



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale

BIOLOGIA MARINA

**Survey sul pesce spada (*Xiphias gladius*) nel Mar Adriatico centrale: focus sulla
riproduzione, stato di salute e taglie di cattura**

**Swordfish's survey (*Xiphias gladius*) in central Adriatic Sea: focus on
reproduction, health status and catches size**

Tesi di Laurea Magistrale di:
Chiara Cardillo

Relatore:
Chiar.ma Prof.ssa **Giorgia Gioacchini**

Correlatore:
Prof.ssa Oliana Carnevali
Dott.ssa Sara Filippi

Sessione straordinaria – Febbraio 2022

Anno Accademico 2020-2021

Cavalca le onde più alte

INDICE

1. Introduzione.....	1
1.1 Classificazione.....	1
1.2 <i>Xiphias gladius</i>	3
1.3 Distribuzione ed alimentazione.....	6
1.4 Riproduzione	15
1.4.1 Ovogenesi.....	21
1.5 Pubertà	34
1.6 Metabolismo.....	38
1.7 Melanomacrofagi	41
2. Scopo della tesi.....	47
3. Materiali e metodi.....	48
3.1 Disegno sperimentale e campionamento.....	48
3.2 Analisi istologiche.....	50
3.3 <i>Gonadal Index</i> (GI).....	52
4. Risultati.....	54
4.1 Taglie di cattura.....	54
4.2 Quantificazione dei melanomacrofagi.....	57
4.2.1 Test di correlazione MMCs e MMs.....	59

4.2.2 Test statistici ANOVA e T-student degli MMCs.....	63
4.2.3 Test statistici ANOVA e T-student dei MMs.....	66
4.3 Quantificazione dei lipidi.....	69
4.3.1 Test di correlazione lipidi.....	71
4.3.2 Test statistici ANOVA e T-student dei lipidi.....	72
4.4 Riproduzione.....	73
4.4.1 Test statistici ANOVA dell'Indice Gonadico.....	75
5. Discussioni	76
6. Bibliografia.....	86

Capitolo primo

INTRODUZIONE

1.1 Classificazione

Tra le principali specie ittiche presenti nel bacino Mediterraneo troviamo certamente il pesce spada *Xiphias gladius* (Linneo, 1758), unico rappresentante della famiglia Xiphiidae.

Il nome *Xiphias gladius* proviene dalla parola greca “xiphos” e quella latina “gladius”, entrambe riconducibili al termine “spada”, che rappresenta la caratteristica anatomica più importante di questa specie. La spada, o rostro, si forma per una modificazione della mascella superiore, è ovale e termina con una punta acuminata, utilizzata per difendersi dai predatori o per stordire le prede.

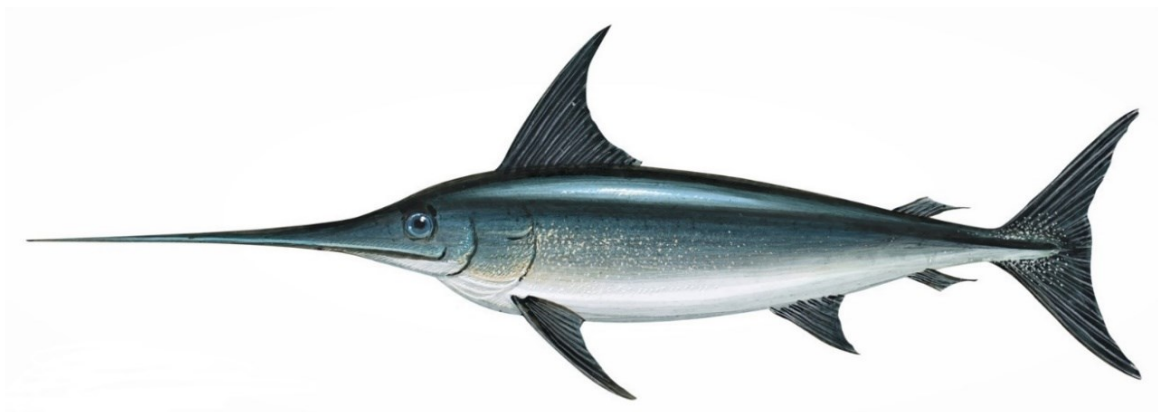


Figura 1: *Xiphias gladius*

Phylum: *Chordata*

Subphylum: *Vertebrata*

Superclasse: *Gnathostomata*

Classe: *Osteichthyes*

Sottoclasse: *Actinopterygii*

Ordine: *Perciformes*

Sottordine: *Scombroidea/Xiphioidi*

Famiglia: *Xiphiidae*

Genere: *Xiphias*

Specie: *Xiphias gladius*

Dell'ordine dei Perciformi fanno parte tutti i rostrati, noti anche come *billfish*, che si dividono in due grandi famiglie: gli Istiophoridae che comprendono i marlin, le aguglie e tutti i pesci vela, e gli Xiphiidae, con unico rappresentante il pesce spada.

La sua classificazione all'interno del sottordine degli *Scombroidea* è invece alquanto controversa: secondo alcuni autori (Gosline, 1968; Orrell et al. 2006) vi sono dimostrazioni filogenetiche che suggeriscono un'origine indipendente e la necessità di creare il sottordine degli Xiphioidi.

1.2 Xiphias gladius

Il pesce spada (*Xiphias gladius*) presenta un corpo fusiforme a sezione cilindrica che si assottiglia a livello del peduncolo caudale. La mascella si sviluppa formando il rostro che costituisce circa 1/3 della lunghezza totale dell'organismo, mentre la mandibola ha una lunghezza nettamente inferiore. Posteriormente al rostro, vicino gli occhi, è presente una ghiandola sebacea, detta ghiandola dell'olio, che secerne un liquido lubrificante essenziale nel ridurre l'attrito con l'acqua. La ghiandola è costituita da tre compartimenti: un lobo centrale anteriore e due lobi laterali posteriori (Videler et al., 2016).

La presenza di una fitta rete di capillari che va dalla testa agli opercoli con pori verso l'esterno permette di far fuoriuscire l'olio, lubrificare l'intera porzione della testa rendendola idrofoba e migliorare l'idrodinamismo (Videler et al., 2016).

Gli occhi sono piuttosto grandi e dietro di essi troviamo le branchie.

L'apertura boccale non è molto ampia. La pelle è liscia e sprovvista di squame, la colorazione è uniforme ma può variare in base all'età dell'organismo; solitamente il dorso è di colore blu scuro – violaceo, i fianchi mostrano riflessi giallastri mentre il ventre appare chiaro, quasi biancastro.

Questa colorazione, tipica degli organismi pelagici, permette loro di sfuggire da possibili predatori mimetizzandosi con il fondo se visti dall'alto o con la superficie argentea dell'acqua se visti dal basso.

Le livree dorsali e ventrali si uniscono e si sfumano a metà dei fianchi. I colori brillanti sono visibili negli esemplari vivi mentre dopo la morte le sfumature si perdono e l'organismo appare grigio ardesia.

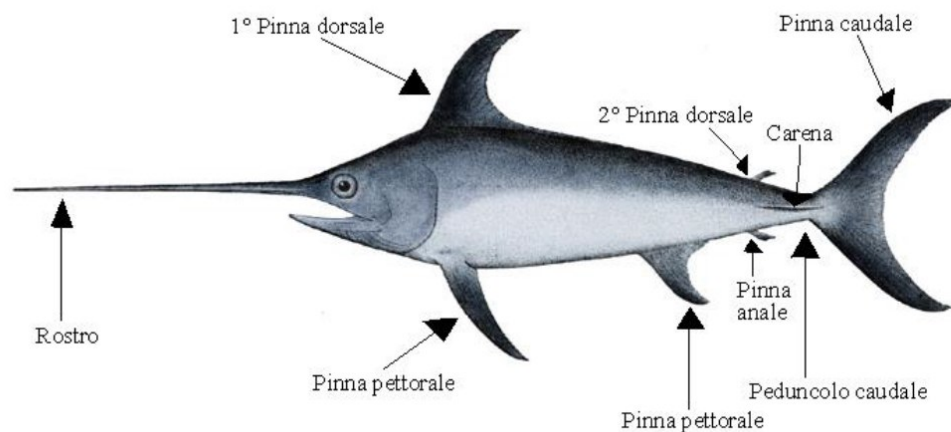


Figura 2: caratteri morfologici di *Xiphias gladius*

Xiphias gladius presenta due pinne pettorali, due pinne dorsali e due pinne anali. Osservando l'organismo lateralmente, il diametro maggiore si ha in corrispondenza della prima pinna dorsale, solitamente caratterizzata da 34-49 raggi. La seconda pinna dorsale è invece ridotta, si trova quasi in corrispondenza del peduncolo caudale ed è caratterizzata da 4-6 raggi. Sul peduncolo caudale troviamo due carene laterali che otticamente fanno apparire il pesce di forma cilindrica se osservato lateralmente.

La vescica natatoria è singola e indivisa.

Ventralmente troviamo la prima pinna anale più o meno a metà del corpo con 13-14 raggi, la seconda pinna anale in corrispondenza della seconda pinna dorsale con 3-4 raggi e l'ano. Sono assenti le pinne ventrali e la cintura pelvica.

La pinna caudale è grande ed a forma di mezza luna, omocerca e simmetrica con i lobi a forma di falce ed è adatta al nuoto di propulsione. L'abbondanza di fibre muscolari bianche rende *X. gladius* un nuotatore veloce, raggiungendo una velocità massima di 100 km/h (Videler, 2016).

1.3 Distribuzione e alimentazione

Xiphias gladius è una specie cosmopolita, altamente migratoria, con l'areale di distribuzione che varia tra i 45°N e i 45°S, prediligendo gli oceani temperati o tropicali e acque con temperature comprese tra i 18°C e i 22°C, tuttavia è possibile ritrovarlo anche in acque più calde (Palko et al. 1981; Righi et al. 2020; Castillo et al. 2007).

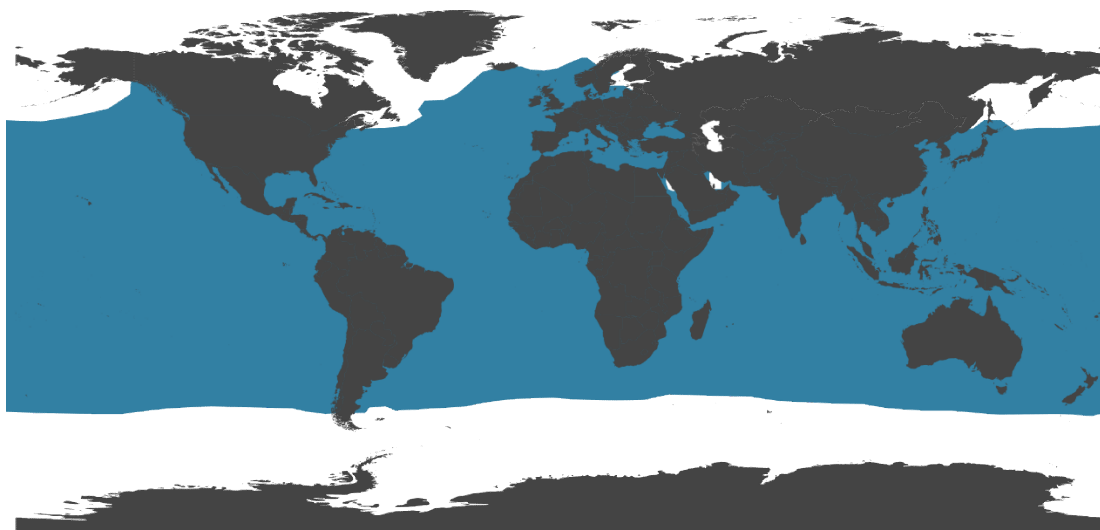


Figura 3: Areale di distribuzione di *Xiphias gladius*

Il pesce spada è presente nell'Oceano Atlantico e Pacifico, nel Mar Mediterraneo, nel Mar Nero, nel Mar di Marmara e nel Mar di Azov.

Numerosi studi confermano l'esistenza di pattern di stagionalità, con spostamenti orizzontali verso le aree tropicali durante i mesi invernali e un ritorno alle aree di foraggiamento durante la primavera (Abascal et al. 2014; Stoehr et al., 2020; Castillo et al., 2007; Palko, 1981)

Xiphias gladius è una specie epi- e mesopelagica predilige acque superficiali ma, essendo un organismo ectotermo, può effettuare migrazioni verticali giornaliere raggiungendo quasi i 3000 mt di profondità quando va alla ricerca di cibo; vive principalmente in mare aperto ma è possibile ritrovarlo anche in acque costiere. Questo pesce è inoltre in grado di spiccare salti acrobatici sopra la superficie marina; il motivo non è ben chiaro, probabilmente per liberare la superficie corporea dai parassiti, tra cui le lamprede (Palko et al., 1981).

Generalmente, la relazione “temperatura ambientale-areale di distribuzione” è molto evidente nei pesci, poiché nella maggior parte delle specie la temperatura corporea rispecchia la temperatura ambiente (Bernal et al.,2009).

Lo spostamento fondo-superficie e il passaggio attraverso diversi range termici, dalle acque superficiali (18-24°C) alle acque fredde al di sotto del termoclino (5-10°C), potrebbe compromettere la funzione cardiaca e ridurre notevolmente la velocità di locomozione (Stoehr et al.,2020). Tuttavia, vi sono numerose specie migratorie a *ventilazione-ram obbligata* come i tonni, gli sgombri, i Lamnidae e i pesce spada che hanno evoluto degli adattamenti morfologici e fisiologici in grado di mitigare gli effetti delle basse temperature e le fluttuazioni che subiscono giornalmente. Queste specie sono in grado di mantenere la gittata cardiaca a basse temperature aumentando il

trasporto di ioni Ca^{2+} o aumentando la stimolazione adrenergica alle fibre muscolari cardiache (Galli et al., 2009; Stoehr et al., 2020).

Il pesce spada presenta, vicino la muscolatura oculare, un tessuto specializzato, simile per colore e consistenza al fegato, detto *heater tissue*, il quale recupera calore, cosicché da isolare e riscaldare il cervello (Carey, 1982; Block, 1986). Questo tessuto permette di adattarsi alle brusche escursioni termiche senza che il cervello subisca danni o che il corpo perda calore. Inoltre, il processo di riscaldamento coinvolge non solo il cervello ma anche gli occhi, migliorando così la vista durante la caccia.

Gli adulti di *Xiphias gladius* possono raggiungere dimensioni molto elevate in ambiente oceanico con una lunghezza massima di 4 metri circa e oltre 500 kg di peso.

La taglia massima registrata è attribuibile a due individui: il primo venne catturato in Oceano Atlantico nei pressi di Cape Breton (Nuova Scozia) ed aveva un peso di 550 kg (Beckett, 1974), mentre il secondo nel 1953 in Oceano Pacifico, al largo del Cile di 536 kg (Palko et al., 1981).

Gli esemplari presenti nel Mar Mediterraneo hanno dimensioni nettamente inferiori: infatti hanno una lunghezza media di 140-210 cm ed un peso massimo di 230 kg, anche se raramente questo peso va oltre i 160 kg.

Generalmente sono le femmine ad avere le maggiori dimensioni se comparate con gli esemplari di sesso maschile.

Quando il pesce spada si trova in prossimità della piattaforma continentale (400-600 mt di profondità), trascorre le ore diurne sul fondo cibandosi di organismi demersali, mentre durante le ore notturne risale verso la superficie e si sposta verso il largo, allontanandosi dalle aree costiere (Abascal et al., 2014).

Xiphias gladius è un predatore opportunista, in grado di attingere cibo dai vari livelli trofici durante gli spostamenti lungo la colonna d'acqua.

L'alimentazione è basata su tre grandi categorie di organismi: pesci, cefalopodi e crostacei (Stillwell & Kohler, 1985; Castillo et al. 2007), tuttavia vi sono variazioni nelle specie predominanti tra le diverse aree geografiche e le stagioni.

Tra le principali prede dell'ambiente pelagico troviamo cefalopodi, tra cui totani (*Todarodes sagittatus*, *Ommastrephes bartramii*) e calamari (*Illex coindetii*, *Loligo media*, *Loligo vulgaris*, *Ancistroteuthis lichtensteinii*, *Histioteuthis bonnellii*) mentre tra le specie ittiche troviamo tonni (*Thunnus* spp.), sardine (*Sardina pilchardus*), barracuda (*Sphyraenidae*), lampughe (*Coryphaena*), alici (*Engraulis encrasicolus*), sgombri (*Scomber scombrus*) e aringhe (*Clupea harengus*) (FAO, 2020).

A livello bentonico troviamo varie specie di pesci e cefalopodi (*Citharus linguatula*, *Upeneus moluccensis*, *Callistoctopus macropus*, *Eledone moschata*) (Salman, 2004; Bello, 1991). I pesce spada adulti hanno pochi predatori, tra cui capodogli, orche (*Orcinus orca*) e grandi squali, come lo squalo mako (*Isurus oxyrinchus*).

La taglia di prima maturità sessuale (L_{50}) indica la taglia in cui il 50% della popolazione è matura sessualmente ed è calcolata secondo la relazione peso-lunghezza-maturità del pesce (Abid et al., 2018). Nel Mar Mediterraneo, la L_{50} negli esemplari di sesso femminile, è raggiunta in organismi di dimensioni comprese tra 131 cm e 140 cm LJFL (*Lower Jaw Fork Length*) e corrisponde all'età di 3-4 anni, mentre per i maschi la maturità sessuale viene raggiunta intorno ai 90 cm di lunghezza LJFL (ICCAT 2019; De Metrio et al., 1989; De la Serna et al., 1996). In Oceano Atlantico le misure sono differenti, nell'area nord-occidentale la taglia di prima maturità per le femmine è di 179 cm LJFL, mentre nella sud-orientale è di 156 cm LFJL (Hazin et al., 2002; Arocha et al., 1996). Nei maschi invece è compresa tra i 95 cm e i 125 cm (Abid et al., 2018).

La sex ratio nel Mar Mediterraneo è di circa 3:1 evidenziando un proporzionale aumento delle femmine di *Xiphias gladius* man mano che aumenta la taglia degli esemplari (Macias et al., 2005).

Infatti, in stock con organismi di taglia superiore a 150 cm si assiste ad una prevalenza delle femmine nel 50% del totale, e un aumento delle femmine del 100% in stock con organismi di dimensioni superiori a 210 cm (De Metrio et al., 1989; Hazin et al., 2002).

L'età del pesce spada può essere calcolata tramite l'analisi di parti dure come gli otoliti o il raggio delle pinne anali (Tserpes & Tsimenides 1995; Kume & Joseph 1969; Chi-Lu Sun et al., 2002). Purtroppo, la lettura degli otoliti non è stata ancora standardizzata a causa della loro estrema variabilità e loro ridotte dimensioni ed estrema fragilità. Wilson & Dean (1983) hanno dimostrato che la microstruttura degli otoliti è identica a quella degli altri teleostei ma è possibile notare che l'accrescimento concentrico giornaliero è discontinuo: esso può essere dovuto ad una crescita dell'organismo più o meno intensa in diversi periodi dell'anno (Megalofonou et al., 1995). Le analisi riguardanti la seconda spina della pinna anale si focalizzano sulle bande di accrescimento che vengono deposte annualmente (Tserpes & Tsimenides 1995). Nonostante le difficoltà nella datazione di questi animali, la loro vita media stimata è tra gli 11 e i 13 anni.

La pesca del pesce spada ha origini molto antiche, risalenti già al II secolo a.C., durante il quale questa specie era pescata senza l'ausilio di una imbarcazione: il pescatore si appostava sugli scogli e aspettava con l'arpione

il passaggio del pesce. Secondo la tradizione siciliana, la pesca nello stretto di Messina viene effettuata con la *feluca*, una piccola imbarcazione di 5-7 mt dotata di un altissimo albero maestro sul quale si trovava un pescatore, detto l'antenniere, che aveva il compito di avvistare la preda. Successivamente veniva lanciato un grido d'allarme e i pescatori si preparavano a lanciare la fiocina cercando di colpire la preda. Negli anni venne introdotta anche una passerella lungo la prua della nave per migliorare le probabilità di cattura con l'arpione.

Altre tecniche di cattura utilizzate in Mediterraneo sono: la pesca con i palangari (47%), le reti a circuizione, le reti da posta, lenze e canne, lenze a mano e trappole (ICCAT, 2019).

L'*International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas* (ICCAT), ha recentemente classificato *Xiphias gladius* come specie sovra sfruttata e dal 2016, ha istituito un piano di gestione multi-annuale, finalizzato al recupero dello stock (ICCAT, 2019).

Secondo i dati dell'ICCAT, la specie ha raggiunto i massimi storici nel 2004, con un record di 40.000 tonnellate di catture annue, successivamente si è assistito ad un graduale collasso dello stock dovuto alle grandi catture che includevano anche molti esemplari giovanili sotto-taglia, i quali, secondo il

Regolamento Europeo del 2017, non potrebbero neanche essere portati a bordo della nave.

