del GSI che resta costantemente sotto al valore di 1 in tutti i mesi di campionamento. Addis e collaboratori hanno dimostrato che il GSI in femmine mature durante il periodo riproduttivo raggiunge valori ben più elevati, evidenziando che le femmine di tonno entrano in Adriatico esclusivamente per motivi di feeding e non riproduttivi. Nessuna femmina campionata anche nei mesi del periodo riproduttivo (maggio-settembre) ha mostrato una gonade in spawning o developing, al contrario le gonadi femminili campionate sono risultate tutte in post-spawning o regressing confermando l'assenza di zone di spawning in Adriatico centrale.

Anche negli individui maschili i valori di GSI monitorati non hanno superato i livelli soglia tipici di maschi in spawning confermando ulteriormente l'assenza di attività riproduttiva in Adriatico centrale.

In uno studio di Heinisch et al, 2008, è stato proposto un modello spazio-temporale della maturazione della gonade di esemplari prelevati all'interno del Mediterraneo durante il periodo di pesca stagionale. Nella zona orientale era stato osservato un picco iniziale a metà maggio mentre nella zona centro-occidentale il GSI raggiunge i valori più alti nei mesi di giugno e luglio. Questo periodo di maturazione differente è spiegato con la diversa temperatura dell'acqua tra i due bacini, dato che nel settore orientale il mare raggiunge la temperatura ottimale di riproduzione molto prima rispetto a quello occidentale. Questo dato ci può far ipotizzare che gli individui di sesso maschile e femminile provengono da due zone diverse e che in base agli stimoli esterni ai quali sono sottoposti maturano sessualmente in due periodi differenti.

La seconda parte del nostro studio si è focalizzata sull'analisi del grasso perigonadale, che sappiamo essere di vitale importanza per la maturazione della gonade e durante la gametogenesi.

Le variazioni stagionali degli accumuli di lipidi nei pesci marini sono fondamentalmente correlate al loro ciclo riproduttivo. Nella maggior parte delle

specie osserviamo un accumulo di depositi lipidici nel fegato durante il periodo di maturazione sessuale e prima dello sviluppo delle gonadi.

Nel caso del tonno rosso osserviamo un utilizzo sia del grasso perigonadale che di quello intra-muscolare ed epatico per lo sviluppo della gonade. Il tipo di grasso maggiormente utilizzato è proprio quello perigonadale, il quale, inoltre, viene utilizzato per fornire energia necessaria per il nuoto durante la migrazione riproduttiva (Mourente et al., 2001).

Tramite la quantificazione dei centri dei melanomacrofagi e dei singoli presenti all'interno della gonade possiamo ipotizzare se l'animale è stato sottoposto a uno stress di tipo cronico oppure istantaneo, dato che questi ultimi fungono da ottimi biomarkers dello stato di salute degli animali e della qualità dell'acqua. Inoltre, i centri di MMCs sono utilizzati come biomarker per indicare una risposta allo stress a cui l'animale è esposto in maniera cronica (Agius et al., 2003; Steckert et al., 2018).

I dati raccolti dimostrano che il peso dell'animale non influenza in modo significativo la presenza dei centri di melanomacrofagi, mentre per i singoli abbiamo un lieve rapporto di correlazione. Osserviamo che all'aumentare del peso dell'animale abbiamo più una presenza di MMs rispetto ai MMCs. Questo dato è in disaccordo con altri studi condotti su altre specie di teleostei che hanno

evidenziato l'aumento di MMCs nel fegato con l'aumento dell'età (Agius et al., 2003; Steinel et al., 2017).

Possiamo quindi ipotizzare che gli individui più giovani popolano acque più inquinate rispetto a quelli di dimensioni maggiori.

Studi di genetica di popolazione hanno evidenziato la presenza di due sottopopolazioni all'interno del Mediterraneo (Vinas et al., 2011).

Altri studi di tagging elettronici hanno evidenziato che queste due popolazioni hanno comportamenti diversi (Fromentin et al., 2014; Cermeño et al., 2015).

Studi di tagging elettronici effettuati su tonni all'interno dell'adriatico hanno dimostrato che i tonni al di sotto dei 60kg lasciano l'adriatico per compiere una migrazione, mentre quelli al di sopra dei 60 rimangono in queste acque (Cermeño et al., 2015).

Sappiamo che la migrazione provoca un dispendio energetico maggiore a livello metabolico e che può indurre cambiamenti nel sistema immunitario fino a renderlo meno efficiente nella risposta ai fattori di stress quindi probabilmente possiamo giustificare la presenza di più MMCs in tonni di dimensioni minori proprio per questo loro comportamento migratorio. Inoltre, è stato dimostrato che gli individui giovanili possiedono un sistema immunitario più reattivo agli stress acuti (Stosik et al., 2019).

