Progetto pilota per l'allevamento di una specie ittica innovativa: la cernia *(Epinephelus marginatus)*

Relazione tecnica finale

DOCUP-PESCA REGIONE ABRUZZO

Bando 2005/2006 · Asse 4 · Misura 4.6 · "Azioni innovanti"

art. 17 Reg. CE 2792/99 · Progetto 01/IM/04/AB

Progetto pilota per l'allevamento di una specie ittica innovativa: la cernia *(Epinephelus marginatus)*

Relazione tecnica finale

REGIONE ABRUZZO
DOCUP-PESCA REGIONE ABRUZZO
Bando 2005/2006 · Misura 4.6 · "Azioni innovanti"
Progetto 01/IM/04/AB

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELL'ABRUZZO E DEL MOLISE "GIUSEPPE CAPORALE"

Responsabile del progetto

Alessandra Paolini

Autori

Alessandra Paolini
Camilla Egidi
Marina Torresi
Mario Vallerani
Alessandro Pavone
Lorenzo Gennari (consulente)

Collaborazioni

Pieluigi Carbonara (Coispa)
Rita Lorenzini
Daniele Giansante
Giampiero Scortichini
Loredana Annunziata
Luigi Sgattone
Romolo Salini
Alessandro Perazzitti

Progetto grafico

Sandro Santarelli

Finito di stampare: dicembre 2006

SCHEDA TECNICA DEL PROGETTO

Importo	€ 65.377,47
Data approvazione	DH 18/56 – progetto cod. 01/IM/04/AB
Data inizio attività	15.04.2006
Data fine attività	30.11.2006
Data presentazione variante	05.03.2006
Data approvazione variante	23.05.2006
Tipo di finanziamento	Fondi Docup-Sfop (Documento unico di Programmazione – Strumento Finanziario di Orientamento alla Pesca). Il finanziamento è composto per il 64,88% da risorse comunitarie e per il 35,12% da risorse nazionali della Regione Abruzzo

INDICE

INTRODUZIONE 3

1. MATERIALI E METODI

1.1 Condizioni di stabulazione dei riproduttori 7
1.2 Monitoraggio preliminare della maturazione ovarica e programmazione dei trattamenti ormonali 8
1.3 Stimolazione ormonale 12
1.4 Controllo dei riproduttori sottoposti a stimolazione ormonale 14
1.5 Esame istologico delle biopsie ovariche 15
1.6 Fecondazione artificiale 20
1.7 Monitoraggio dello sviluppo embrionale 23
1.8 Strutture e protocolli per l'allevamento larvale 24
1.9 Monitoraggio del ciclo di allevamento larvale 26
1.10 Monitoraggio della popolazione autoctona di cernia 27
1.11 Studio genetico dei riproduttori: analisi dei microsatelliti 27
1.12 Studio dei parametri ematici 28

2. RISULTATI E CONSIDERAZIONI

2.1 La maturazione degli oociti: risultati dei controlli a fresco e degli esami istologici 37
2.2 La percentuale di fecondazione e lo sviluppo embrionale 57
2.3 Allevamento larvale 61
2.4 La popolazione autoctona di cernia bruna 70
2.5 Risultato dell'analisi dei microsatelliti 72
2.6 Risultato dei parametri ematici 73

3. CONCLUSIONI 85

4. BIBLIOGRAFIA 88

ALLEGATI

Allegato 01 Monitoraggio preliminare dello stadio di maturazione ovarica del 10 luglio 2006 91
Allegato 02 Monitoraggio preliminare dello stadio di maturazione ovarica del 18 luglio 2006 92
Allegato 03 Procedura operativa standard esame istologico di biopsie ovariche di specie ittiche 93
Allegato 04 Procedura operativa standard per la conta su emocitometro di cellule ematiche di specie ittiche 96
Allegato 05 Procedura operativa standard per l'analisi qualitativa delle cellule ematiche e il calcolo della formula leucocitaria in specie ittiche 99
Allegato 06 Preparazione della soluzione Dacies fluid 102
Allegato 07 Condizioni in vasca ciclo V2 104
Allegato 08 Condizioni in vasca ciclo V1 104

INTRODUZIONE

LA SPECIE

La Cernia *Epinephelus marginatus* è diffusa nel Mediterraneo e lungo le coste dell'Atlantico sud-orientale e del Brasile (Heemstra *et al.*, 1993) (Figura1)

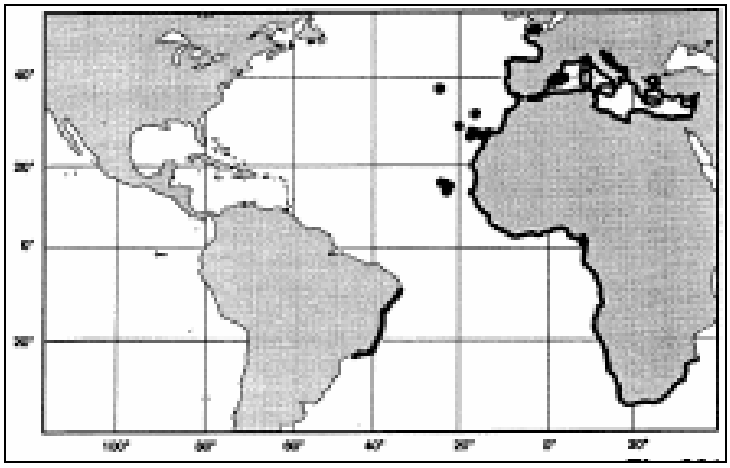


Figura 1. Distribuzione geografica di *E. marginatus* – fonte FAO (Heemstra *et al.*, 1993)

La specie ha una livrea grigia dorsalmente, con macchie chiare e giallo biancastra ventralmente. Le pinne sono grigio scuro orlate di bianco (Figura 2).