Dal 2008 le catture sono principalmente effettuate con i palangari, con una graduale eliminazione delle reti da posta, degli arpioni e delle trappole; i palangari di profondità o mesopelagici hanno quasi completamente sostituito i palangari di superficie (ICCAT, 2020). Attualmente le catture sono dominate da pesci di età inferiore ai 4 anni.

Dal 2012, grazie all'attuazione del fermo pesca e alla presenza di una lista di imbarcazioni autorizzate alla pesca del pesce spada, lo sforzo totale di pesca è diminuito, con catture inferiori a 10 000 tonnellate annue (ICCAT, 2020).

Il Regolamento Europeo n. 2107 del 15 novembre 2017 stabilisce le misure di gestione e di controllo per la conservazione dei tonnidi. In particolare, la sezione relativa al pesce spada nel Mar Mediterraneo include gli articoli da 20 a 26. Tra questi, i principali degli di nota sono l'art. 23 e l'art. 24.

L'art. 23 prevede che *“il pesce spada del Mediterraneo non può essere catturato (come specie bersaglio o cattura accessoria), tenuto a bordo, trasbordato o sbarcato nei periodi dal 1 al 31 marzo e dal 1° ottobre al 30 novembre di ogni anno”*.

L'art. 24 riporta che *“Sono vietati la cattura, la detenzione a bordo, il trasbordo, lo sbarco, il trasporto, il magazzinaggio, l'esposizione o la messa in vendita di pesce spada del Mediterraneo di lunghezza alla forca inferiore a 90 cm (misurata dalla mandibola inferiore) o, in alternativa, di peso inferiore a 10 kg di peso vivo o 9 kg di peso eviscerato e senza branchie [...]”*

(Regolamento UE, 2017).

Inoltre, ai sensi della normativa del 16 maggio del 2017, la Commissione ha applicato un fermo di due mesi (1° ottobre-30 novembre) per la pesca del tonno alalunga (*Thunnus alalunga*), finalizzata alla protezione dei giovanili di pesce spada.

Tenendo conto di una produttività media stabile nel tempo, le proiezioni future affermano che con un TAC (totale ammissibile di cattura) di 10 000 t, si avrebbe una ricostruzione del 60% dello stock entro la fine del 2028 (ICCAT, 2020).

1.4 Riproduzione

Xiphias gladius è un organismo solitario per gran parte della sua vita, forma una coppia stabile solo durante il periodo riproduttivo. È una specie gonocorica e non vi è alcuna caratteristica fenotipica esterna che permetta di riconoscere i maschi dalle femmine.

La riproduzione prevede la presenza di cellule specializzate, i gameti, in particolare gli spermatozoi, prodotti dal testicolo, e le cellule uovo, prodotte dagli ovari; generalmente i primi sono piccoli e mobili mentre le seconde sono grandi e immobili.

In *Xiphias gladius*, le gonadi sono organi pari, situate lateralmente all'intestino: i testicoli sono allungati, appiattiti e nastriformi, mentre gli ovari sono allungati e tondeggianti, più corti rispetto ai testicoli (Murua et al., 2021).

Il processo riproduttivo e la deposizione delle uova sono influenzati da particolari variazioni nell'ambiente, tra cui la temperatura superficiale dell'acqua. Il pesce spada migra dalle aree di foraggiamento verso acque più calde per riprodursi e le uova vengono rilasciate in aree particolari note come *aree di spawning*.

In Oceano Atlantico, e in generale nei mari caldi tropicali o equatoriali (Nakamura et al., 1985) come nel Golfo del Messico e lungo le coste della Florida o nel Mar dei Caraibi, la deposizione delle uova avviene tutto l'anno, con un picco da aprile a settembre (Hazin et al., 2002; Palko et al., 1981).

In Oceano Pacifico, la deposizione inizia durante la primavera e si protrae per quasi tutta l'estate, generalmente da marzo a luglio. A latitudini maggiori, in particolare lungo le coste orientali australiane e neozelandesi, la riproduzione avviene tra settembre e marzo, con un picco tra dicembre e febbraio (Young et al., 2003).

In Oceano Indiano, nelle vicinanze dell'isola La Réunion, lo *spawning* avviene tra ottobre e aprile con acque superficiali al di sopra di 24°C cosicché da permettere la sopravvivenza delle larve (Poisson & Fauvel, 2008).

Nel Mar Mediterraneo, lo *spawning* avviene durante la stagione estiva con un picco nel mese di luglio (Romeo et al., 2008; De Metrio et al., 1994), le principali aree di *spawning* sono a largo della Sicilia Occidentale e nello Stretto di Messina (Palko et al., 1981; Corriero et al., 2004), nello Stretto di Gibilterra e nelle Isole Baleari (Abid et al., 2016; Romeo et al., 2008; De la Serna et al., 1999; Macias et al., 2005) e nel Mar Levantino (Rey, 1988; Aliçlı et al., 2012). Le uova rilasciate dal pesce spada sono piccole, pelagiche e

provviste di tuorlo: queste galleggiano in colonna d'acqua grazie a gocce lipidiche contenute nel tuorlo.

Le uova si devono posizionare ad una certa altezza nella colonna d'acqua per rendere possibile l'incontro con gli spermatozoi; quindi, il contenuto di lipidi è estremamente regolato e controllato.

La quantità di gocce lipidiche presente all'interno degli ovociti di pesce spada, così come nelle altre specie di teleostei, è specifica: è possibile quindi utilizzarli come biomarcatori per discriminare le diverse specie.

Quando si parla di fecondazione esterna con uova pelagiche esiste una *condizione sine qua non*: le uova e gli spermatozoi devono essere emessi contemporaneamente, è necessaria un'estrema sincronia affinché le uova rilasciate non rimangano non fecondate o vadano incontro a morte. La sincronizzazione tra maschio e femmina durante lo *spawning* avviene con due possibili meccanismi: il *mouthing* e/o i movimenti ascensionali in colonna d'acqua.

Nel *mouthing*, il maschio corteggia la femmina utilizzando dei movimenti e coreografie o mordendole delicatamente l'addome per indurre le contrazioni che porteranno al rilascio delle uova. Invece, i movimenti ascensionali dei depositori pelagici fanno sì che vengano rilasciate le uova quanto più vicino

alla superficie del mare possibile, evitando così la predazione da parte di organismi filtratori del benthos o di pesci planctivori. Questa tecnica è utilizzata principalmente da piccoli pelagici che sono facilmente soggetti a predazione, al contrario le larve di grandi predatori pelagici risalgono più lentamente la colonna d'acqua in quanto meno soggetti alla predazione.

Rispetto agli adulti demersali, negli adulti pelagici il numero di uova prodotte è nettamente superiore, avremo quindi un maggior numero di individui che potranno essere generati, con un tasso di fecondazione maggiore direttamente proporzionale al tasso di mortalità. Inoltre, negli organismi pelagici mancano le cure parentali, quindi gli embrioni saranno maggiormente soggetti a predazione o a danneggiamento fisico.

I pesce spada si riproducono tutti gli anni ciclicamente, sincronizzano il rilascio dei gameti con le fasi lunari, cosicché la schiusa della prole avvenga durante la luna piena. Le correnti off-shore di maggiore intensità durante la luna piena favoriranno la dispersione larvale, ma anche la presenza di bloom fitoplanctonici che garantiranno un adeguata quantità di cibo per le larve (Rooker et al., 2012).

Gli esemplari di pesce spada durante il periodo riproduttivo formano una coppia monogama, stabile per almeno una stagione. Sono una coppia

solidissima, se il maschio viene pescato anche la femmina successivamente si farà pescare.

Nelle femmine di *Xiphias gladius*, la produzione delle uova è asincrona, motivo per cui all'interno della gonade è possibile trovare ovociti a tutti gli stadi di maturazione: ovogoni, ovociti pre-vitellogenici, ovociti vitellogenici, ovociti maturi e atresici (Carnevali et al., 2019). Gli ovarii possono contenere da 1 a 29 milioni di uova.

Arocha (1997) ha stimato che il pesce spada rilascia le uova ogni tre giorni, per un totale di circa 81 eventi di *spawning* per stagione riproduttiva. Questo processo è noto anche come *deposizione a batch*.

Il numero di uova rilasciate per singolo evento riproduttivo dipende dalla taglia dell'organismo. In Mar Mediterraneo e in Oceano Atlantico, le femmine che raggiungono dimensioni maggiori emettono da 2 a 10 milioni ed hanno un diametro di 1.6-1.8 mm (ICCAT, 2010; Palko et al., 1981). In Oceano Pacifico e in Oceano Indiano il numero di uova emesse è nettamente inferiore, da 1 a 4.3 milioni (Murua et al., 2021).

Lo sviluppo embrionale è rapido, dopo due-tre giorni dalla fecondazione avverrà la schiusa. Le larve hanno dimensioni di circa 4 mm, sono tutte molto simili tra loro con caratteristiche morfologiche, fisiologiche ed ecologiche ben

diverse dall'adulto; in esse è presente solo la prima pinna dorsale ed è invece ancora assente il rostro, che apparirà nelle settimane successive.

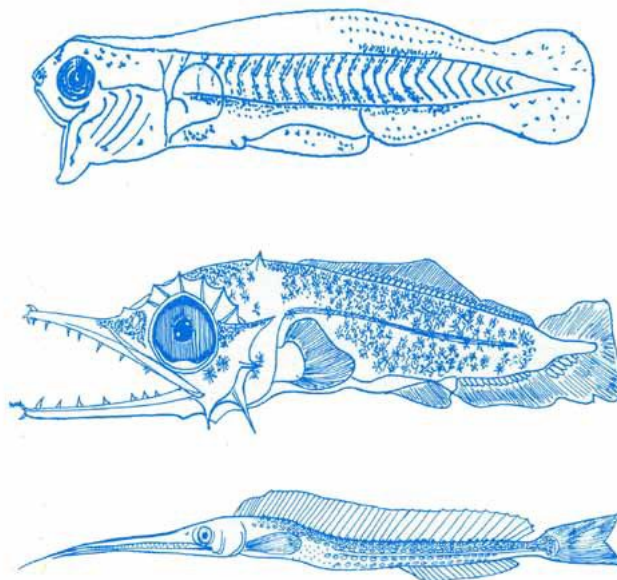


Figura 4: Stadi larvali e giovanili di *Xiphias gladius*. In alto: una larva al decimo giorno di vita. Al centro: un esemplare di 6.5 mm. In basso: un esemplare di 18 cm di lunghezza.

Fonte immagine: “Atlante dei pesci delle coste italiane”, di Bini Giorgio.

Durante le prime fasi di vita, le larve vivono in prossimità della superficie nutrendosi di plancton. Durante lo sviluppo, il corpo si accresce e si assottiglia e si formerà il rostro divenendo sempre più lungo e appuntito.

Oltre le larve, anche i giovanili di *Xiphias gladius* sono diversi dagli adulti: la mascella si allunga a formare una piccola spada mentre sulla mandibola compaiono i denti che saranno poi completamente assenti in età adulta. Man mano che gli organismi si accrescono, la mandibola arresta il suo sviluppo. Nei giovanili, a livello epidermico troviamo delle piccole squame spinose su

ciascun lato delle pinne dorsale e anale che scompariranno negli esemplari adulti.

Assistiamo anche ad un graduale cambio di colorazione: le larve presentano corpi allungati fortemente pigmentati mentre i giovanili mostrano una livrea dorsale blu evidenziata da sette bande verticali celesti, di larghezza non uniforme, che si estendono dalla testa fino alla pinna caudale. La livrea ventrale è bianco-argentata, la prima pinna dorsale è blu scuro mentre la prima pinna anale manca di pigmentazione (Palko et al., 1981).

Xiphias gladius è quindi una specie a strategia K, caratterizzato da un basso numero di eventi riproduttivi, un accrescimento lento e dimensioni corporee elevate, un elevato sforzo riproduttivo, assenza di cure parentali ed elevata capacità competitiva (Danovaro, 2019).

1.4.1 Ovogenesi

Il processo riproduttivo avviene sotto il controllo dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade. L'ipotalamo, sotto lo stimolo di segnali ambientali, produce l'ormone gonadotropico (GnRH), il primo ormone che dà inizio alla cascata nell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade.

Una volta prodotto, il GnRH dovrà raggiungere l'ipofisi: il processo è mediato da neurotrasmettitori tra cui il neuropeptide Y, la serotonina, la bombesina, GABA e dopamina.

Le cellule gonadotrope ipofisarie, presentano il recettore di membrana del GnRH. Il legame ormone-recettore attiva un segnale che permetterà la trascrizione e la traduzione delle gonadotropine ipofisarie: l'ormone luteinizzante (LH) e l'ormone follicolostimolante (FSH).

Entrambi gli ormoni sono eterodimeri costituiti da una subunità α comune sia per LH che per FSH, ed una subunità β specifica che sintetizza o l'LH o l'FSH. L'associazione delle due subunità (α e β) determina il rilascio dell'ormone attivo.

I due ormoni, LH e FSH, sono riversati nel circolo sanguigno e verranno trasportati fino a raggiungere le gonadi, nelle quali troveranno i loro recettori.

L'FSH nella femmina ha i suoi recettori sulle cellule della granulosa mentre l'LH sulle cellule della teca.

L'ovogenesi è il processo con il quale gli ovogoni maturano in ovociti, 100-200 volte più grandi rispetto alla cellula di partenza, pronti per essere ovulati e in altre cellule non funzionali che andranno incontro a morte cellulare (Wootton & Smith, 2002).

Nelle uova, durante il processo di ovogenesi, viene accumulato il tuorlo costituito da lipidi, amminoacidi, carboidrati, proteine e tutte le sostanze necessarie per uno sviluppo corretto dell'embrione.

Quando le uova mancano di alcuni specifici composti, o ne contengono una quantità non sufficiente a permetterne il corretto sviluppo, l'embrione non sarà in grado di completare la crescita. Quindi, la qualità delle uova è strettamente correlata alla composizione del suo citoplasma (Carnevali et al., 2019). L'ovogenesi può essere suddivisa in cinque fasi principali:

1. Trasformazione delle cellule germinali primordiali (PGCs) in ovogoni
2. Trasformazione degli ovogoni in ovociti
3. Vitellogenesi
4. Maturazione degli ovociti
5. Ovocita maturo

L'ovocita completerà la meiosi e lo sviluppo solo se avverrà la fecondazione.

Nei teleostei, gli ovogoni vanno incontro a mitosi per tutta la vita cellulare, avremo quindi tanti ovogoni identici alla cellula madre (a meno che non sopraggiungano mutazioni).

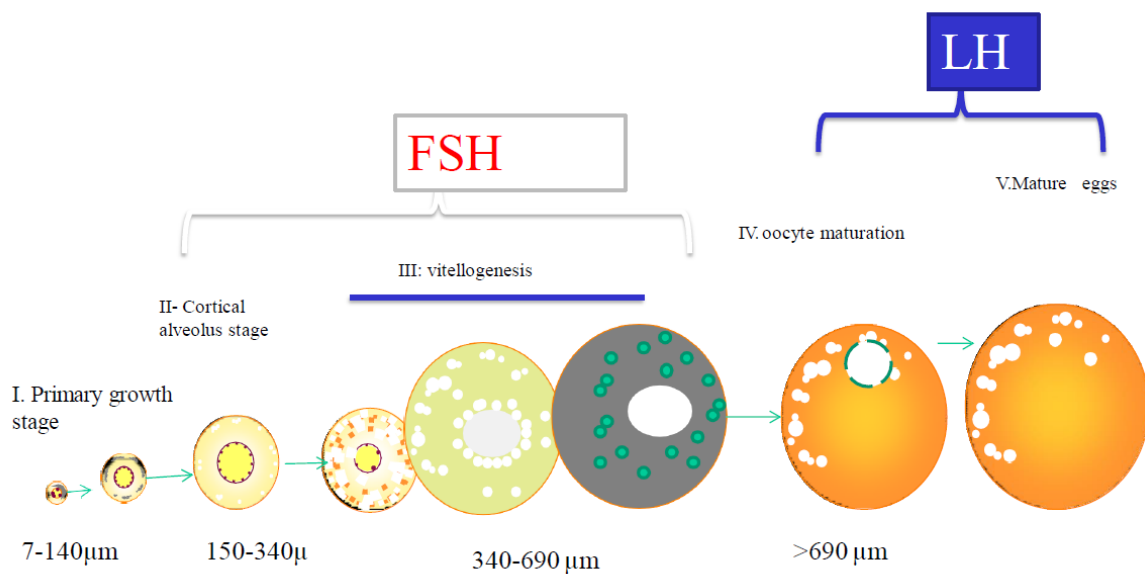


Figura 5: fasi dell'ovogenesi

Una parte degli ovogoni entra gradualmente in meiosi formando gli ovociti primari, mentre la restante parte continua a dividersi per mitosi, formando una riserva di ovociti per il futuro. Si parla quindi di ovogenesi continua.

Gli ovogoni, che entrano in meiosi con tempi diversi e con conseguenti stadi di maturazione differenti, permettono di definire l'ovario asincrono.

Gli ovarii di pesce spada sono organi pari allungati lungo l'asse cranio-caudale, situati nella zona addominale. Le estremità anteriori e laterali sono libere, mentre le estremità posteriori sono unite da un ovidotto comune che si apre all'esterno tramite il poro urogenitale (Corriero et al., 2004).

Durante l'intera stagione riproduttiva, la qualità delle uova rilasciate in colonna d'acqua può essere inferiore: man mano che si susseguono gli eventi

di *spawning* la quantità di tuorlo presente all'interno degli ovociti sarà via via inferiore.

Il processo che porta dalle cellule germinali primordiali, all'ovogonio e infine all'ovocita, è strettamente regolato dalla presenza di ormoni che permettono una maturazione graduale.

Da un punto di vista macroscopico, assistiamo ad un aumento generale delle dimensioni dell'ovocita, determinate da due fasi di accrescimento: la prima lenta e la seconda veloce.

Durante la fase di accrescimento lento, vi sarà la sintesi di proteine e macromolecole da parte dell'ovocita stesso sotto il controllo dell'FSH.

L'accrescimento veloce o esponenziale avviene grazie alla presenza di molecole esterne all'ovocita che verranno inglobate sotto il controllo dell'LH.

Le cellule germinali primordiali (PGCs) sono cellule embrionali indifferenziate, precursori di spermatogoni ed ovogoni, che possono trasformarsi in gameti maschili o femminili a seconda dell'ambiente che li circonda.

Nel momento in cui l'ovogonio entra in meiosi prenderà il nome di ovocita primario: ha inizio la profase che si bloccherà subito in diplotene. In questo stadio è possibile vedere i cromosomi “a spazzola”, non ancora condensati. La

divisione cellulare è bloccata ma gli eventi di trascrizione continuano.

All'interno del nucleo dell'ovocita primario si rendono fortemente visibili i nucleoli che si andranno a compattare insieme alle proteine ribosomiali. Oltre ai nucleoli, sono presenti delle strutture più scure dette Corpi di Balbiani, che caratterizzano un'area di citoplasma fortemente basofila in cui possiamo trovare un accumulo di ribosomi e proteine.

I singoli ovociti primari verranno avvolti da uno strato di cellule somatiche, formando le cellule della granulosa. Queste cellule somatiche, inoltre, secernono una lamina basale che andrà a separare le cellule della granulosa dalle cellule della teca (Wootton & Smith, 2002; Lubzens et al., 2010).

Dalla membrana dell'ovocita e dalle cellule della granulosa si iniziano a formare dei microvilli, che andranno ad intrecciarsi tra di loro permettendo un elevato scambio di ormoni e di macromolecole. Il complesso ovocita-cellule della granulosa-lamina basale-cellule della teca prende il nome di follicolo ovarico.

La fase di accrescimento lento è caratterizzata dalla sintesi da parte dell'ovocita di componenti che saranno essenziali durante le successive fasi di sviluppo. Tra questi abbiamo la comparsa degli alveoli corticali, vescicole di dimensione variabile che si originano dall'apparato di Golgi, ricche di proteine e carboidrati sintetizzati dall'ovocita stesso (Carnevali et al., 2019).

Il contenuto degli alveoli corticali è essenziale, avvenuta la fecondazione verrà riversato all'esterno andando a bloccare l'entrata degli altri spermatozoi. Ciò fa sì che non avvenga la polispermia.

In seguito alla formazione degli alveoli corticali, all'interno dell'ovocita si rendono evidenti le gocce lipidiche: lipidi neutri che i pesci utilizzano principalmente come riserva energetica. Probabilmente derivano da lipoproteine a bassissima densità (VLDL), ovvero ricche di trigliceridi, che vengono trasportate nel circolo ematico e inglobate dall'ovocita.