Tutte queste supposizioni potrebbero andare a giustificare l'esistenza di due o più sottopopolazioni all'interno del Mediterraneo, rendendo la struttura della popolazione di *Thunnus Thynnus* più complessa dell'attuale ipotesi dei due stock da sempre proposta, gettando le basi per una nuova e più efficiente gestione della risorsa (Carlsson et al., 2004 e Riccioni et al., 2010).

Osserviamo anche una correlazione tra peso della gonade e i MMCs, proprio a dimostrazione che all'aumentare delle dimensioni delle gonadi aumentano anche i centri dei melanomacrofagi nella gonade stessa.

Come sappiamo tra gonadi maschili e femminile c'è una differenza sostanziale in termini di peso e dimensione. Infatti, osserviamo un rapporto di correlazione positiva tra sesso e peso della gonade. Quindi possiamo ipotizzare che negli esemplari di sesso femminile troviamo più MMCs rispetto agli individui maschili. Inoltre, abbiamo osservato che tra sesso, nel nostro caso quello femminile, e area dei melanomacrofagi abbiamo un rapporto di correlazione positivo. L'alterazione della gonade delle femmine mature potrebbe anche essere giustificata dall'elevato dispendio energetico dovuto alla riproduzione e al numero di eventi di spawning compiuti dall'individuo, con conseguente sottrazione di energie necessarie al sistema immunitario per una risposta efficiente.

Inoltre, questa correlazione può essere spiegata dal fatto che gli MMCs svolgono un ruolo importante nel riassorbimento a livello epatico dei componenti del tuorlo durante l'atresia follicolare, e che tali MMCs variano nel numero e nelle dimensioni, a seconda del numero di follicoli atresici (Passantino et al., 2014). Osserviamo che tra i MMCs e i MMs vi è un rapporto di correlazione positivo. Questo perché la formazione dei centri di melanomacrofagi comunque deriva in primis dalla formazione dei singoli.

6. Bibliografia

Abascal, Francisco J., Cesar Megina, and Antonio Medina. "Testicular development in migrant and spawning bluefin tuna (*Thunnus thynnus* (L.)) from the eastern Atlantic and Mediterranean." (2004).

Agius, C., and R. J. Roberts. "Melano-macrophage centres and their role in fish pathology." *Journal of fish diseases* 26.9 (2003): 499-509.

Agius, C. "The melano-macrophage centres of fish: a review." *Fish immunology* (1985): 85-105.

Bauer, Robert Klaus, et al. "Habitat use, vertical and horizontal behaviour of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Northwestern Mediterranean Sea in relation to oceanographic conditions." *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 141 (2017): 248-261.

Block, Barbara A., et al. "Electronic tagging and population structure of Atlantic bluefin tuna." *Nature* 434.7037 (2005): 1121-1127.

Busawon, D. S., et al. "Evaluation of Atlantic bluefin tuna otolith ageing protocols." *Collective Volume of Scientific Papers ICCAT* 76.2 (2020).

Carey, Francis G., and Quentin H. Gibson. "Heat and oxygen exchange in the rete mirabile of the bluefin tuna, *Thunnus thynnus*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 74.2 (1983): 333-342.

Carnevali, Oliana, et al. "Insights on the seasonal variations of reproductive features in the Eastern Atlantic Bluefin Tuna." *General and Comparative Endocrinology* 282 (2019): 113216.

Cermeño, Pablo, et al. "Electronic tagging of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*, L.) reveals habitat use and behaviors in the Mediterranean Sea." *PLoS One* 10.2 (2015): e0116638.

Claro, R., Lindeman, K. C., & Parenti, L. R. (Eds.). (2014). *Ecology of the marine fishes of Cuba*. Smithsonian Institution.

Collette, Bruce B., and Cornelia E. Nauen. *Scombrids of the world: an annotated and illustrated catalogue of tunas, mackerels, bonitos, and related species known to date*. v. 2. 1983.

Doumenge, François. "L'histoire des pêches thonières." *Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT* 50 (1998): 753-802.

Dragovich, Alexander. "The food of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the western North Atlantic Ocean." *Transactions of the American Fisheries Society* 99.4 (1970): 726-731.

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

Karakulak, F. S., A. Salman, and I. K. Oray. "Diet composition of bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L. 1758) in the Eastern Mediterranean Sea, Turkey." *Journal of Applied Ichthyology* 25.6 (2009): 757-761.

Kodama, Taketoshi, et al. "Diet composition and feeding habits of larval Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* in the Sea of Japan: integrated morphological and metagenetic analysis." *Marine Ecology Progress Series* 583 (2017): 211-226.