In alcune specie di teleostei, tra cui in *Xiphias gladius*, le gocce lipidiche sono importanti per la galleggiabilità delle uova, favorendo l'incontro tra uova e spermatozoi. La dimensione, il colore, la distribuzione e soprattutto la quantità delle gocce lipidiche, è differente da specie a specie, rendendole un biomarcatore in grado di discriminare ed identificare la specie che ha rilasciato le uova (Wootton & Smith, 2002). In questa fase si inizia a formare la zona radiata (o zona pellucida) un rivestimento di natura proteica che si posiziona tra la membrana plasmatica dell'ovocita e le cellule della granulosa, caratterizzato dalla presenza di numerosi fori attraversati dai filamenti citoplasmatici (Corriero et al., 2004). Questa struttura è costituita sia da proteine provenienti dall'ovocita stesso, sia da proteine prodotte dal fegato che verranno trasportate dal circolo ematico e internalizzate grazie a

particolari vescicole dette endosomi. Le dimensioni e il volume dell'ovocita sono nettamente aumentati. Si conclude la fase di accrescimento lento, sotto il controllo dell'ormone follicolostimolante (FSH).

La fase di accrescimento veloce caratterizza il passaggio da femmina immatura a femmina matura e darà inizio all'aumento delle dimensioni dell'ovocita.

Il processo principale dell'accrescimento veloce è la vitellogenesi: comprende la sintesi, il trasporto, l'assorbimento e l'elaborazione della vitellogenina (VTG) che verrà trasformata in lipoproteine e internalizzata nel tuorlo dell'ovocita.

La vitellogenina è una lipoglicofosfoproteina, con un elevato peso molecolare (300-640 KDa), è sintetizzata dal fegato, è la molecola precursore delle proteine del tuorlo ed è presente solo negli organismi femminili, definendola un gene sesso-specifico.

Le cellule della granulosa sotto lo stimolo dell'FSH producono estrogeni, in particolare 17β -estradiolo (o E_2). Gli estrogeni, tramite il circolo sanguigno, raggiungono il fegato e dopo essersi legati al loro recettore, stimolano la produzione di vitellogenina (Hiramatsu et al., 2015; Carnevali et al., 2006).

Nei teleostei, sono presenti differenti isoforme della vitellogenina (VtgAa, VtgAb, VtgC), le quali vengono assorbite ed utilizzate per la crescita degli ovociti.

La Vtg è caratterizzata da 5 regioni ben conservate: le regioni I, II e III si trovano nella porzione N-terminale e corrispondono alla subunità 1 della lipovitellina, mentre le regioni IV e V si trovano lungo la porzione C-terminale e corrispondono alla subunità 2 della lipovitellina.

L'ingresso della vitellogenina all'interno del follicolo ovarico avviene tramite i capillari delle cellule della teca, poi attraverso le cellule della granulosa e successivamente prende contatto con la superficie dell'ovocita attraverso la zona radiata (Carnevali et al., 2006; Carnevali et al., 2019) in cui troverà i recettori (VgR) per potersi legare.

In particolare, la vitellogenina non si lega a tutti gli ovociti ma verrà internalizzata solo da quelli che si trovano già allo stadio di *lipid stage*, che avranno quindi terminato lo stadio degli alveoli corticali e presenteranno i recettori di membrana per la vitellogenina.

Una volta avvenuto il legame vitellogenina-recettore sulla superficie dell'ovocita, essa potrà essere internalizzata tramite endocitosi di membrana. Successivamente, interverranno le catepsine, degli enzimi proteolitici

contenuti nei lisosomi, che avranno il compito di staccare la vitellogenina dal recettore. Il recettore verrà riciclato, mentre la vitellogenina verrà smantellata separando la componente lipidica, fosfatica e proteica che saranno pronte per essere utilizzate in caso di fecondazione. I componenti finali in cui viene scissa la vitellogenina sono: fosfovittina, lipovitellina, β -componenti e terminale C peptidico.

La lipovitellina è maggiormente prodotta, costituita da due polipeptidi LvA e LvB, rappresenta un'importante fonte di lipidi e di amminoacidi che saranno indispensabili durante lo sviluppo embrionale.

La vitellogenina non è l'unica molecola che le femmine trasferiscono alle uova, vi sono anche lipidi neutri e polari come i fosfogliceridi e i triacilgliceroli, vitamine e minerali.

Inoltre, tra la rete di microvilli che collega gli ovociti alle cellule della granulosa, vi sono delle giunzioni gap che formano dei canali acquosi consentendo il passaggio di ioni e altre piccole molecole. Durante la fase di accrescimento veloce, la massa delle gonadi può rappresentare fino al 20% del peso totale.

Contemporaneamente all'accumulo di vitellogenina, la zona radiata si ispessisce, formando un vero e proprio guscio in grado di proteggere l'ovocita evitando che, una volta ovulato, vada incontro a lesioni.

L'ovocita dopo aver terminato la vitellogenesi blocca la sua crescita: i microvilli si ritirano bloccando lo scambio di molecole con le cellule della granulosa. Si forma il micropilo attraverso il quale entrerà lo spermatozoo.

Dopo la vitellogenesi, ha inizio la fase di maturazione, scandita da due eventi principali: la ripresa della meiosi che si era bloccata in diplotene I e il richiamo di acqua dall'esterno per idratare degli ovociti.

La meiosi andrà avanti ma si bloccherà nuovamente in metafase II e verrà completata solo se ci sarà fecondazione da parte di uno spermatozoo. Al termine della fase di maturazione, l'ovocita raggiungerà il lume ovarico pronto per essere rilasciato.

Il progesterone è l'ormone steroideo che induce la maturazione degli ovociti.

L'ovocita attiva il recettore per il progesterone sulla membrana esterna solo al termine della vitellogenesi. Il legame progesterone-recettore attiva due segnali intracitoplasmatici: le CDC2 (chinasi ciclina-dipendenti) e la ciclina B.

L'attivazione di questi due segnali formerà il fattore promuovente la maturazione (MPF) che sarà in grado di far ripartire la meiosi bloccata in diplotene I.

Il nucleo migra verso la periferia favorendo una divisione asimmetrica, avviene la prima divisione meiotica, con la formazione di un ovocita e del primo globulo polare.

La migrazione avviene grazie ad un processo di coalescenza tra le vescicole di vitellogenina e le gocce lipidiche che spingeranno il nucleo verso la periferia. Il processo di coalescenza è aiutato dall'ingresso di acqua, sia per osmosi sia grazie alla presenza di acquaporine. Nelle specie marine con uova pelagiche, come il pesce spada, la quantità di acqua presente all'interno rappresenta fino al 90% della massa fresca dell'uovo. Inoltre, poiché l'acqua dolce richiamata all'interno, ha una densità inferiore rispetto all'acqua del mare, il processo di idratazione permette che le uova galleggino sulla superficie del mare.

L'ovocita prosegue la meiosi II fino all'arresto in metafase II. Al termine del processo di maturazione, la parete follicolare si rompe e l'ovocita viene ovulato nel lume ovarico. L'arrivo di uno spermatozoo farà aumentare i livelli citoplasmatici di Ca^{2+} e l'attivazione della calpaina, la proteina che permetterà di completare la meiosi II.

I globuli polari formati durante il processo andranno incontro ad apoptosi o ad autofagia, in un processo noto come atresia follicolare.

L'atresia follicolare è un normale processo che avviene all'interno dell'ovario, soprattutto nelle femmine che non sono in grado di portare a termine la maturazione degli ovociti dopo la vitellogenesi (Babin, 2007; Passantino et al., 2020). Prevede quindi il riciclo dei componenti cellulari inutilizzati, che potranno essere utilizzati durante i successivi eventi riproduttivi (Wootton & Smith, 2002; González-Kother et al., 2020). Alla fine del processo atresico, si formeranno dei depositi di pigmento, caratterizzati dalla presenza di lipofuscine (Lubzens et al., 2010).

Le varie componenti degli ovociti che sono andate incontro ad atresia follicolare, vengono smantellate e riassorbite, le cellule fagocitano gli organelli cellulari e degradano le proteine del tuorlo trasformandole in amminoacidi liberi, probabilmente tramite l'attivazione delle catepsine lisosomiali (Lubzens et al., 2010); le porzioni energetiche, come lipidi neutri e polari, vengono trasportate nuovamente al fegato tramite il circolo venoso per essere ulteriormente riciclate (Passantino et al., 2002).

Quest'ipotesi è supportata dalla presenza di proteine del tuorlo all'interno del circolo sanguigno, associate a lipoproteine ad alta densità (HDL) durante l'atresia follicolare (Babin, 1987).

Il processo di idrolisi e riassorbimento del tuorlo durante l'atresia, potrebbe permetterne la successiva ridistribuzione durante la formazione della nuova cellula uovo, evitando così di sintetizzare nuovamente tutte le componenti.

1.5 Pubertà

La pubertà è uno degli eventi più importanti nella vita di un pesce: è il processo tramite il quale gli organismi acquisiscono per la prima volta la capacità di riprodursi (Okuzawa, 2002), segnando così il passaggio dalla fase giovanile non riproduttiva a quella adulta, sotto il controllo dell'asse ipotalamo-ipofisi-gonade (Gioacchini et al., 2019).

I fattori che innescano la pubertà nei pesci sono poco chiari, recenti studi dimostrano che l'input è generalmente scandito dall'accumulo gli alveoli corticali o delle gocce lipidiche all'interno degli ovociti (Kumar & Trant, 2001; So et al., 2005). La fine della pubertà è invece scandita dalla produzione per la prima volta di gameti fertili, uova o spermatozoi (Taranger et al., 2010).

La maturazione sessuale dei teleostei è innescata da una complessa interazione tra stimoli ambientali, come temperatura e fotoperiodo, bilancio energetico, interazioni sociali, stato fisiologico e strategie riproduttive

(Gioacchini et al., 2019). L'età e la taglia in cui si verifica l'inizio della pubertà dipendono dalla specie di teleostei considerata: essa può variare da alcune settimane fino a dieci anni.

L'inizio della pubertà attiva l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade. Il GnRH è il primo ormone che viene sintetizzato e che dà inizio alla cascata ormonale.

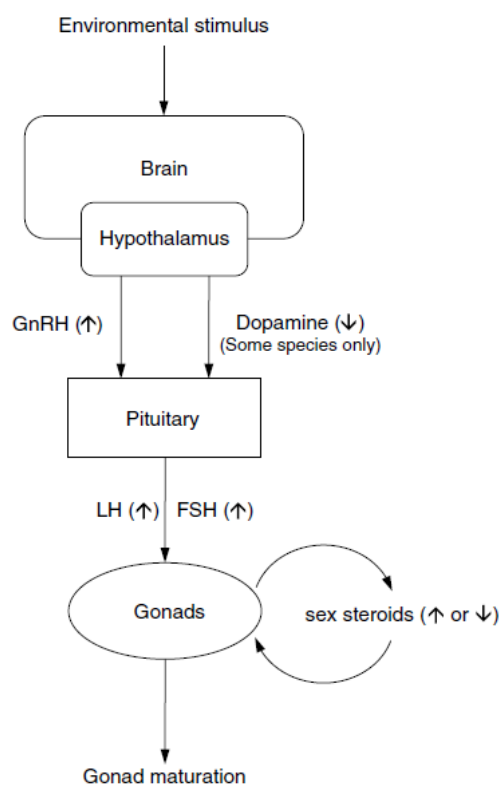


Figura 6: asse Ipotalamo-Ipofisi-Gonade

È costituito da dieci peptidi e viene sintetizzato nella forma di pre- e/o pro-ormone e successivamente tagliato enzimaticamente in posizione 33 e 23.

Nella maggior parte dei teleostei sono presenti tre differenti isoforme di GnRH espresse in differenti regioni del cervello: APO-GnRH nell'area preottica, NT-GnRH nel tetto ottico a livello del mesencefalo e CM-GnRH nell'area del bulbo olfattivo nel telencefalo (Okuzawa, 2002).

La presenza di isoforme differenti suggerisce la possibile presenza di tre distinti sistemi neuronali con ruoli fisiologici distinti.

L'isoforma APO-GnRH espressa nell'area preottica è la principale responsabile del rilascio delle gonadotropine che giungeranno alla ghiandola ipofisaria. Il ruolo delle altre due isoforme è ancora incerto, probabilmente l'isoforma prodotta nell'area del bulbo olfattivo è coinvolta nella trasmissione dei feromoni sessuali, mentre l'isoforma del mesencefalo potrebbe essere coinvolta nel controllo crono-biologico della riproduzione.

Una volta prodotta, l'isoforma APO-GnRH dovrà raggiungere l'ipofisi, stimolando la produzione delle gonadotropine LH e FSH che, tramite il circolo ematico, raggiungeranno le gonadi permettendo la maturazione dei gameti.

In passato si credeva che il GnRH a livello dell'ipotalamo non avesse alcun recettore e che per esplicare la sua funzione dovesse prima essere trasferito alla ghiandola pituitaria; tuttavia, recenti studi hanno evidenziato che il

neuropeptide *kiss*, una statina con la capacità di sopprimere il melanoma e le metastasi del cancro al seno nei mammiferi, stimola la produzione del GnRH a livello dell'ipotalamo divenendo la chiave di collegamento tra l'asse ipotalamo-ipofisi-gonade e gli altri organi vitali.

Le gonadi hanno due funzioni principali: la produzione delle cellule germinali durante l'ovogenesi o la spermatogenesi e la produzione degli ormoni steroidei (steroidogenesi), che aumenta fortemente durante la pubertà (Okuzawa, 2002; Taranger et al., 2010).

La biosintesi degli ormoni steroidei è mediata da una complessa serie di enzimi che rielaborano il colesterolo convertendolo prima in progesterone, successivamente in testosterone ed infine in estrogeni. Affinché gli ormoni steroidei abbiano un effetto biologico, devono raggiungere le loro cellule bersaglio. Sia gli organismi maschili che femminili contengono i tre ormoni steroidei, ciò che cambia è la loro quantità all'interno della gonade. Infatti, negli organismi femminili la maggior parte del testosterone prodotto verrà rielaborato formando estrogeno, mentre negli organismi maschili il testosterone rimarrà all'interno delle cellule somatiche e una piccola quantità verrà trasformata in estrogeno.

In molte specie di teleostei, soprattutto nelle farm, l'inizio della pubertà può essere controllato sia condizionando fattori ormonali, come gli ormoni

steroidi, i fattori di crescita insulino-simili (IGF-I) o la leptina, sia fattori ambientali come il fotoperiodo o la temperatura dell'acqua (Okuzawa, 2002; Saha et al., 2002; Taranger et al., 2010).

Quindi, manipolando contemporaneamente questi fattori, e considerando anche la disponibilità alimentare e il contenuto lipidico, possiamo determinare con un buon grado di precisione quando la specie inizierà la pubertà.

1.6 Metabolismo

Per metabolismo si intende il complesso di reazioni biochimiche che avvengono all'interno dell'organismo permettendone l'accrescimento e il mantenimento vitale.

Il metabolismo è generalmente diviso in reazioni cataboliche ed anaboliche.

Le prime sono reazioni di degradazione, atte a liberare energia, mentre le seconde sono reazioni di sintesi che invece richiedono un apporto energetico.

Il fegato è un organo semplice, compatto ed omogeneo, sede di accumulo di lipidi e carboidrati, che svolge un ruolo chiave nel metabolismo di molti teleostei.

I lipidi sono un'importante riserva energetica per l'organismo; sono molecole anfipatiche, insolubili in acqua, polari o non-polari.

Possono essere introdotti tramite l'alimentazione e accumulati nel tessuto adiposo come riserva energetica, essere sintetizzati dall'organismo stesso a livello del fegato, essere utilizzati per la costruzione delle membrane degli organuli, ma anche essere ridotti in lipidi a catena corta. I lipidi, essendo insolubili nel sangue, sono trasportati nel circolo ematico grazie alle lipoproteine. Si distinguono diversi tipi di lipoproteine: HDL (*High Density Lipoproteins*), LDL (*Low Density Lipoproteins*) e VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*), caratterizzate da un diverso contenuto lipidico.

I lipidi possono essere suddivisi in tre grandi sottogruppi: lipidi semplici, complessi e steroidi.

I lipidi semplici comprendono i trigliceridi (o triacilgliceroli): sono esteri neutri del glicerolo, legati a tre catene di acidi grassi. Sono i composti maggiormente introdotti con la dieta e utilizzati come deposito per formare il grasso sottocutaneo e viscerale. Per ottenere energia, è necessario che i trigliceridi vengano scomposti per idrolisi nei loro componenti base, acidi grassi e glicerolo, in un processo noto come lipolisi. Gli acidi grassi liberati, saranno ancora ridotti dalla β -ossidazione formando l'acetil-coenzima A che

sarà utilizzato nel ciclo di Krebs, mentre il glicerolo prenderà parte alla glicolisi sotto forma di diidrossiacetonefosfato (DHAP).

Gli acidi grassi sono i lipidi più semplici: se presentano legami singoli sono definiti monoinsaturi, mentre se hanno legami doppi sono noti come polinsaturi. Nei teleostei, animali a sangue freddo, la presenza di acidi grassi polinsaturi è significativa: permette ai grassi di mantenere la loro fluidità anche in presenza di basse temperature.

Gli steroli sono una classe di lipidi policiclici, prodotti sia da animali (zoosteroli) che da vegetali (fitosteroli). Il principale zoosterolo è il colesterolo. La molecola di colesterolo è costituita da quattro anelli rigidi, un'estremità polare ed una non polare, ed è uno dei principali costituenti delle membrane cellulari nonché il precursore degli ormoni steroidei (testosterone, progesterone ed estradiolo). Il colesterolo è sintetizzato sia a livello esogeno, a partire dall'acetil-coenzima A, sia a livello endogeno dal fegato e successivamente trasportato in tutto l'organismo.

Il fegato interviene inoltre nei seguenti processi:

- Glicogenosintesi e glicogenolisi, che contribuiscono a mantenere la glicemia stabile durante la giornata, indipendentemente dal periodo di alimentazione o di digiuno.

- Produzione della bile, facilitando la digestione e l'assorbimento dei grassi e di altre sostanze liposolubili come le vitamine A, D, E e K
- Produzione degli eritrociti.
- Risposta immunitaria, stimolando l'azione dei linfociti e dei granulociti.
- Detossificazione, favorendo l'eliminazione di potenziali sostanze tossiche, siano esse endogene o esogene.

1.7 Melanomacrofagi

I melanomacrofagi sono dei macrofagi che contengono accumuli di pigmento, derivati dalla degradazione di sostanze endogene ed esogene, presenti negli organi interni di numerosi organismi come pesci, rettili e anfibi (Agius & Roberts, 2003). Nei teleostei, sono solitamente presenti negli organi ematopoietici come milza, reni e fegato, ma anche nel pancreas e nelle branchie (Dang et al., 2019; Qualhato et al., 2018).

In *Xiphias gladius*, abbiamo studiato i melanomacrofagi presenti a livello epatico. Il fegato, nei pesci, è considerato un buon indicatore dello stato di salute: è un organo chiave che controlla numerose funzioni vitali e gioca un

ruolo importante nel catabolismo e anabolismo degli xenobiotici (Cionna et al., 2006; Desantis et al., 2005; Passantino et al., 2020).

I melanomacrofagi sono suddivisi in base alla loro struttura in melanomacrofagi singoli (MMs) e centri di melanomacrofagi (MMCs).

Un centro di melanomacrofagi, viene definito tale, quando è possibile notare in esso, più di tre melanomacrofagi singoli uniti tra di loro.

I MMCs sono aggregati di macrofagi, hanno un ruolo importante nella distruzione, detossificazione e riciclo di materiale endogeno ed esogeno, tra cui cellule morte e detriti cellulari (Gogal et al., 1999; Passantino et al., 2014; Basilone et al., 2018; Passantino et al., 2020); si accrescono tramite meccanismi di fagocitosi e formano strutture, solitamente circolari, di dimensioni variabili (Basilone et al., 2018; Kalita et al., 2019).

I melanomacrofagi, inoltre, possono essere classificati in ben strutturati e non strutturati, in base alla presenza o assenza di una sottile membrana, costituita da un singolo strato di cellule appiattite, che forma una barriera circondando i centri di melanomacrofagi (Dang et al., 2019).

Secondo gli studi di Dang et al. (2019) svolti sulla milza di vari teleostei, qualora la densità dei MMCs sia elevata, sono facilmente riscontrabili MMCs ben strutturati, mentre i MMCs non strutturati sono maggiormente presenti

quando la densità è bassa. Nei reni, la maggior parte dei MMCs non strutturata. Nel fegato, pancreas e branchie sono invece maggiormente presenti i MMCs ben strutturati, con una membrana definita, anche quando vi è una scarsa abbondanza di centri.

I melanomacrofagi sono costituiti da tre pigmenti: melanina, lipofuscina ed emosiderina.

La melanina in *Xiphias gladius* è il pigmento predominante: i melanomacrofagi del pesce spada appaiono difatti di color marrone-nero. La melanina sembra provenire dagli organelli precursori della melanina o dalla fagocitosi di granuli di melanina stessa (Kalita et al., 2019); la melanina, inoltre, neutralizza i radicali liberi rilasciati durante la rottura della membrana cellulare (Qualhato et al., 2018).

La lipofuscina è definita il “pigmento dell’invecchiamento”; è costituita da residui dell’ossidazione di lipidi, come acidi grassi e trigliceridi, e proteine. Tali ossidazioni rendono la lipofuscina non degradabile. La melanina e la lipofuscina hanno un elevato peso molecolare, sono di color giallo, giallo-bruno o nero e resistenti alle più comuni tecniche di digestione (Agius, 1979).

L'emosiderina è invece un composto di deposito del ferro che si genera quando è presente in elevate quantità. Quasi certamente deriva dalla degradazione degli eritrociti.

I melanomacrofagi vengono trasferiti, tramite il circolo ematico, all'organo o al tessuto nel quale vengono richiamati. Dopo aver svolto la loro funzione, possono andare incontro a diversi destini: morte cellulare programmata (apoptosi), aggregarsi ad un centro già esistente, aggregarsi per formare un nuovo centro, ritornare al circolo ematico ed andare a fagocitare in una nuova area.

Nei teleostei come *Thunnus thynnus*, *Myoxocephalus scorpius*, *Alepocephalus bairdii* e *Nuemarheilus barbutulus*, la stretta relazione tra i centri di melanomacrofagi, presenti sia a livello epatico che renale, ed i vasi sanguigni, i dotti biliari e le aree necrotiche o infiammate è stata documentata da numerosi autori (Agius, 1979; Agius & Roberts, 2003; Passantino et al., 2020; Dang et al., 2019).

Studi condotti a livello epatico, sul rutilo *Rutilus rutilus* (Pronina et al., 2014) e sui guppy *Poecilia reticulata*, (Sousa et al., 2018), hanno evidenziato una situazione analoga a *Xiphias gladius*, evidenziando che, la maggior parte dei MMCs presenti nel fegato, sono stati ritrovati associati o incorporati all'interno dei vasi sanguigni o dei dotti biliari o delle aree necrotiche.

La quantità di MMCs, la loro dimensione e la quantità di pigmenti presenti all'interno degli organismi, varia in base alla specie considerata, all'organo esaminato, all'età e alle condizioni nutrizionali (Kalita et al., 2019; Fishelson 2005; Miller & Weisman 2006). A tutti questi fattori intrinseci, si aggiungono anche quelli estrinseci come i parametri delle acque, l'acidificazione, la salinità e la temperatura nonché gli stress antropomorfi.

La funzione principale dei melanomacrofagi è la fagocitosi di materiale di origine endogena o esogena (Steinel & Bolnick, 2017). Inoltre, nei teleostei, i centri di melanomacrofagi, giocano un ruolo importante nella risposta immunitaria e nella protezione immunologica, definiti dei biomarker di effetto, per differenti tipi di stress, tra cui: esposizione a metalli pesanti, radicali liberi, erbicidi o infezioni parassitarie; proprio per questo sono utilizzati come biomarcatori per valutare il loro stato di salute (Qualhato et al., 2018; Fonseca Martins et al., 2020; Sayed et al., 2019).

Proprio la loro correlazione con la risposta immunitaria e le infezioni ha fatto ipotizzare che i MMC sono analoghi o dei precursori dei centri germinali (GC) nei mammiferi (Steinel & Bolnick, 2017).

I melanomacrofagi sono coinvolti nella distruzione di materiale endogeno ed esogeno, tra cui cellule morte e detriti cellulari, e sono associati a processi di apoptosi (Gogal et al., 1999). È possibile evidenziare un aumento dei centri di

melanomacrofagi a livello epatico, sia numerico, sia di densità totale ed inoltre, un aumento dei livelli di espressione del citocromo P450 monossigenasi (CYP1A).

Questo aumento è principalmente causato da una maggiore esposizione ai distruttori endocrini come i componenti tossici o gli xenobiotici (Agius & Roberts, 2003; Passantino et al., 2014; Passantino et al., 2020), già evidenziato in numerosi organismi come, *Thunnus thynnus* (Passantino et al., 2014), *Engraulis encrasicolus* (Basilone et al., 2018), *Clarias gariepinus* (Sayed et al., 2019).

Capitolo secondo

SCOPO DELLA TESI

Xiphias gladius è una delle principali specie ittiche del Mar Mediterraneo, nonché una risorsa commerciale fondamentale nel Mar Adriatico centrale.

Lo scopo di questa tesi è quello di studiare lo stato di salute e valutare la risposta allo stress ed il metabolismo in femmine immature e mature, pescate in tre periodi riproduttivi differenti: *spawning*, *regressing* e *spent* rispettivamente nei mesi di agosto, settembre e novembre 2021.

A tal scopo, la risposta allo stress è stimata tramite la quantificazione dei melanomacrofagi, sia singoli sia appartenenti a centri di melanomacrofagi, mentre le analisi sul metabolismo sono state effettuate tramite la conta dei lipidi.

Capitolo terzo

MATERIALI E METODI

3.1 Disegno sperimentale e campionamento

Per questo studio è stata presa in esame la specie *Xiphias gladius*, pescata nel Mar Adriatico centrale, tra Pesaro e Rimini, nei mesi di agosto, settembre, ottobre e novembre 2021.

I campionamenti sono stati effettuati seguendo le linee guida stipulate dall'ICCAT (*International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas*) riguardo la pesca di esemplari commerciali.

In questo studio sono state esaminate 48 femmine di *Xiphias gladius*, 25 immature e 23 mature: è stato possibile conoscere il peso (in Kg) dell'organismo eviscerato, ma non è stato possibile misurare la LJFL (*Lower Jaw Fork Length*), misurata dalla mascella inferiore fino alla forca, per ognuno di questi individui.

Per ogni esemplare di *Xiphias gladius*, ci sono stati forniti i campioni di fegato e gonade all'interno di sacchetti e mantenuti in stiva frigorifera fino allo sbarco e l'arrivo in laboratorio.

ID CAMPIONE	DATA	ZONA DI PESCA	PESO (Kg)	MESE	SESSO
swo12	14/08/2021	Pesaro-Rimini	9,1	agosto	F_IMM
swo1	08/08/2021	Pesaro-Rimini	10,2	agosto	F_IMM
swo29	22/08/2021	Pesaro-Rimini	10,4	agosto	F_IMM
swo24	22/08/2021	Pesaro-Rimini	11,1	agosto	F_IMM
swo34	27/08/2021	Pesaro-Rimini	12,6	agosto	F_IMM
swo33	27/08/2021	Pesaro-Rimini	13,7	agosto	F_IMM
swo32	27/08/2021	Pesaro-Rimini	13,9	agosto	F_IMM
swo2	08/08/2021	Pesaro-Rimini	15,8	agosto	F_IMM
swo4	08/08/2021	Pesaro-Rimini	16,4	agosto	F_IMM
swo18	14/08/2021	Pesaro-Rimini	21,5	agosto	F_MAT
swo6	08/08/2021	Pesaro-Rimini	22,6	agosto	F_MAT
swo17	14/08/2021	Pesaro-Rimini	23,4	agosto	F_MAT
swo16	14/08/2021	Pesaro-Rimini	23,7	agosto	F_MAT
swo5	08/08/2021	Pesaro-Rimini	24	agosto	F_MAT
swo13	14/08/2021	Pesaro-Rimini	24	agosto	F_MAT
swo21	22/08/2021	Pesaro-Rimini	26,2	agosto	F_MAT
swo28	22/08/2021	Pesaro-Rimini	28	agosto	F_MAT
swo41	02/09/2021	Pesaro-Rimini	11,1	settembre	F_IMM
swo35	02/09/2021	Pesaro-Rimini	12,8	settembre	F_IMM
swo47	05/09/2021	Pesaro-Rimini	14,5	settembre	F_IMM
swo80	26/09/2021	Pesaro-Rimini	15,2	settembre	F_IMM
swo81	26/09/2021	Pesaro-Rimini	15,2	settembre	F_IMM
swo78	26/09/2021	Pesaro-Rimini	15,8	settembre	F_IMM
swo59	13/09/2021	Pesaro-Rimini	16,7	settembre	F_IMM
swo63	13/09/2021	Pesaro-Rimini	18,3	settembre	F_IMM
swo49	05/09/2021	Pesaro-Rimini	21	settembre	F_MAT
swo62	13/09/2021	Pesaro-Rimini	21,7	settembre	F_MAT
swo51	05/09/2021	Pesaro-Rimini	22,7	settembre	F_MAT
swo65	19/09/2021	Pesaro-Rimini	23	settembre	F_MAT
swo50	05/09/2021	Pesaro-Rimini	23,5	settembre	F_MAT
swo72	19/09/2021	Pesaro-Rimini	24,7	settembre	F_MAT
swo44	02/09/2021	Pesaro-Rimini	25,2	settembre	F_MAT
swo82	26/09/2021	Pesaro-Rimini	25,7	settembre	F_MAT
swo45	05/09/2021	Pesaro-Rimini	26	settembre	F_MAT
swo69	19/09/2021	Pesaro-Rimini	26,7	settembre	F_MAT
swo79	26/09/2021	Pesaro-Rimini	27,6	settembre	F_MAT
swo155	26/11/2021	Pesaro-Rimini	10,5	novembre	F_IMM
swo115	03/11/2021	Pesaro-Rimini	11,4	novembre	F_IMM
swo133	14/11/2021	Pesaro-Rimini	13,7	novembre	F_IMM
swo132	14/11/2021	Pesaro-Rimini	15,7	novembre	F_IMM
swo139	14/11/2021	Pesaro-Rimini	16,8	novembre	F_IMM
swo114	03/11/2021	Pesaro-Rimini	17,3	novembre	F_IMM
swo128	08/11/2021	Pesaro-Rimini	24,6	novembre	F_MAT
swo146	22/11/2021	Pesaro-Rimini	25,6	novembre	F_MAT
swo144	22/11/2021	Pesaro-Rimini	27,2	novembre	F_MAT
swo126	08/11/2021	Pesaro-Rimini	29,1	novembre	F_MAT
swo125	08/11/2021	Pesaro-Rimini	31,6	novembre	F_MAT
swo117	03/11/2021	Pesaro-Rimini	34	novembre	F_MAT

Tabella 1: campioni di *X. gladius* analizzati

3.2 Analisi istologiche

Per le analisi istologiche ci si è concentrati sulla gonade, per identificare lo stadio riproduttivo, e il fegato, per quantificare i melanomacrofagi ed i lipidi.

Dai campioni presi allo sbarco, sono stati campionati porzioni di gonade e di fegato di circa 3-4 mm² e inserite all'interno di eppendorf. Successivamente, i campioni destinati alle analisi istologiche sono stati fissati in formol, un fissativo composto da formaldeide e gluteraldeide.

Per il processo di inclusione in paraffina, i campioni vengono inseriti all'interno di biocassette istologiche (Bio-Optica, Milan, Italy). Il primo step prevede una disidratazione del campione, essenziale per eliminare non solo l'acqua ma anche l'eccesso di fissativo.

La disidratazione viene effettuata tramite passaggi in etanolo (EtOH) crescente (50%, 70%, 80%, 95% e due fasi in alcool 100%), poi in xilene per 45 minuti ed infine, i campioni vengono immersi in paraffina bianca per 2h e in paraffina blu per 1.30h.

I campioni vengono poi inclusi in blocchetti di paraffina blu e lasciati solidificare per l'intera notte. In seguito, i blocchetti sono stati tagliati al microtomo Leica RM2125 RTS (Biosystems), con uno spessore di 4µm. In ogni vetrino vengono posizionate 3 sezioni per la gonade e 5 per il fegato, con

uno scarto di dieci tagli tra la sezione precedente e la successiva, cosicché da avere una visione globale dell'intero campione.

Le sezioni vengono lasciate asciugare e poi colorate con ematossilina-eosina (H&E): il processo prevede una breve fase in xilene, per eliminare la paraffina in eccesso, seguita da una fase di idratazione tramite passaggi decrescenti (100%, 95%, 80%, 70%) in EtOH.

Le sezioni di tessuto sono lavate in acqua corrente per 10 minuti, colorate con ematossilina per 1.40 minuti e sciacquate per eliminare il colorante in eccesso. Successivamente, vengono colorate con eosina per 1.50 minuti e nuovamente poste in acqua corrente per 2 minuti. I campioni sono poi deidratati in EtOH a concentrazioni crescenti (70%, 80%, 95%, 100% I, 100% II) e lasciati in xilene per 10 minuti.

Al termine, i vetrini colorati verranno montati con i vetrini copri oggetto utilizzando una colla acrilica trasparente SafeMount® (Bio-Optica, Milan, Italy).

I vetrini verranno osservati al microscopio Zeiss Axio Imager M2 e fotografate per mezzo della camera ad alta risoluzione ZEISS Axiocam 105 color.

Le immagini delle gonadi vengono catturate con ingrandimento al 10x per identificare lo stadio di maturazione, mentre nel fegato utilizziamo un ingrandimento al 20x per l'identificazione e la quantificazione dei melanomacrofagi, ed al 40x per quella dei lipidi.

Per ogni vetrino vengono scattate 5 microfotografie in aree casuali della sezione, al fine di poter valutare l'area dei melanomacrofagi singoli (MMs) e l'area dei centri di melanomacrofagi (MMC) tramite il programma ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Per la quantificazione dei lipidi vengono scattate 5 microfotografie al 40x in aree casuali della sezione e misurata l'area dei lipidi tramite il programma ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

Sia per i lipidi che per i melanomacrofagi, la quantificazione è ripetuta in doppia replica, al fine di ridurre il *bias* dell'errore umano.

3.3 Gonadal Index (GI)

Per la classificazione delle gonadi nei differenti periodi riproduttivi: immature, mature attive, mature in *spawning*, post-*spawning* e *regressing*, abbiamo calcolato l'indice gonadale delle femmine di pesce spada nei mesi di agosto, settembre, ottobre e novembre.

In accordo con Marisaldi et al., (2019), il GI è stato calcolato utilizzando il peso della gonade (GW) ed il peso dell'organismo (W) come segue:

$$GI = \frac{GW(gr)}{W(gr)}$$

I risultati sono stati analizzati con GraphPad 6 Prism, utilizzando il metodo ANOVA con p-value <0.05.

3.4 Analisi statistiche

È stata condotta un'analisi di correlazione con il metodo Pearson utilizzando R-studio ed il comando *cor.test* tra gli MMs e gli MMCs (sia area che conta) ed il peso di ogni animale. Inoltre, la stessa analisi è stata condotta con lo stesso metodo tra l'area dei lipidi e il peso. Per valutare le differenze tra le femmine immature dei mesi di agosto, settembre e novembre, e le femmine mature degli stessi mesi, è stata condotta un'analisi tramite il programma GraphPad 6 Prism, utilizzando il metodo ANOVA con p-value < 0.05.

In seguito, sono stati analizzati i *pairwise* tra le femmine immature e mature in ogni singolo mese con il programma GraphPad 6 Prism, utilizzando il test del t-student, con p-value <0.05.

Capitolo quarto

RISULTATI

4.1 Taglie di cattura

Affinché potessimo avere una visione globale della taglia di cattura degli esemplari di *Xiphias gladius* in Mar Adriatico centrale, per la creazione di questo grafico e dei successivi, sono stati presi in considerazione tutti gli esemplari di pesce spada di sesso femminile pescati nei mesi di agosto, settembre, ottobre e novembre.

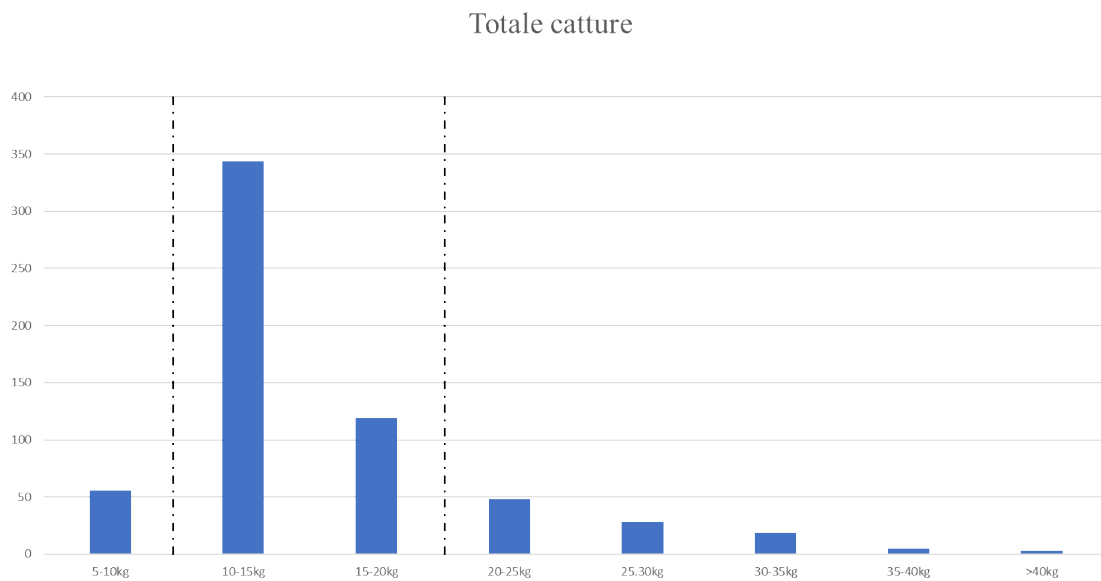


Figura 7: Istogramma a barre con totale taglie di cattura di in tutti i mesi di campionamento.

Il grafico ci mostra il totale dei campioni pescati, suddivisi per classi di taglia di 5 kg, durante l'intera stagione di pesca, da una singola imbarcazione.

Attualmente, in accordo con le misure di gestione dell'ICCAT, la taglia minima di cattura è di 10 kg. Possiamo notare come la maggior parte delle catture ricada all'interno della fascia 10-15kg e 15-20 kg.

Sapendo che le femmine di pesce spada raggiungono la maturità sessuale oltre i 20 kg, possiamo constatare come l'80% degli sbarcati riguardi esemplari ancora immaturi, che non si sono mai riprodotti.

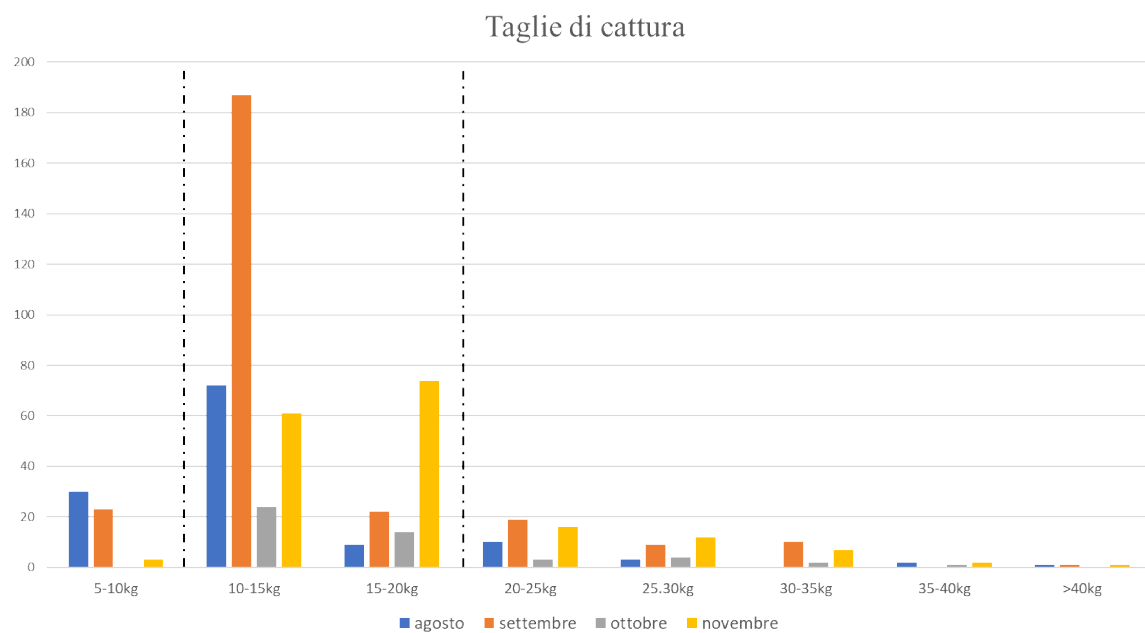


Figura 8: Istogramma a barre con che mostra le classi di taglia maggiormente sbarcate

Dal grafico possiamo notare come in tutti i mesi di pesca la taglia maggiormente sbarcata è 10-15kg, seguita dalla fascia 15-20kg. Oltre i 20kg notiamo un decremento nelle quote di cattura in tutti i mesi di pesca.