Knapp, Jessica M., et al. "Comparative assessment of the reproductive status of female Atlantic bluefin tuna from the Gulf of Mexico and the Mediterranean Sea." *PLoS One* 9.6 (2014): e98233.

Heinisch, Gilad, et al. "Spatial–temporal pattern of bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L. 1758) gonad maturation across the Mediterranean Sea." *Marine Biology* 154 (2008): 623-630.

La Mesa, Mario, Mauro Sinopoli, and Franco Andaloro. "Age and growth rate of juvenile bluefin tuna *Thunnus thynnus* from the Mediterranean Sea (Sicily, Italy)." *Scientia Marina* 69.2 (2005): 241-249.

Mastromarco Giuseppe: *Rivista di cultura classica e medioevale*, gennaio-dicembre 1998, Vol. 40, No. 1/2 (gennaio-dicembre 1998), pp. 229-236

Mather, Frank Jewett, John Michael Mason, and Albert Cleveland Jones. "Historical document: life history and fisheries of Atlantic bluefin tuna." (1995).

Medina, Antonio, et al. "An autofluorescence-based survey of late follicular atresia in ovaries of a teleost fish (*Thunnus thynnus*)." *Journal of Fish Biology* 99.3 (2021): 765-772.

Medina, A., et al. "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* 60.1 (2002): 203-217.

Mourente, Gabriel, César Megina, and Esther Díaz-Salvago. "Lipids in female northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus thynnus* L.) during sexual maturation." *Fish Physiology and Biochemistry* 24 (2001): 351-363.

Mylonas, Constantinos C., et al. "Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) farming and fattening in the Mediterranean Sea." *Reviews in Fisheries Science* 18.3 (2010): 266-280.

Piccinetti, Corrado, Antonio Di Natale, and Pasquale Arena. "Eastern bluefin tuna (*Thunnus thynnus*, L.) reproduction and reproductive areas and season." *Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT* 69.2 (2013): 891-912.

Pousis, C., et al. "Comparative study of liver vitellogenin gene expression and oocyte yolk accumulation in wild and captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.)." *Animal reproduction science* 123.1-2 (2011): 98-105.

Pousis, C., et al. "Expression of vitellogenin receptor gene in the ovary of wild and captive Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*)." *Animal reproduction science* 132.1-2 (2012): 101-110.

Richardson, David E., et al. "Discovery of a spawning ground reveals diverse migration strategies in Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*)." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.12 (2016): 3299-3304. Wilson, S. G., et al. "Movements of bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the northwestern Atlantic Ocean recorded by pop-up satellite archival tags." *Marine biology* 146 (2005): 409-423.

Wolke, R. E., C. J. George, and V. S. Blazer. "Pigmented macrophage accumulations (MMC; PMB): possible monitors of fish health." *Parasitology and pathology of marine organisms of the world ocean* 25 (1985): 93-97.

Wardle, C. S., et al. "The muscle twitch and the maximum swimming speed of giant bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L." *Journal of fish biology* 35.1 (1989): 129-137.

- Schaefer, Kurt M. "Reproductive biology of tunas." *Fish physiology* 19 (2001): 225-270.
- Saha, N. R., T. Usami, and Y. Suzuki. "Seasonal changes in the immune activities of common carp (*Cyprinus carpio*)." *Fish Physiology and Biochemistry* 26 (2002): 379-387.
- Sassu, Nicola, Alessandra Cannas, and Mario Ferretti. "Gli attrezzi da pesca in uso nelle Marinerie Italiane." *UNIMAR: Rome, Italy* 16 (2001): 81.
- Schulz, Rüdiger W., et al. "Spermatogenesis in fish." *General and comparative endocrinology* 165.3 (2010): 390-411.
- 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.
- Steinel, Natalie C., and Daniel I. Bolnick. "Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms." *Frontiers in immunology* 8 (2017): 827.
- Stosik, Michał P., Beata Tokarz-Deptuła, and Wiesław Deptuła. "Melanomacrophages and melanomacrophage centres in Osteichthyes." *Central European Journal of Immunology* 44.2 (2019): 201-205.
- Tzoumas, A., et al. "Weight growth of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*, L. 1758) as a result of a 6-7 months fattening process in central Mediterranean." *Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT* 65.3 (2010): 787-800.
- Viana, H. C., et al. "Aggregation of hepatic melanomacrophage centers in *S. herzbergii* (Pisces, Ariidae) as indicators of environmental change and well-

being." *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 73 (2021): 868-876.

Vinas, Jordi, et al. "Facts and uncertainties about the genetic population structure of Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*) in the Mediterranean. Implications for fishery management." *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 21 (2011): 527-541.

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.