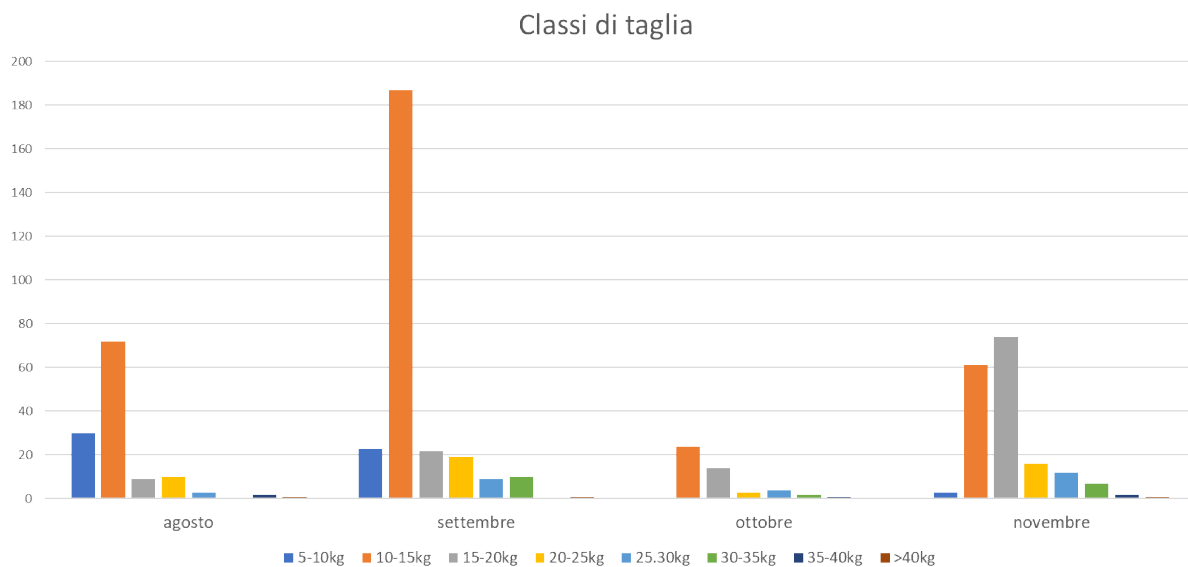


Figura 9: Relazione tra numero di individui sbarcati e mese di campionamento

Il grafico ci mostra le classi di taglia maggiormente sbarcate nei mesi di agosto, settembre, ottobre e novembre. Notiamo come ad agosto e settembre la fascia maggiormente sbarcata sia ancora quella 10-15 kg.

Nel mese di ottobre, vi è ancora una prevalenza della fascia 10-15kg ma il dato si discosta poco dalla classe di taglia successiva. Nel mese di novembre osserviamo invece un'inversione del trend, con un aumento degli sbarcati nella classe di taglia 15-20 kg.

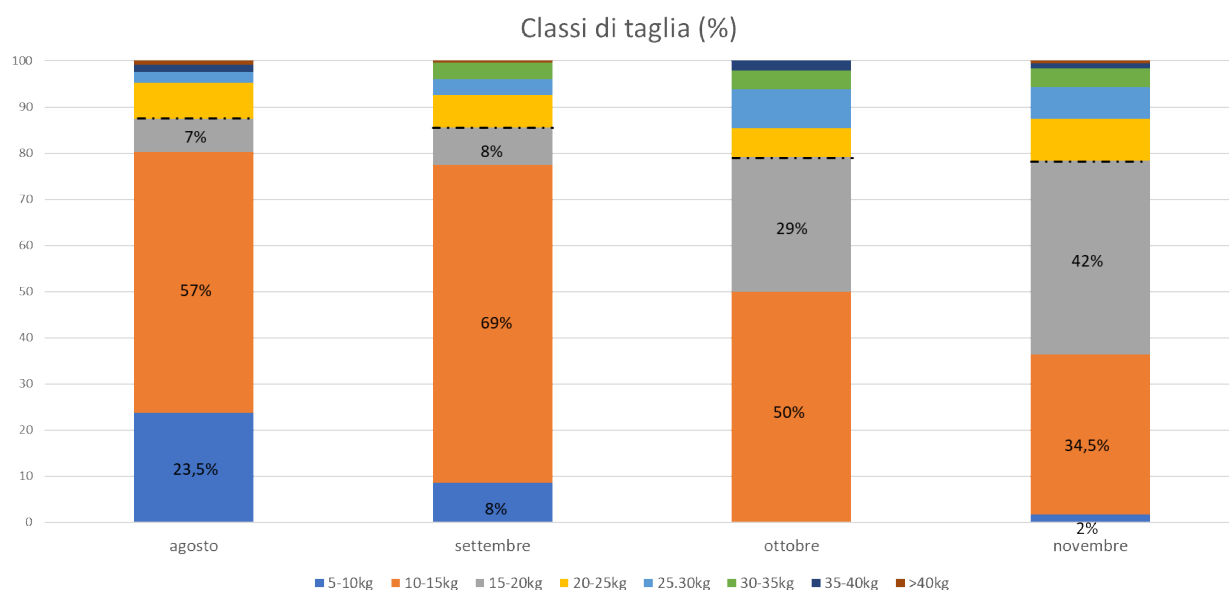


Figura 11: percentuale di immaturi sbarcati in ogni mese di campionamento

Il grafico ci permette di visualizzare la percentuale dello sbarcato nelle varie classi di taglia. Indicando come limite tra le femmine immature e mature la linea tratteggiata, possiamo ancora una volta osservare come in tutti i mesi di campionamento, in particolare nel mese di agosto, dove lo sbarcato raggiunge quasi il 90% del totale, la maggior parte ($\approx 80\%$) dello sbarcato sia rappresentato dalle taglie inferiori.

4.2 Quantificazione dei melanomacrofagi

Per le analisi effettuate sullo stato di salute e sulla riproduzione degli esemplari femminili di *Xiphias gladius*, ci siamo focalizzati su un numero ridotto di campioni (48), suddivisi nei mesi di agosto, settembre e novembre.

Le sezioni istologiche di fegato di *Xiphias gladius*, provenienti da 48 campioni di femmine mature ed immature e campionate nei mesi di agosto, settembre e novembre, sono state microfotografate con ingrandimento 20x, e successivamente analizzate al fine di quantificare l'area dei centri di melanomacrofagi (MMCs), l'area dei melanomacrofagi singoli (MMs), l'area totale dei centri e dei singoli (MMCs + MMs).

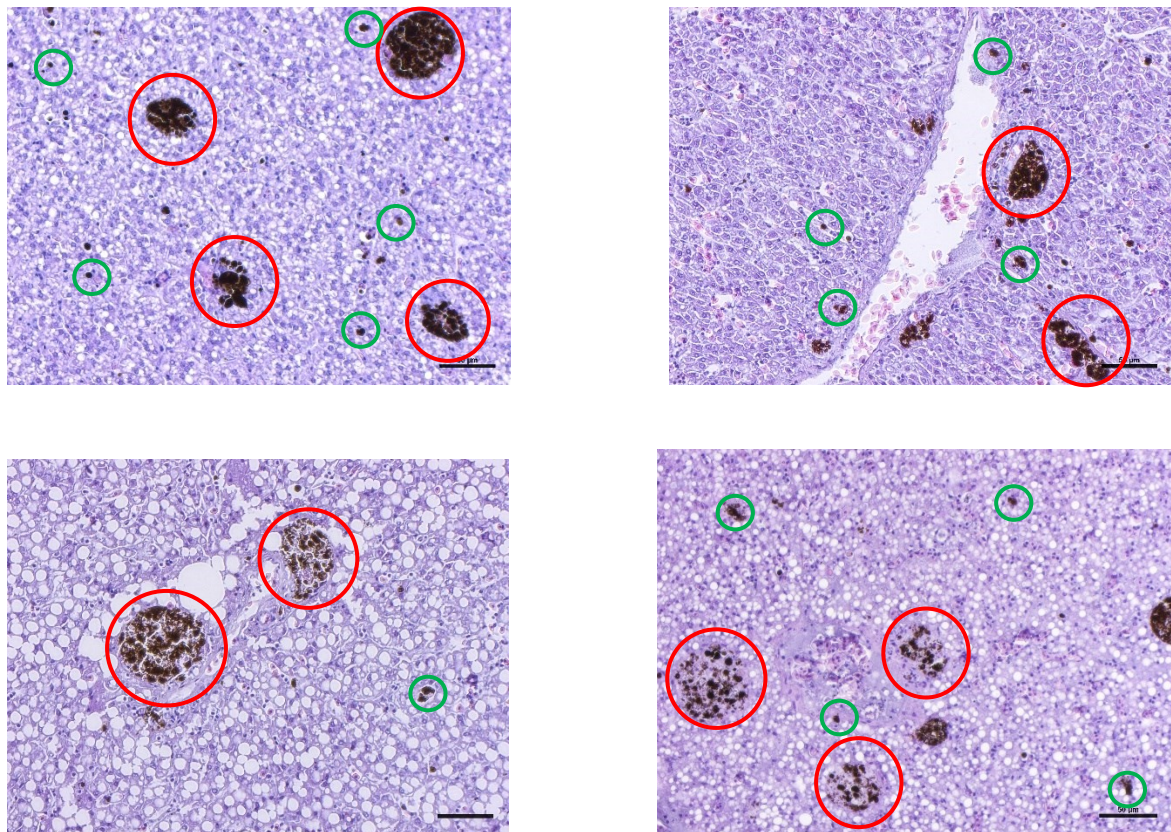


Figura 12: sezioni di fegato di *Xiphias gladius* con ingrandimento 20x: MMCs (cerchio rosso) e MMs (cerchio verde).

4.2.1 Test di correlazione MMCs e MMs

Sono stati effettuati test di correlazione con il metodo Pearson per valutare la relazione tra: l'area dei MMC ed il peso, il numero dei MMC ed il peso, l'area dei MM ed il peso e il numero dei MM ed il peso.

Per effettuare la correlazione, i campioni non vengono suddivisi per classi di taglia, cosicché da avere una visione macroscopica dei risultati.

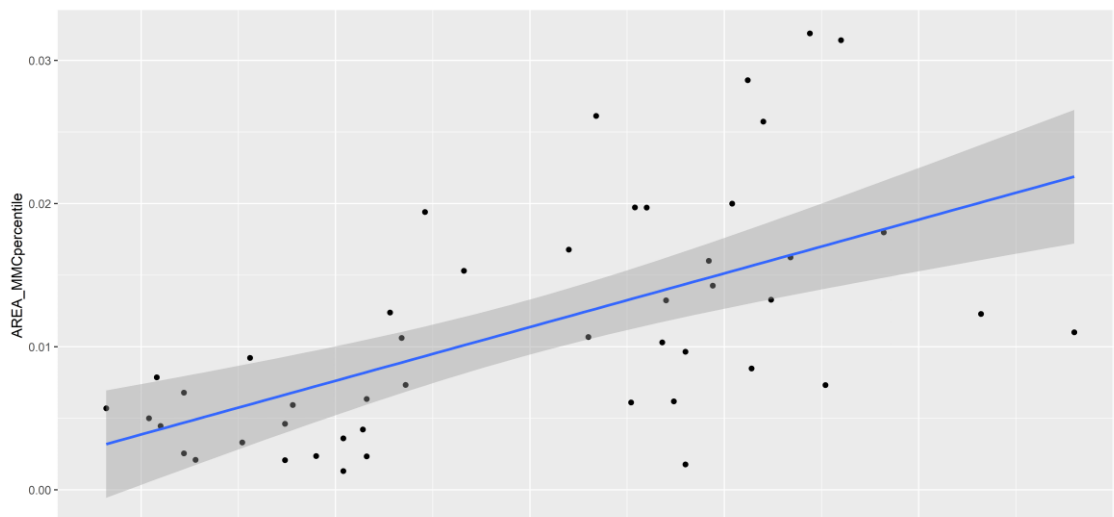


Figura 13: Test di correlazione Pearson area MMC-peso (kg)

Il test di correlazione, tra l'area dei centri di melanomacrofagi (kht) ed il peso (Kg), ha evidenziato che l'area dei MMC aumenta all'aumentare del peso dell'organismo. Si evince quindi una correlazione positiva (p-value: 0.001030) per un coefficiente di correlazione di 0.596.

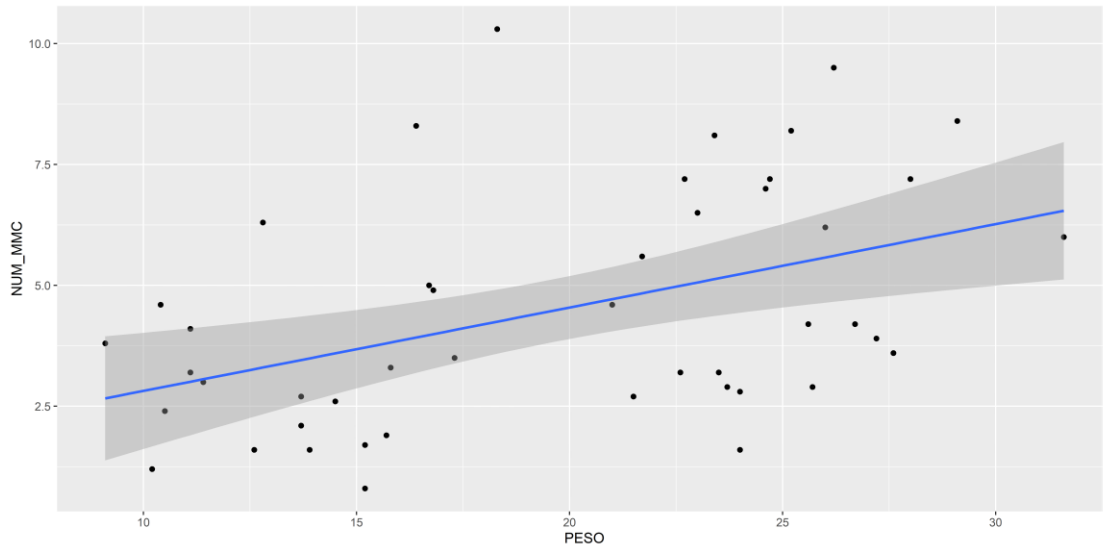


Figura 14: Test di correlazione Pearson numero di MMC-peso (kg)

Il test di correlazione, tra il numero totale dei centri di melanomacrofagi (MMCs) ed il peso (Kg) ha evidenziato una correlazione positiva (p-value: 0.0085), con un aumento del numero dei MMC in relazione al peso, aventi un coefficiente di correlazione di 0.0445.

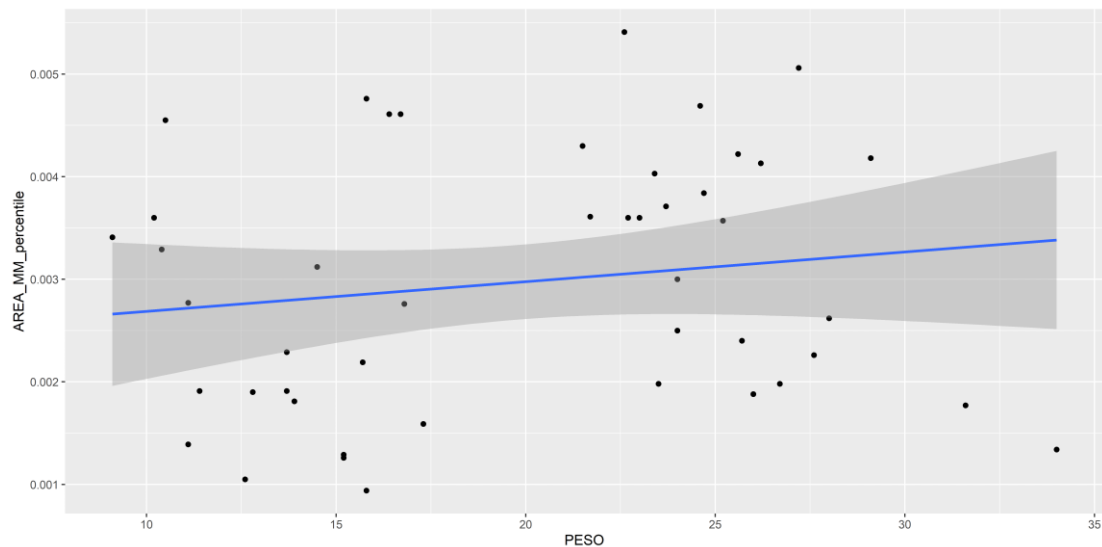


Figura 15: Test di correlazione Pearson area MM-peso (kg)

Il test di correlazione, effettuato tra l'area dei melanomacrofagi singoli (kht) ed il peso (Kg), non ha evidenziato alcuna correlazione significativa (p-value: 0.2992) con coefficiente di correlazione di 0.156, per cui l'area dei MMs si mantiene costante nel tempo.

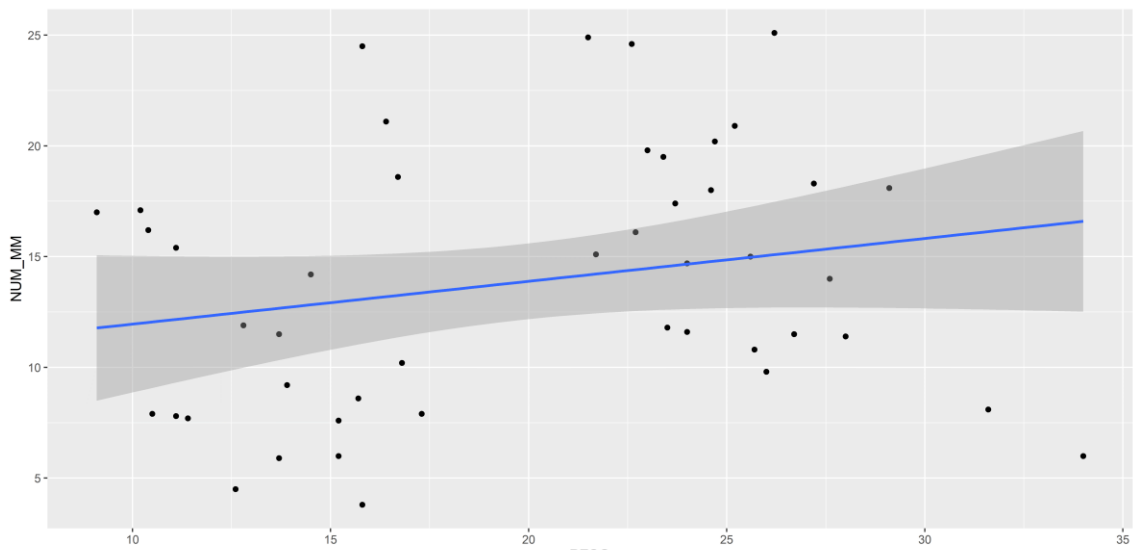


Figura 16: Test di correlazione Pearson numero di MM-peso (kg)

Il test di correlazione, effettuato tra il numero totale dei melanomacrofagi singoli (MMs) ed il peso (Kg), non ha evidenziato alcuna correlazione significativa (p-value: 0.165) con coefficiente di correlazione di 0.219, per cui, anche in questo caso, il trend è stazionario.

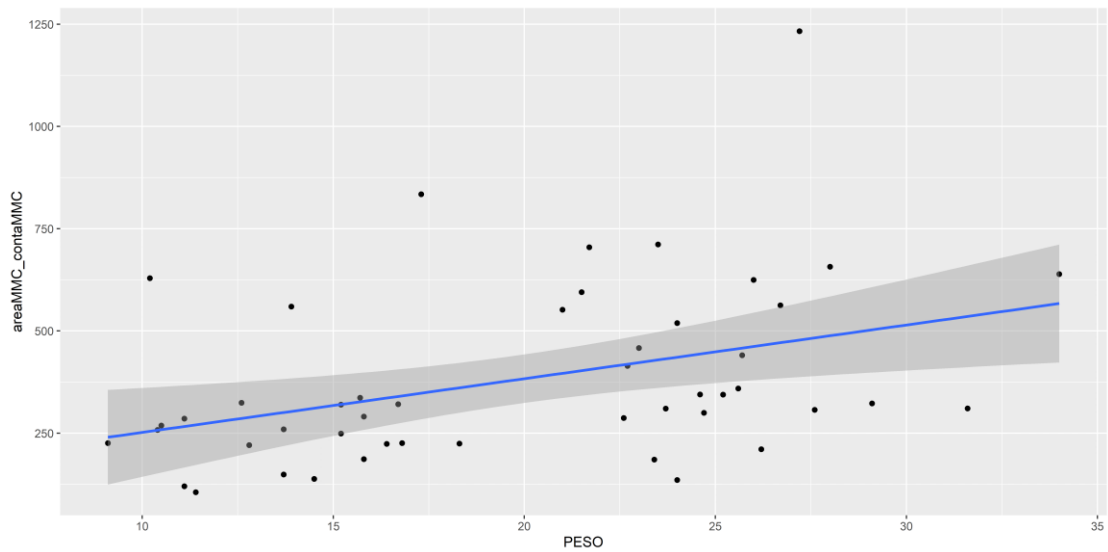


Figura 17: Test di correlazione Pearson area media di MMC-peso (kg)

Il test di correlazione, effettuato tra l'area media dei centri di melanomacrofagi ($\text{MMC}\mu\text{m}^2$) ed il peso (Kg), ha evidenziato una correlazione positiva (p-value: 0.0064) con un coefficiente di correlazione di 0.387, quindi l'area media aumenta in relazione al peso dell'organismo.

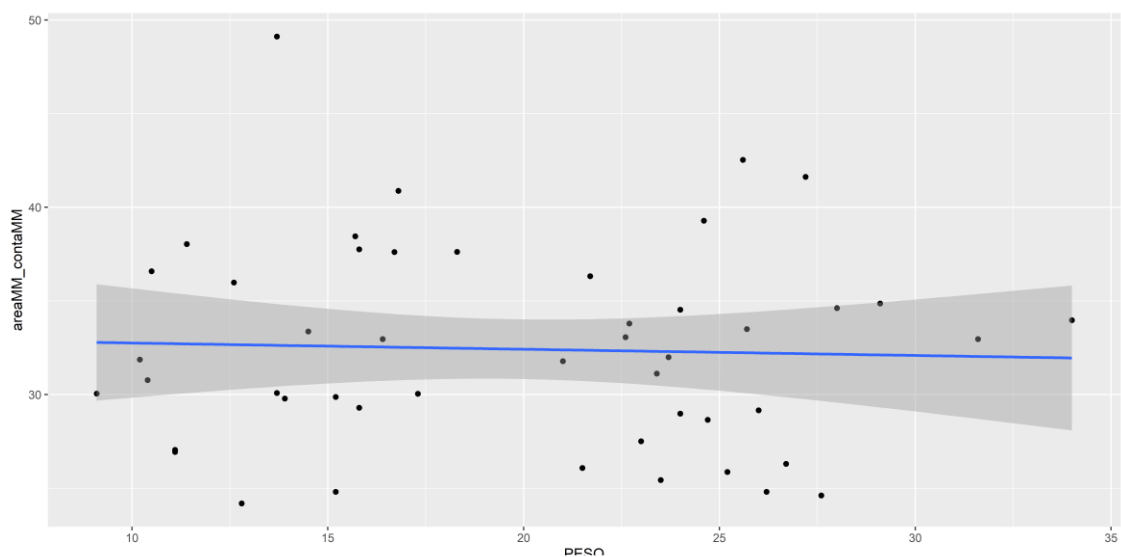


Figura 18: Test di correlazione Pearson area media di MM-peso (kg)

Il test di correlazione, effettuato tra l'area media dei singoli melanomacrofagi ($\text{MM}\mu\text{m}^2$) ed il peso (Kg), ha evidenziato l'assenza di correlazione (p-value: 0.789) con un coefficiente di correlazione di 0.039, per cui l'area media si mantiene costante nel tempo.

4.2.2 Test statistici ANOVA e *T-student* degli MMCs

Le analisi statistiche sono state effettuate tramite il programma GraphPad Prism 6 con il metodo ANOVA tra le femmine immature e tra le femmine mature nei mesi di agosto, settembre e novembre e con il metodo *t-student* tra di esse per ogni mese.

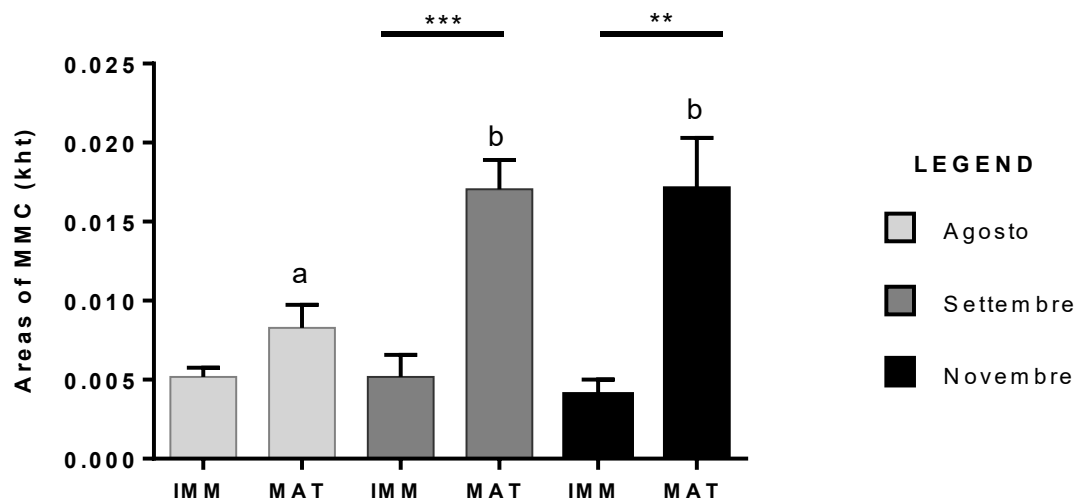


Figura 19: Analisi statistiche con metodo ANOVA: istogrammi a barre con SEM.

Area totale di MMC (kht) nei mesi di campionamento

Le analisi statistiche con il metodo ANOVA hanno evidenziato che non ci sono differenze significative nei *pairwise* tra le femmine immature appartenenti ai mesi di agosto, settembre e novembre.

Al contrario, sono presenti differenze significative tra le femmine mature di agosto e settembre, e tra quelle di agosto e novembre.

Il test del *t-student* è stato utilizzato per valutare se vi sono delle differenze tra le femmine mature e le femmine immature nei vari mesi, mostrando una significatività elevata durante il mese di settembre (p-value <0.001) ed una significatività alta durante il mese di novembre (p-value < 0.01).

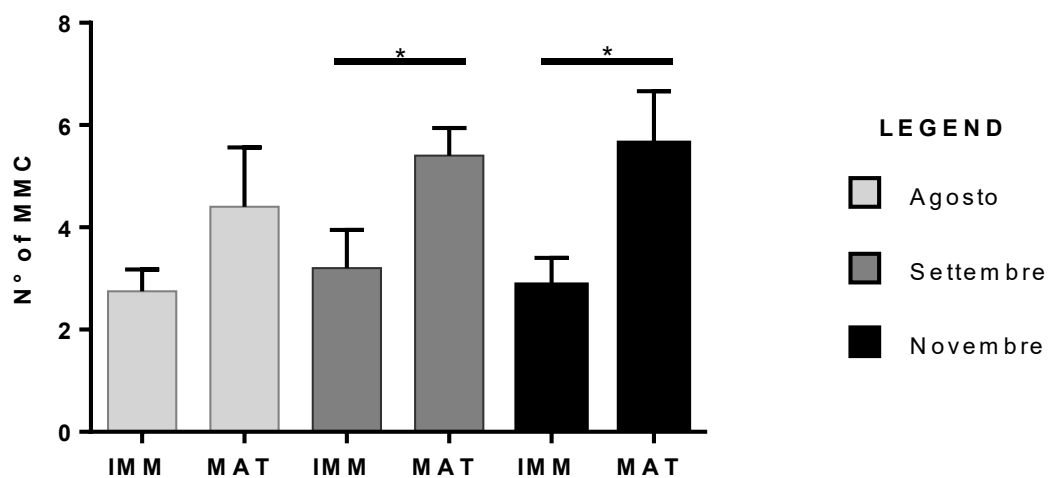


Figura 20: Analisi statistiche con metodo ANOVA: istogrammi a barre con SEM.

Numero totale di MMC nei mesi di campionamento.

Le analisi statistiche effettuate con il metodo ANOVA sul numero totale di centri di melanomacrofagi, hanno evidenziato che non ci sono differenze

significative né tra le femmine immature né tra le femmine mature indipendentemente dal mese di campionamento.

Il test del *t-student* ha mostrato una significatività ($p\text{-value} < 0.05$) negli esemplari di pesce spada appartenenti al mese di settembre e di novembre.

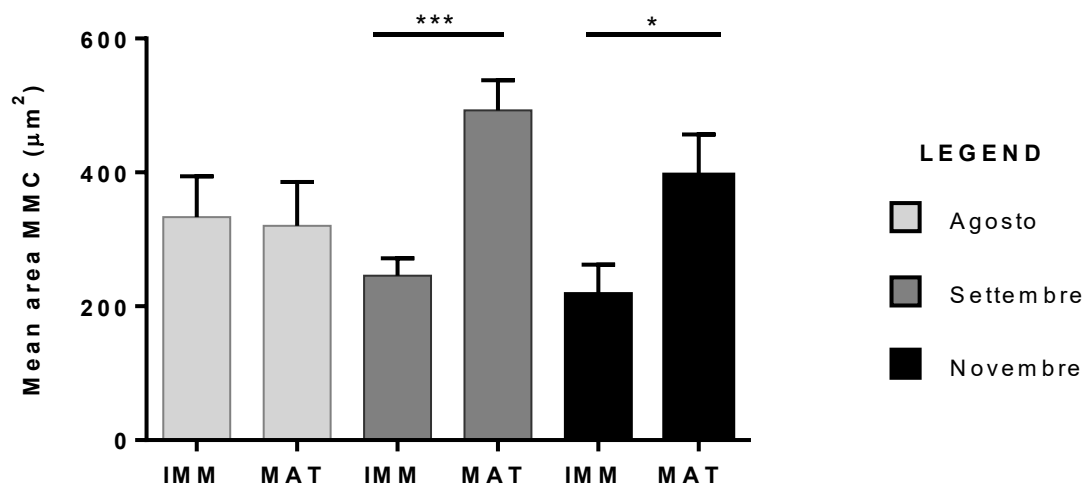


Figura 21: Analisi statistiche con metodo ANOVA: istogrammi a barre con SEM. Area media di MMC (μm^2) nei mesi di campionamento.

Le analisi statistiche con il metodo ANOVA hanno evidenziato che non ci sono differenze significative né tra le femmine immature né tra le femmine mature durante i mesi di campionamento.

Il test del *t-student*, ha evidenziato una significatività elevata ($p\text{-value} < 0.001$) negli esemplari di pesce spada di settembre, ed una significatività moderata ($p\text{-value} < 0.05$) nei campioni di novembre.

4.2.3 Test statistici ANOVA e *T-student* dei MMs

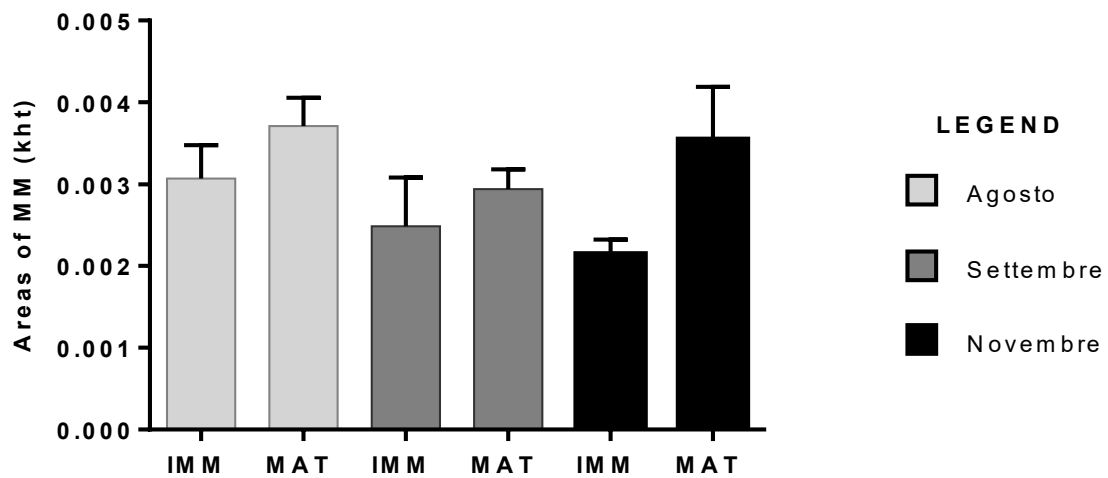


Figura 22: Analisi statistiche con metodo ANOVA: istogrammi a barre con SEM.

Area totale di MM (kht) nei mesi di campionamento.

Le analisi statistiche effettuate con l'ANOVA dimostrano l'assenza di significatività nei confronti effettuati tra le femmine immature e le femmine mature, indipendentemente dal mese di campionamento

Anche il t test ci conferma l'assenza di significatività nei tre mesi.

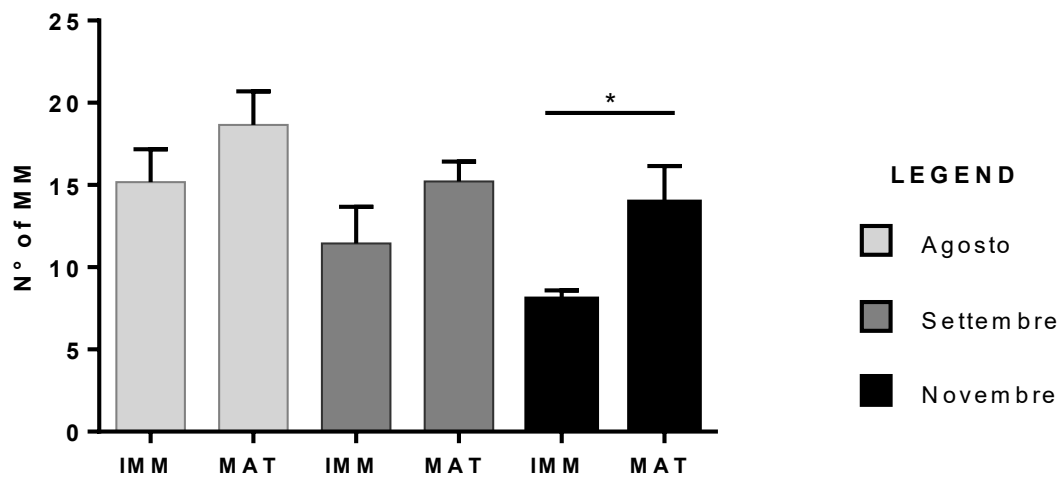


Figura 23: Analisi statistiche con metodo ANOVA: istogrammi a barre con SEM.

Numero totale di MM nei mesi di campionamento.

Le analisi statistiche effettuate con l'ANOVA dimostrano, anche in questo caso, l'assenza di significatività nei *pairwise* confrontati tra le femmine immature e mature nei tre mesi di campionamento.

Il test del *t-student* ha invece evidenziato una significatività ($p\text{-value} < 0.05$) nel confronto tra le femmine immature-mature campionate a novembre.

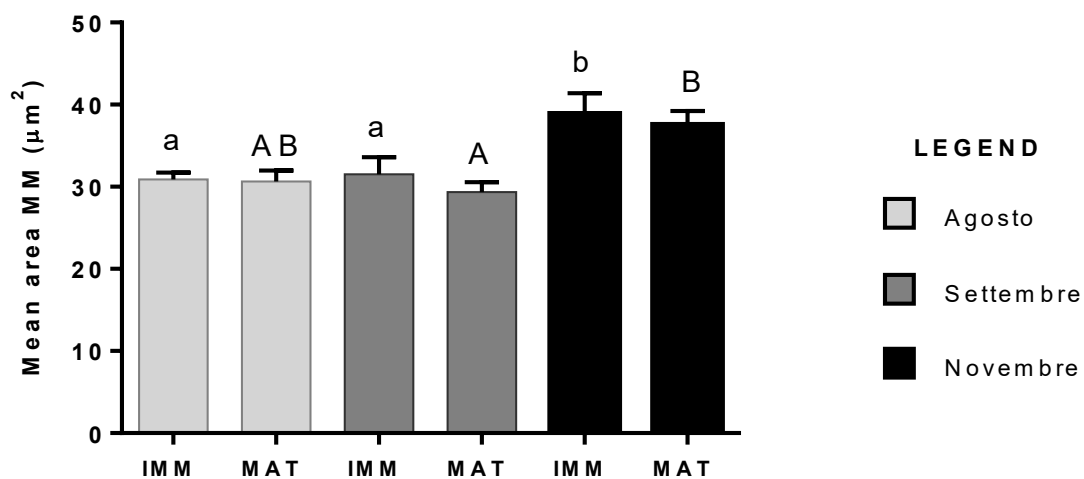


Figura 24: Analisi statistiche con metodo ANOVA: istogrammi a barre con SEM.

Area media di MM (μm^2) nei mesi di campionamento.

Le analisi statistiche effettuate con l'ANOVA evidenziano una significatività tra le femmine immature nei mesi di agosto e novembre; inoltre, è presente una significatività anche nel confronto tra le femmine immature di settembre e di novembre. Invece, il confronto tra le femmine immature di agosto e di settembre non ha mostrato alcuna significatività.

Il confronto tra le femmine mature di pesce spada, ha mostrato una significativa tra i mesi di settembre e di novembre.

Il test del *t-student* non ha evidenziato alcuna significatività nei tre mesi di campionamento.

4.3 Quantificazione lipidi

Le 48 sezioni istologiche di fegato di pesce spada, campionati nei mesi di agosto, settembre ottobre e novembre, sono state micro-fotografate con ingrandimento 40x e utilizzate per la quantificazione dell'area dei lipidi.

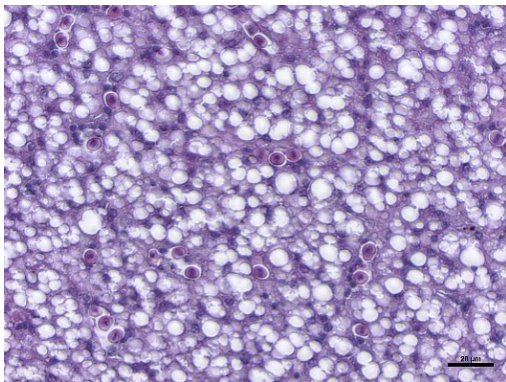


Figura 25: Sezioni di fegato di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 40x. Femmina immatura di agosto

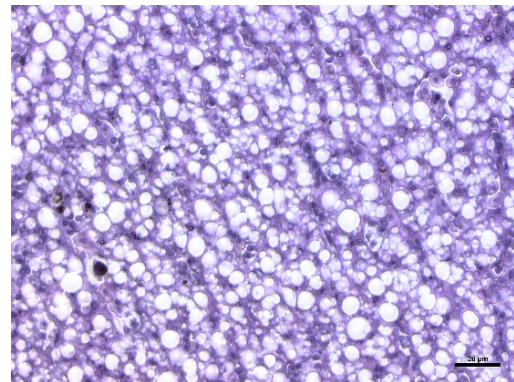


Figura 26: Sezioni di fegato di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 40x. Femmina matura di agosto

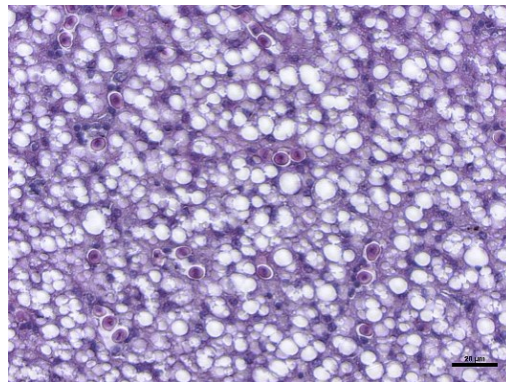


Figura 27: Sezioni di fegato di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 40x. Femmina immatura di settembre

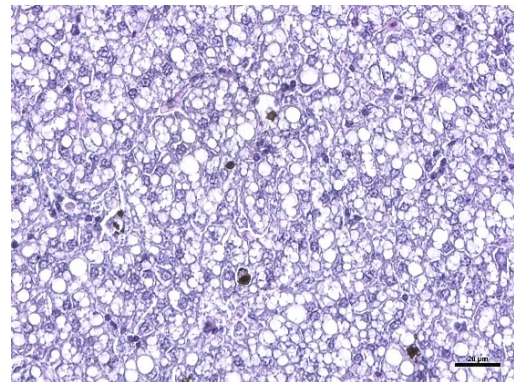


Figura 28: Sezioni di fegato di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 40x. Femmina matura di settembre

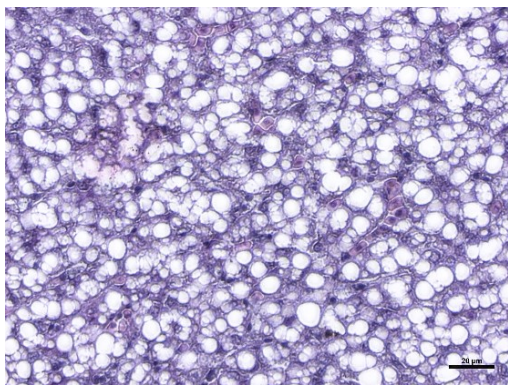


Figura 29: Sezioni di fegato di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 40x. Femmina immatura di ottobre

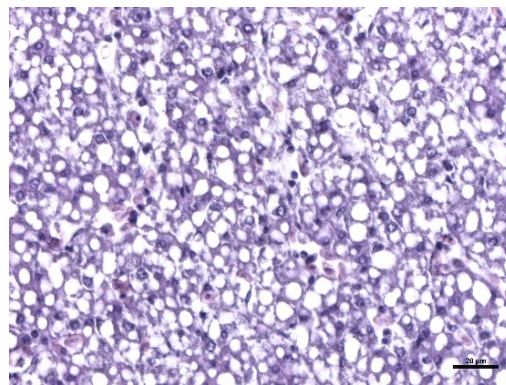


Figura 30: Sezioni di fegato di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 40x. Femmina matura di ottobre

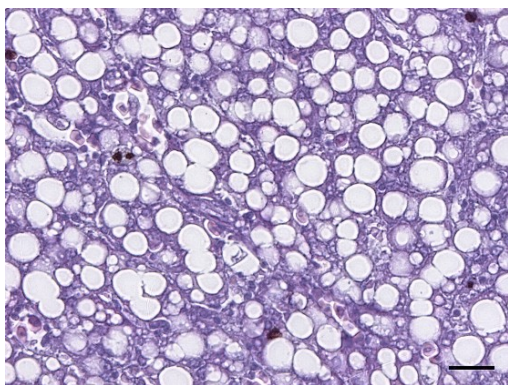


Figura 31: Sezioni di fegato di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 40x. Femmina immatura di novembre

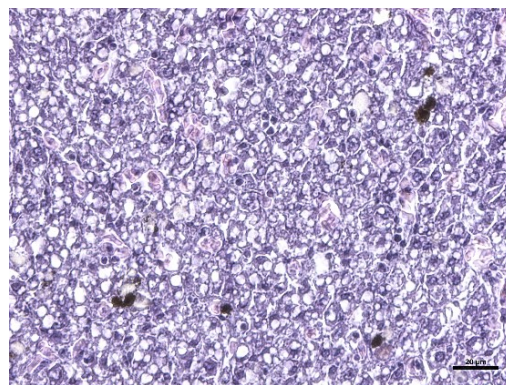


Figura 32: Sezioni di fegato di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 40x. Femmina matura di novembre

4.3.1 Test di correlazione lipidi

Anche per le analisi statistiche dei lipidi sono stati effettuati test di correlazione con il metodo Pearson per valutare la relazione tra l'area dei lipidi ed il peso dei campioni di pesce spada.

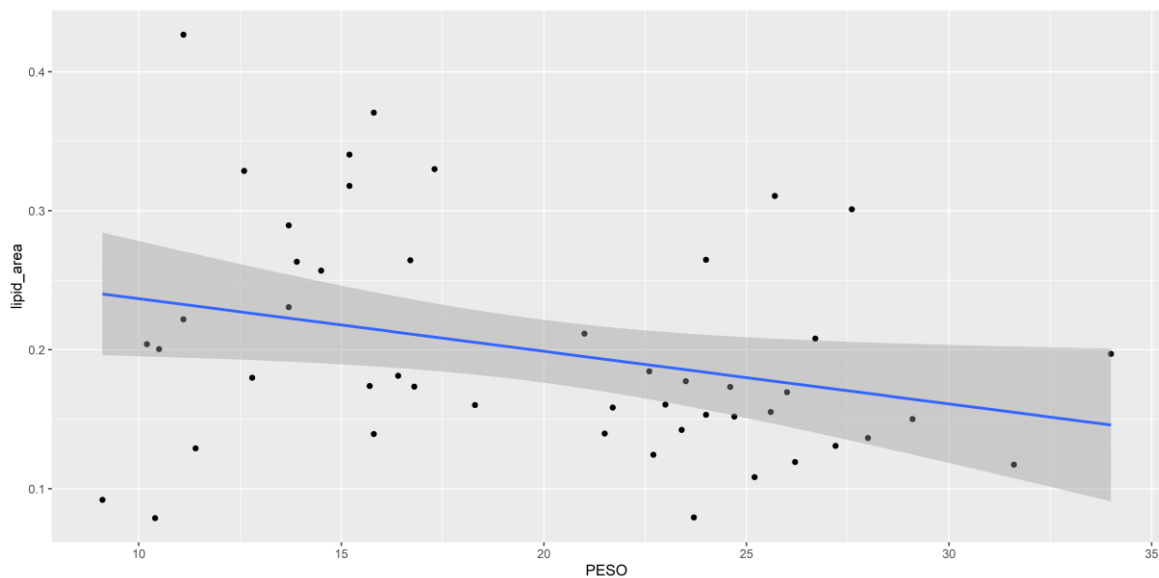


Figura 33: Test di correlazione Pearson area lipidi-peso (kg)

Il test di correlazione, tra l'area totale dei lipidi (μm^2) ed il peso (Kg), ha evidenziato che l'area dei lipidi diminuisce all'aumentare del peso dell'organismo. Si denota quindi una correlazione negativa (p-value: 0.0036) per un coefficiente di correlazione di 0.303

4.3.2 Test statistici ANOVA e *T-student* dei lipidi

Le analisi statistiche dei lipidi sono state effettuate tramite il programma GraphPad Prism 6 con il metodo ANOVA tra le femmine immature e tra le femmine mature nei mesi di agosto, settembre e novembre e con il metodo *t-student* tra di esse per ogni mese.

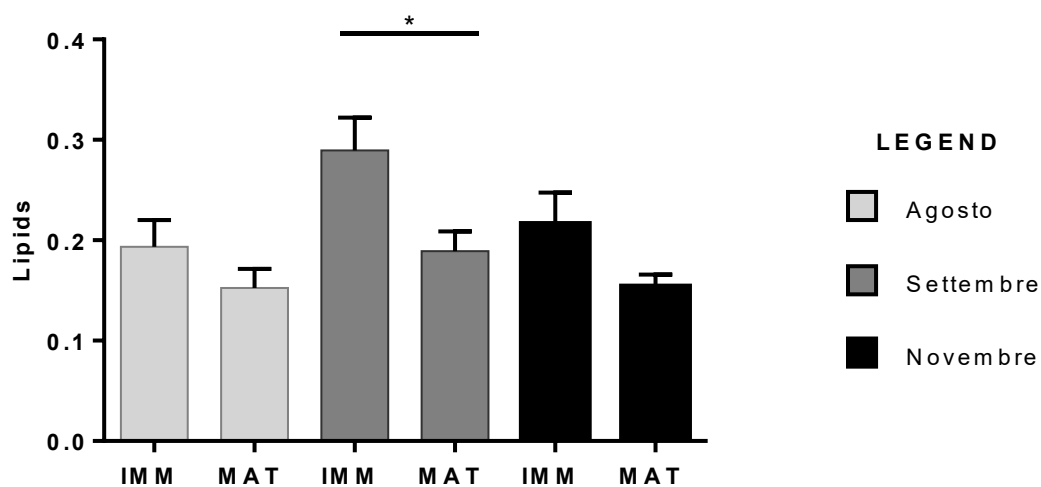


Figura 34: Analisi statistiche con metodo ANOVA: istogrammi a barre con SEM.

Area media dei lipidi (μm^2) nei mesi di campionamento.

Dal confronto effettuato tra le femmine immature non è stata evidenziata alcuna significatività durante i tre mesi di campionamento; inoltre, neanche il confronto tra le femmine mature ha evidenziato una significatività.

Il test del *t-student* indica una significatività ($p\text{-value} < 0.05$) tra le femmine immature-mature del mese di settembre.

4.4 Riproduzione

Al fine di identificare il periodo riproduttivo dei 48 esemplari di *Xiphias gladius* campionati nei mesi di agosto, settembre, ottobre e novembre, sono state scattate delle microfotografie con ingrandimento 10x.

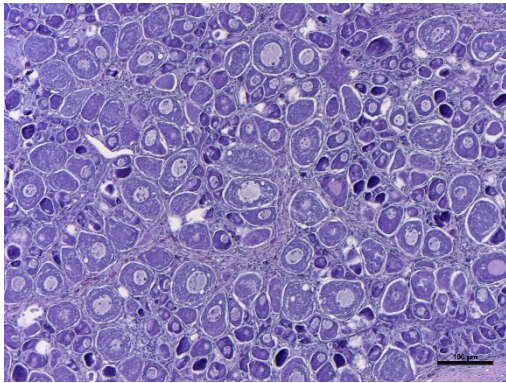


Figura 35: Sezioni di gonade di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 10x. Femmina immatura di agosto

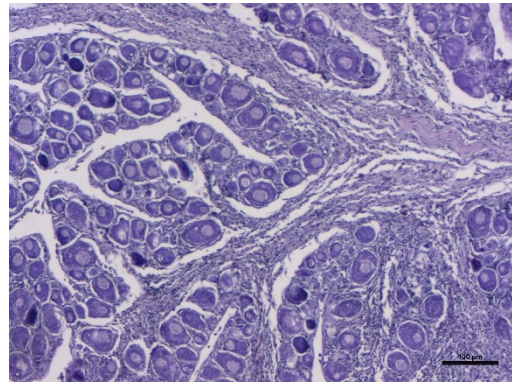


Figura 36: Sezioni di gonade di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 10x. Femmina matura di agosto

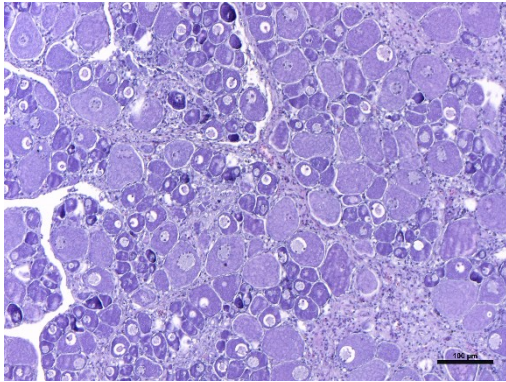


Figura 37: Sezioni di gonade di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 10x. Femmina immatura di settembre

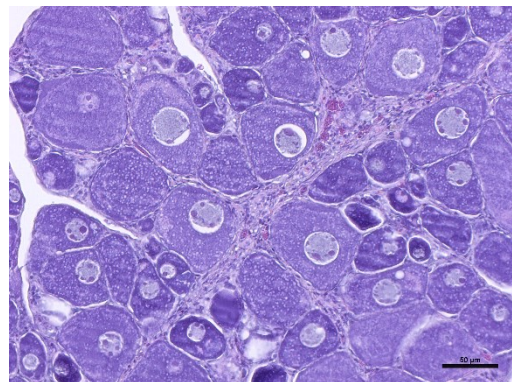


Figura 38: Sezioni di gonade di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 10x. Femmina matura di settembre

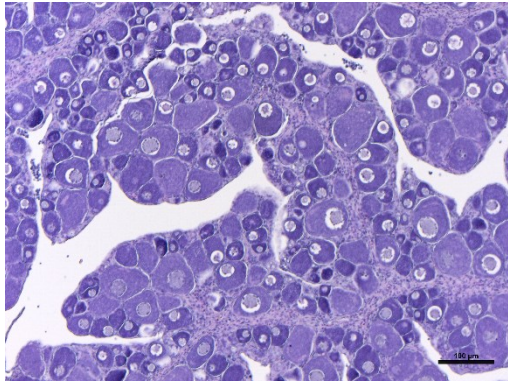


Figura 39: Sezioni di gonade di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 10x. Femmina immatura di ottobre

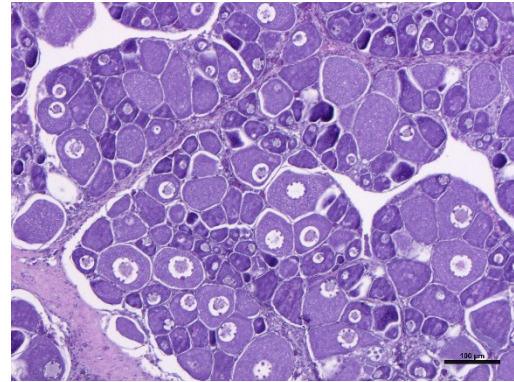


Figura 40: Sezioni di gonade di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 10x. Femmina matura di ottobre

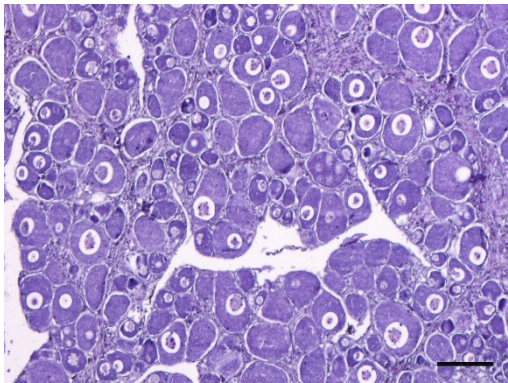


Figura 41: Sezioni di gonade di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 10x. Femmina immatura di novembre

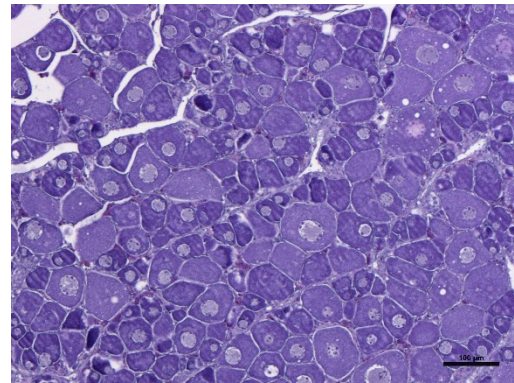


Figura 42: Sezioni di gonade di *Xiphias gladius* ad ingrandimento 10x. Femmina matura di novembre

4.4.1 Test statistici ANOVA dell'Indice Gonadico

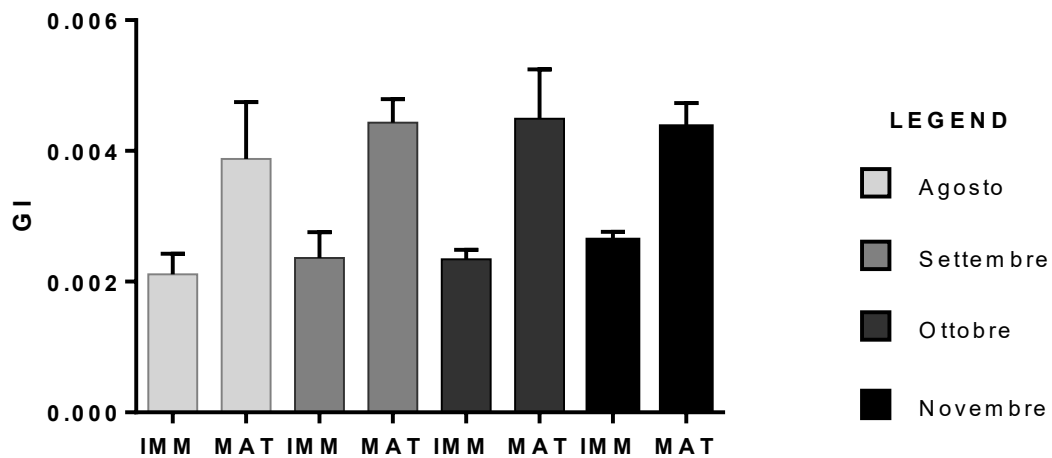


Figura 43: Analisi statistiche con metodo ANOVA: istogrammi a barre con SEM.

Valore medio dell'indice gonadico (GI) nei mesi di campionamento.

L'indice gonadico (GI) degli esemplari campionati ha evidenziato che le femmine immature indifferentemente dal mese di campionamento si trovano tutte allo stesso stadio riproduttivo.

Le femmine mature si trovano tutte allo stadio riproduttivo di *spent*, segnale che la riproduzione è già terminata da alcuni mesi.

Capitolo quinto

DISCUSSIONI

Xiphias gladius è una specie ittica di elevato interesse economico e commerciale. Negli ultimi anni, lo stock del Mediterraneo è stato sovrasfruttato e proprio per questo l'ICCAT ha istituito un piano di recupero multi-annuale per il quale sono previsti monitoraggi annuali di alcuni indici essenziali della pesca, tra i quali la biologia riproduttiva, indici di abbondanza e catture, considerando i recenti cambiamenti oceanografici verificatisi nel Mar Mediterraneo (ICCAT, 2020; Antonioli et al., 2020).

In questo studio sono stati analizzati gli sbarchi di una imbarcazione di esemplari di pesce spada pescati in Adriatico centrale, nel periodo compreso tra Agosto e Dicembre 2021. Su un campione mensile di tali animali sono state condotte analisi istologiche, al fine di verificare il variare dello stato di salute dell'animale in base alla taglia, alla capacità riproduttiva e il mese di cattura

Le attuali misure di gestione dell'ICCAT per la conservazione ed il restocking della popolazione del pesce spada hanno imposto la taglia minima di cattura a 100 cm o 10 kg ed il fermo pesca avviene nei mesi di gennaio-marzo.

Dal punto di vista legale, gli sbarchi monitorati in questo studio sono a norma, ma non tengono conto del fatto che le femmine di pesce spada raggiungono la maturità sessuale solamente al di sopra dei 20kg o 130 cm. Di conseguenza, la maggior parte delle femmine sbarcate corrisponde ad esemplari immaturi, che non si sono mai riprodotti.

La classe di taglia 5-10kg risulta essere la classe meno pescata, ma questo dato è alterato dal fatto che solamente il 5% degli esemplari sotto-taglia, calcolato sul totale sbarcato, può essere portato a terra e quindi non si conosce la quantità di esemplari pescati.

In tutti i mesi di campionamento sono stati rinvenuti organismi immaturi, con un picco nella classe 10-15kg tra agosto e settembre ($\simeq$ 60-70% dello sbarcato) ed un picco nella classe 15-20 kg a novembre ($\simeq$ 45% dello sbarcato).

È possibile evidenziare come gli esemplari femminili contribuiscano maggiormente al collasso dello stock poiché raggiungono la L_{50} a 120-130 cm a differenza dei maschi che la raggiungono intorno ai 90 cm (ICCAT 2019; De Metrio et al., 1989; De la Serna et al., 1996).

Anche le analisi svolte sullo stato di salute ci confermano quanto appena detto: i melanomacrofagi sono considerati dei biomarker di stress in numerose

specie di teleostei, coinvolti nella fagocitosi di materiale endogeno ed esogeno, inoltre la loro presenza e densità è indicatore di *aging* (Passantino et al., 2014; Nowak et al., 2021; Passantino et al., 2020; Basilone et al., 2018). I risultati del nostro studio hanno evidenziato come al variare del peso, e quindi dell'età, cambino anche l'area ed il numero dei MMCs e dei MMs.

Tra le femmine immature campionate non risultano esserci differenze nell'area e nel numero sia dei centri che dei singoli, questo è probabilmente dovuto al fatto che sono tutte sottoposte allo stesso stress e, non avendo dovuto affrontare la riproduzione, il sistema immunitario ha potuto rispondere efficacemente, poiché tutte le energie non erano convogliate verso la maturazione delle gonadi.

Per quanto riguarda le femmine mature pescate ad agosto, il fatto che presentino una gonade in *resting* ci fa supporre che abbiano effettuato lo *spawning* nei mesi di maggio-giugno, ed avendo terminato per prime la riproduzione, possono recuperare energie e quindi destinarle anche al sistema immunitario e per la detossificazione. Esse, infatti, hanno mostrato la minor differenza con le femmine immature presentando la minor abbondanza di melanomacrofagi, sia MMCs che MMs. Nei campioni pescati nel mese di settembre e novembre, invece, possiamo notare come l'omogeneità tra le femmine immature e mature, che è stata finora presente, man mano scompaia.

Le analisi svolte sull'indice gonadico hanno confermato che tutte le femmine mature analizzate si trovano allo stadio di *spent*, segnale che la riproduzione si è conclusa da almeno due-tre mesi; se così non fosse stato, avremmo dovuto trovare campioni in *regressing*.

Potremmo desumere che la tropicalizzazione del Mar Mediterraneo, che sta avvenendo già da alcuni decenni (FAO, 2018), ha fatto sì che le acque superficiali si riscaldino prima, ricreando già nel mese di maggio le temperature ideali al rilascio delle uova e degli spermatozoi.

Le femmine mature campionate a settembre e novembre avranno probabilmente rilasciato le uova rispettivamente a giugno-luglio e a luglio-agosto e in questi due mesi l'area ed il numero dei MMCs subiscono un graduale aumento, segnale che non hanno potuto recuperare tutte le energie perse per la riproduzione; quindi, non potevano rispondere efficacemente allo stress.

L'area ed il numero dei MMs invece, si mantengono costanti nei tre mesi di campionamento, ciò ci fa ipotizzare che, poiché tutti gli animali considerati hanno svolto lo stesso tragitto (area di *spawning*-area di *feeding*), siano stati sottoposti allo stesso tipo di stress acuto.

Sappiamo che le principali aree di *spawning* sono: le Isole Baleari, lo Stretto di Messina, il Canale di Sicilia ed il Mar Levantino.

Gli esemplari di *Xiphias gladius* che si sono riprodotti nelle Isole Baleari sono probabilmente i primi ad aver rilasciato le uova (Abid et al., 2018; Macias et al., 2005), seguiti dagli esemplari del Mar Levantino (Zahit Aliçlı et al., 2012), ed infine quelli della Sicilia (Romeo et al., 2009).

Questi dati ci permettono di effettuare delle ipotesi sulle dinamiche di migrazione del pesce spada. Infatti, sapendo che il Mar Adriatico non è un'area di *spawning*, ma bensì un'area di *refeeding*, i pesce spada risalgono il Mar Adriatico in cerca di cibo solo dopo aver completato i diversi eventi di *spawning*. Proprio per questo motivo le gonadi degli organismi campionati si trovano tutte nello stesso stadio di sviluppo, nonostante il campionamento sia avvenuto in mesi differenti.

Abbiamo supposto che i pesce spada provenienti dalle Isole Baleari essendo più distanti, non vengano in Adriatico alla ricerca di cibo, ma scelgano altre aree di foraggiamento più vicine, come ad esempio lo Stretto di Gibilterra. Questo avviene perché, essendo caratterizzati da un forte senso di *homing* (Acosta-Pachón et al., 2020), gli esemplari di pesce spada si riproducono solamente nelle aree in cui sono nati ed in questo caso, in un anno non riuscirebbero a compiere l'intero tragitto, andata e ritorno.

Al contrario, i pesce spada che si sono riprodotti in Sicilia e nel Mar Levantino, potrebbero raggiungere le acque adriatiche alla fine dell'estate.

Inoltre, la quantità di lipidi riscontrata all'interno del tessuto epatico di *Xiphias gladius*, si mantiene costante sia nelle femmine immature che mature, segnale che, non avendo mai raggiunto le aree di *feeding* situate nel Nord Adriatico, non avrà potuto nutrirsi e recuperare le energie perse tramite lo sforzo riproduttivo, per cui la percentuale di lipidi è rimasta invariata.

I risultati ottenuti ci hanno confermato che le direttive dell'ICCAT devono essere riviste in funzione dei dati raccolti: il palangaro è un attrezzo di pesca passivo non selettivo, che oltre a pescare differenti specie di pesci pelagici, causando un elevato tasso di *by-catch*, causa la pesca di numerosi esemplari immaturi che non hanno ancora raggiunto la taglia di prima maturità sessuale.

Si sottolinea inoltre che taglia minima di cattura fissata a 100 cm non sia una misura utile al mantenimento dello stock in quanto le femmine a quella lunghezza sono ancora immature. Ma considerando che il palangaro non è selettivo questa limitazione si rende inutile visto che anche aumentare la taglia minima di sbarco non eviterebbe di pescare animali immaturi. Anche il fermo-pesca andrebbe fissato durante il periodo riproduttivo, al fine di permettere agli esemplari maturi di pesce spada di riprodursi e quindi mantenere lo stock.

In conclusione, questo lavoro di tesi getta le basi per un monitoraggio *science-based* dello stato di salute del pesce spada, in quanto i parametri qui analizzati, sono facilmente analizzabili su base mensile e sono indicativi dello stato di salute e delle riserve energetiche di questo animale.

BIBLIOGRAFIA

Abascal F.J., Mejuto J., Quintans M., García-Cortès B., Ramos-Cartelle A. (2015). Tracking of the broadbill swordfish, *Xiphias gladius*, in the central and eastern North Atlantic. *Fisheries Research* 162: 20-28

Abid N., Laglaoui A., Arakrak A., Bakkali M. (2016). Preliminary results on sex ratio and maturity of the swordfish (*Xiphias gladius*) in the strait of Gibraltar; implications for the stocks structure. Collect. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 72(8): 2042-2050.

Abid, N., Laglaoui, A., Arakrak, A., & Bakkali, M. (2018). The reproductive biology of swordfish (*Xiphias gladius*) in the Strait of Gibraltar. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99(3), 649-659.

Acosta-Pachón T., Ortega-García S., Graham B. (2020). Assessing residency and movement dynamics of swordfish *Xiphias gladius* in the Eastern North Pacific Ocean using stable isotope analysis. *Mar Ecol Prog Ser* 645:171-185

Agius C. & Roberts J. (2003). Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26, 499–509.

Agius C. (1979). Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. *J. Zool., Lond.* 191, 11-31.

Aliçlı, T. Z., Oray, I. K., Karakulak, F. S., & Kahraman, A. E. (2012). Age, sex ratio, length-weight relationships and reproductive biology of Mediterranean swordfish, *Xiphias gladius* L., 1758, in the eastern Mediterranean. *African Journal of Biotechnology*, 11(15), 3673-3680.

Antonioli F., De Falco G., Lo Presti V., Moretti L., Scardino G., Anzidei M., Bonaldo D., Carniel S., Leoni G., Furlani S., Marsico A., Petitta M., Randazzo G., Scicchitano G., Mastronuzzi G. (2020). Relative Sea-Level Rise and Potential Submersion Risk for 2100 on 16 Coastal Plains of the Mediterranean Sea. *Water* 2020, 12, 2173

Arocha F., Moreno C., Beekircher L., Lee D.W., Marciano L. (2003).

Update on growth estimates for swordfish, *Xiphias gladius*, in the North-Western Atlantic. Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 55 (4): 1416-14

Arocha, F. (2002). Oocyte development and maturity classification of swordfish from the north-western Atlantic. *Journal of fish Biology*, 60(1), 13-27.

Babin P.J., Carnevali O., Lubzens E., Schneider W., (2007). Molecular aspects of oocyte vitellogenesis in fish. *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*, 39–76.

Basilone, G., Gargano, A., Corriero, A., Zupa, R., Santamaria, N., Mangano, S., Ferreri R., Pulizzi M., Mazzola S, Passantino L. (2018). Liver melanomacrophage centres and CYP1A expression as response biomarkers to environmental pollution in European anchovy (*Engraulis encrasicolus*) from the western Mediterranean Sea. *Marine pollution bulletin*, 131, 197-204

Beckett J.S. (1974). Biology of swordfish *Xiphias gladius* L., in the Northwest Atlantic Ocean. *International Billfish Symposium*, Kaiua-Kona, Hawaii.

Bello G. (1991). Role of Cephalopods in the Diet of the Swordfish, *Xiphias gladius*, from the Eastern Mediterranean Sea. *Bulletin of Marine Science*, Volume 49, Numbers 1-2, pp. 312-324(13)

Bernal D., Sepulveda C., Mustl M., Brill R. (2009). Fish locomotion an Eco-ethological perspective. CRC Press.

Block B.A. (1986). Structure of the brain and eye heater tissue in marlins, sailfish, and spearfishes. *Journal of Morphology*, 190: 169–189.

Carey, F. G. (1982). A brain heater in the swordfish. *Science*, 216(4552), 1327-1329.

Carnevali, O., Cionna, C., Tosti, L., Lubzens, E. & Maradonna, F. Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation (2006). *Gen. Comp. Endocrinol.* 146, 195–203

Carnevali, O., Candelma, M., Sagrati, A., Pignalosa, P., Giorgini, E., & Gioacchini, G. (2019). Macromolecular Characterization of Swordfish Oocytes by FTIR Imaging Spectroscopy. *Scientific Reports*, 9(1), 1-9.

Castillo K., Ibáñez C.M, González C y Chong Y. (2007). Dieta del pez espada *Xiphias gladius* Linnaeus, 1758 en distintas zonas de pesca frente a Chile central durante el otoño de 2004. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 42(2): 149 – 156.

Cionna C., Maradonna F., Olivotto I., Pizzonia G., Carnevali O. (2006). Effects of nonylphenol on juveniles and adults in the grey mullet, *Liza aurata*. *Reproductive Toxicology* 22: 449–454.

Corriero A., Acone, F., Desantis, S., Zubani, D., Deflorio M., Ventriglia G., Bridges C.R., Labate M., Palmieri G., McAllister B. G., Kime D. E., De Metrio G. (2004). Histological and immunohistochemical investigation on ovarian development and plasma estradiol levels in the swordfish (*Xiphias gladius* L.). *European Journal of Histochemistry*, vol. 48 issue 4:413-422

Dang M., Nowell C., Nguyen T., Bach L., Sonne C., Norregaaarde R., Stride M., Nowak B. (2019). Characterisation and 3D structure of melanomacrophage centers in shorthorn sculpins (*Myoxocephalus scorpius*). *Tissue and Cell* 57: 34–41

Danovaro R. (2019). Biologia marina. Biodiversità e funzionamento degli ecosistemi marini. UTET Università; 2° edizione

De La Serna J.M., Ortiz de Urbina JM, Macias, D. Observations on sexratio, maturity and fecundity by length-class for swordfish (*Xiphias gladius*) captured with surface longline in the western Mediterranean. ICCAT Coll Vol Sc Pap 1996; 45:115-39.

De Metrio G., Megalofonou P., Tselas S., Tsimenides N. (1989). Fishery and Biology of the Swordfish, *Xiphias gladius*, L., 1758, in Greek waters. FAO Fisheries Report N°.412, pp.135-145

De Metrio, G., H. Ditrich, J. Kramer, and G. Palmieri (1994). Investigations on the anatomy of the heating organ of the swordfish

(*Xiphias gladius* L.: Xiphidae Osteichthyes). *Sisvet Proc. Atti Sisvet* 48:541–545

Desantis, S., Corriero A., Cirillo F., Deflorio M., Brill R., Griffiths M., Lopata A.L., de la Serna J.M., Bridges C.R., Kime D. E., De Metrio G. (2005). Immunohistochemical localization of CYP1A, vitellogenin and Zona radiata proteins in the liver of swordfish (*Xiphias gladius* L.) taken from the Mediterranean Sea, South Atlantic, South Western Indian and Central North Pacific Oceans. *Aquatic Toxicology* 71: 1–12

Fonseca Martins A.M.C.R.P, Cassiano L.L (2020). Bleaching of Melanomacrophages from Tissue of Ectothermic Vertebrates for later use of immunohistochemical and in Situ hybridization technique. *International Journal of Environmental & Agriculture Research (IJOEAR)*. Vol 6, issue 9.

FAO fisheries & aquaculture, 2020, *Xiphias gladius*.

<http://www.fao.org/fishery/species/2503/en>

FAO, Impacts of climate change on fisheries and aquaculture: Synthesis of current knowledge, adaptation and mitigation options (2018).

Fishelson L. (2005). Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head-kidney, and liver in cardinal fish (Apogonidae, Teleostei) as bioindicators of stress. *Journal of Morphology* Volume 267, Issue 1 p. 57-69.

Galli G., Shiels H., Brill R. (2009). Heart temperature sensitivity in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*), bigeye tuna (*T. obesus*), mahimahi (*Coryphaena hippurus*) and swordfish (*Xiphias gladius*). *Physiol. Biochem. Zool.*

Gioacchini, G., Marisaldi, L., Basili, D., Candelma, M., Pignatola, P., Cigliano, R. A., ... & Carnevali, O. (2019). A de novo transcriptome assembly approach elucidates the dynamics of ovarian maturation in the swordfish (*Xiphias gladius*). *Scientific reports*, 9(1), 1-12.

Gopal R.M., Smith B., Robertson J.L., Smith S.A., Hollanday S.D. (1999). Tilapia (*Oreochromis niloticus*) dosed with azathioprine display immune

effects similar to those seen in mammals, including apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. Volume 68, Issues 2–4, Pages 209-227

González-Kother P., Oliva M. E., Tanguy A., Moraga D., (2020). A review of the potential genes implicated in follicular atresia in teleost fish. *Marine Genomics* 50.

Gosline W.A. (1968). The suborders of perciform fishes. Proc. U.S. National Museum 124 (3647):1-78

Hazin F.H.V., Hazin, H.G., Boeckmann, C.E., and Travassos, P. (2002). Preliminary study on the reproductive biology of swordfish, *Xiphias gladius* (Linnaeus 1758), in the southwestern equatorial Atlantic ocean. Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 54(5): 1560-1569.

Hiramatsu N., Todo T., Sullivan C.V, Schilling J., Reading B.J., Matsubara T., Ryu Y., Mizuta H., Luo W., Nishimiya O., Wuf M., Mushirobira Y., Yilmaz O., Hara A. (2015). Ovarian yolk formation in fishes: Molecular mechanisms underlying formation of lipid droplets and

vitellogenin-derived yolk proteins. General and Comparative
Endocrinology 221: 9–15

ICCAT, International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas
(2010). Report of the 2010 ICCAT Bluefin Data preparatory meeting.

ICCAT, International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas
(2020). Scrs advice to the commission.

ICCAT, International Commission for the Conservation of Atlantic Tunas
(2017). Report for biennial period, 2016-17 part II (2017) - Vol. 2

Kalita B., Pokhrel H., Hussain I. A. (2019). Development of
melanomacrophage centres (MMCs) in Indian major carps. Journal of
Entomology and Zoology Studies; 7(2): 745-747

Kumar R.S., Trant J.M (2001). Piscine glycoprotein hormone
(gonadotropin and thyrotropin) receptors: a review of recent
developments. Comparative Biochemistry and Physiology Part B:

Biochemistry and Molecular Biology Volume 129, Issues 2–3, Pages 347-355

Kume S. & Joseph J. (1969). Size composition and sexual maturity of billfish caught by the Japanese longline fishery in the Pacific Ocean east of 130° W. Bull. Far Seas Fish. Res. Lab. N°2

Lubzens E., Young G., Bobe J., Cerdà J. (2010). Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology*: 367–389

Macias D., Hattour A., de la Serna J.M., Gòmez-Vives M.J., Godoy D. (2005). Reproductive characteristics of swordfish (*Xiphias gladius*) Caught in the southwestern Mediterranean during 2003. Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 58(2): 454-469

Marisaldi, L., Basili, D., Candelma, M., Sesani, V., Pignalosa, P., Gioacchini, G., & Carnevali, O. (2019). Maturity assignment based on histology-validated macroscopic criteria: Tackling the stock decline of the

Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius*). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 30(2), 303-314.

Megalofonou P., Dean J.M., De Metrio G., Wilson C., Berkeley S. (1995). Age and growth of juvenile swordfish, *Xiphias gladius* Linnaeus, from the Mediterranean Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 188: 79-88.

Murua H., Farley J., Zudaire I., Luque P.L., Artetxe-Arrate I., Tomanov E., Marsac F., Fraile I., Merino G. (2021). A review of the Reproductive biology of the Swordfish (*Xiphias gladius*) in the Indian Ocean. IOTC-WPB19-20

Nakamura I. (1985). FAO species catalogue. Vol.5. Billfishes of the world. An annotated and illustrated catalogue of marlins, sailfishes, spearfishes and swordfishes known to date. Fishery and Aquaculture Economics and Policy Division.

Nowak B., Dang M., Webber C., Neumann L., Bridle A., Bermudez R., Evans D. (2021). Changes in the Splenic Melanomacrophage Centre

Surface Area in Southern Bluefin Tuna (*Thunnus maccoyii*) Are Associated with Blood Fluke Infections. *Pathogens* 10, 79.

Okuzawa, K. (2002). Puberty in teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 31-41.

Orrell T.M., Collette B.B., Johnson G.D. (2006). Molecular Data Support Separate Scombroid and Xiphioid Clades. *Bulletin of Marine Science*, 79(3): 505–519.

Palko, B. J., Beardsley, G. L., & Richards, W. J. (1981). Synopsis of the biology of the swordfish, *Xiphias gladius* Linnaeus. National Oceanographic and Atmospheric Administration, Technical Report, National Marine Fisheries Service Circular 441, 21 p.

Passantino L., Tafaro A., Altamura M., Arena R., Passantino G.F., Jerillo E. (2002) Fish immunology. II. Morphological and cytochemical characterization and phagocytic activities of head kidney macrophages from rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 24(4):679-91

Passantino L., Santamaria N., Zupa R., Pousis C., Garofalo R., Cianciotta A., Jirillo E., Acone F., Corriero A. (2014). Liver melanomacrophage centres as indicators of Atlantic bluefin tuna, *Thunnus thynnus* L. well-being. *Journal of Fish Diseases* 37, 241–250

Passantino L., Zupa R., Pousis C., Mylonas C.C., Hala E., Jirillo E., Corriero A. (2019). Increased melanomacrophage centres in the liver of reproductively dysfunctional female greater amberjack *Seriola dumerili* (Risso, 1810). *Journal of Fish Diseases*

Poisson, F., & Fauvel, C. (2008). Reproductive dynamics of swordfish (*Xiphias gladius*) in the southwestern Indian Ocean (Reunion Island). Part 1: oocyte development, sexual maturity and spawning. *Aquatic Living Resources*, 22(1), 45-58.

Pronina S.V., Batueva M.D. (2014). Characteristics of melanomacrophage centers in the liver and spleen of the roach *Rutilus rutilus* (Cypriniformes: Cyprinidae) in Lake Kotokel during the Haff disease outbreak. *Journal of Ichthyology* volume 54, pages104–110.

Qualhato G., Teixeira de Sabôia-Morais S.M., silva S. D., Rocha T.L. (2018). Melanomacrophage response and hepatic histopathologic biomarkers in the guppy *Poecilia reticulata* exposed to iron oxide (maghemite) nanoparticles. *Aquatic Toxicology* 198: 63–72

Regolamento (UE) del Parlamento Europeo e del Consiglio del 15 novembre 2017.

Rey J.C., (1988). Comentarios sobre las areas de reproduccion del pez espada en el Atlantico y Mediterraneo. ICCAT Coll. Vol. Sci. Pap. 27, 180–193

Righi, T., Splendiani, A., Fioravanti, T., Casoni, E., Gioacchini, G., Carnevali, O., & Caputo Barucchi, V. (2020). Loss of Mitochondrial Genetic Diversity in Overexploited Mediterranean Swordfish (*Xiphias gladius*, 1759) Population. *Diversity*, 12(5), 170.

Romeo, T., Consoli, P., Greco, S., Canese, S., & Andaloro, F. (2009). Swordfish (*Xiphias gladius*, Teleostea: Xiphiidae) surface behaviour

during reproductive period in the central Mediterranean Sea (southern Tyrrhenian Sea). *Marine Biodiversity Records*, 2(1).

Rooker J.R., Simms J.R., Wells R.J.D., Holt S.A., Holt G.J., Graves J.E., Furey N.B. (2012). Distribution and Habitat Associations of Billfish and Swordfish Larvae across Mesoscale Features in the Gulf of Mexico.

Saha, N. R., Usami, T., Saito, T., Suetake, H., Suzuki, Y. (2002). Relationships between immune and reproductive endocrine systems in fish. *Fisheries science*, 68(sup2), 1135-1138.

Salman A. (2004). The role of cephalopods in the diet of swordfish (*Xiphias gladius* Linnaeus, 1758) in the Aegean Sea (eastern Mediterranean). *Bulletin of Marine Science*, Volume 74, Number 1, pp. 21-29(9).

Sayed, A. E. D. H., Abd-Elkareem, M., & Abou Khalil, N. S. (2019). Immunotoxic effects of 4-nonylphenol on *Clarias gariepinus*: Cytopathological changes in hepatic melanomacrophages. *Aquatic Toxicology*, 207, 83-90.

Sousa S., Rocha M.J., Rocha E. (2018). Characterization and spatial relationships of the hepatic vascular–biliary tracts, and their associated pancreocytes and macrophages, in the model fish guppy (*Poecilia reticulata*): A study of serial sections by light microscopy. *Tissue and Cell* Volume 50, Pages 104-113.

Steinel, N. C., & Bolnick, D. I. (2017). Melanomacrophage centers as a histological indicator of immune function in fish and other poikilotherms. *Frontiers in immunology*, 8, 827

Stillwell C.E. & Kohler N.E. (1985). Food and feeding ecology of the swordfish *Xiphias gladius* in the western North Atlantic Ocean with estimates of daily ration. *Marine ecology* – Vol. 22: 239-247.

Stoeckl A., Martin J., Aalbers S., Sepulveda C., and Bernal D. (2020). Free-swimming swordfish, *Xiphias gladius*, alter the rate of whole body heat transfer: morphological and physiological specializations for thermoregulation. *ICES Journal of Marine Science* (2018), 75(2), 858–870.

Sun C., Wang S., Yeh S. (2002). Age and growth of the swordfish (*Xiphias gladius* L.) in the waters around Taiwan determined from anal-fin rays. *Aquadocs*.

Taranger G.L., Carrillo M., Schulz R.W., Fontaine P., Zanuy S., Felip A., Weltzien F., Dufour S., Karlsen O., Norberg B., Andersson E., Hansen T. (2010). Control of puberty in farmed fish. *General and Comparative Endocrinology* 165: 483–515

Tserpes G. & Tsimenides N. (1995). Determination of age and growth of swordfish *Xiphias gladius* L., 1758, in the eastern Mediterranean using anal-fin spines. *Fishery Bulletin- National Oceanic and Atmospheric Administration*

Videler, J. J., Haydar, D., Snoek, R., Hoving, H. J. T., & Szabo, B. G. (2016). Lubricating the swordfish head. *Journal of Experimental Biology*, 219(13), 1953-1956.

Wilson C.A. & Dean J.M. (1983). The potential use of sagittae for estimating age of Atlantic swordfish, *Xiphias gladius*. U.S. Dept. Commer., NOAA Tech. Rep NMFS., Vol. 8, pp. 151-156.

Wootton, R. J., & Smith, C. (2014). Reproductive biology of teleost fishes. John Wiley & Sons.

Young J., Drake A., Brickhill M., Farley J., Carter T. (2003). Reproductive dynamics of broadbill swordfish, *Xiphias gladius*, in the domestic longline fishery off eastern Australia. *Marine and Freshwater Research*, 54: 315-332.