Figura 2. *Epinephelus marginatus*

E' una specie longeva, può vivere fino a 50 anni, arrivando a pesare 40 kg per una lunghezza di 120 cm. Ha uno sviluppo sessuale ermafrodita protoginico; gli esemplari, infatti, nascono di sesso femminile, raggiungono la maturità sessuale al 5-9° anno (40 cm di lunghezza circa) ed in seguito una parte di essi diventa maschio a circa 15 anni (80 cm di lunghezza circa). Il cambiamento del sesso è variabile se analizzato su scala generale, ma all'interno di piccole popolazioni tale variabilità si riduce, sembra, in funzione della struttura sessuale e dall'abbondanza della popolazione; si ipotizza un controllo sociale sul cambiamento di sesso, che viene per esempio inibito se un maschio dominante rimane a lungo in una determinata popolazione.

La Cernia bruna presenta una struttura sociale delle sue popolazioni che non ha eguali in altre specie marine mediterranee. Quest'organizzazione sociale è molto evidente e complessa in particolare nei periodi del corteggiamento e dell'accoppiamento. Il fatto che questa specie viva in gruppi strutturati rappresenta un problema per la sua sopravvivenza, poiché l'alterazione della struttura sociale incide direttamente sulla sua potenzialità riproduttiva e quindi sull'abbondanza di popolazione.

In genere le cernie hanno l'abitudine a vivere sempre negli stessi territori e spesso alcune grandi tane possono contenere più individui, anche di sesso e dimensioni differenti. Durante il periodo

dell'accoppiamento si ha un richiamo serale, soprattutto delle femmine, che vanno a concentrarsi nei territori dove i maschi attuano il corteggiamento.

Le uova fecondate, traslucide e piccolissime, con un diametro di 0.7 mm, non vengono protette dall'adulto e divengono oggetto di un'intensa attività predatoria da parte di altri pesci, in particolare le occhiate. Queste addirittura individuano il corteggiamento e arrivano sul luogo prima del rilascio dei gameti (Garcia-Rubies 2003).

La cernia ha carni molto apprezzate che la rendono una preda ambita, è vittima infatti di un'intensa pressione di pesca. Questo, aggravato dalla tardiva maturità sessuale e dalla strutturazione sociale sopra descritte, sta causando una grave decremento dell'abbondanza della popolazione in Mediterraneo, tanto da essere considerata una specie minacciata (ECNC, 1998).

Epinephelus marginatus è considerata una specie di grande interesse commerciale e ricreativo, quindi un importante candidato per la maricoltura e per interventi di ripolamento (FAO, 1997)

Phylum	CHORDATA
Classe	ACTINOPTERYGII
Ordine	PERCIFORMI
Famiglia	SERRANIDI
Specie	***Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834);** **sinonimo** ***Epinephelus guaza***
Nomi comuni	Cernia, cernia mediterranea, cernia bruna (italiano) dusky grouper (inglese), mérou noir (francese) mero moreno (spagnolo)

IL PROGETTO

Nel periodo 2003-2006, con i fondi Docup Pesca, l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale" ha avuto l'opportunità di sviluppare le proprie competenze nel settore dell'allevamento larvale, dello svezzamento e dell'ingrasso di specie ittiche marine di interesse commerciale. L'attività svolta é stata incentrata su quattro specie ittiche innovative, la cernia (*Epinephelus marginatus*), il pagro (*Pagrus pagrus*), il sarago pizzuto (*Puntazzo puntazzo*) e la sogliola (*Solea vulgaris*).

Il primo progetto, oltre a risultati preliminari sull'allevamento larvale della cernia, ha permesso la realizzazione delle strutture. Il secondo progetto, relativo al pagro, ha visto il completamento del ciclo di allevamento larvale di questa specie con successive prove di ingrasso. Nell'ambito del terzo progetto si è svolto un ciclo completo di allevamento larvale e di svezzamento del sarago pizzuto, con successiva prova di ingrasso presso un impianto intensivo. Nell'ambito del quarto progetto è stato condotto un ciclo completo di allevamento larvale e di svezzamento della sogliola comune.

La presente relazione riguarda il quinto progetto svolto con fondi Docup Pesca ed è relativo alla riproduzione artificiale della cernia *Epinephelus marginatus*. Uno degli obiettivi primari è stato quello di approfondire le conoscenze sulla riproduzione artificiale che rimane uno dei principali ostacoli allo sviluppo dell'allevamento della specie. Inoltre è stata condotto un monitoraggio,"visus censis", dello stock naturale di cernia lungo le coste abruzzesi, allo scopo di prelevare eventuali campioni per la tipizzazione genetica. Considerando che la difficoltà di riproduzione di questa ed altre specie innovanti può essere legata alle condizioni di benessere dei riproduttori, si è approfondito anche questo aspetto.

La relazione, quindi, si muove in quattro ambiti tematici: la riproduzione artificiale, l'allevamento larvale, la genotipizzazione dei riproduttori e lo studio del loro benessere. Quest'ultima tematica, estremamente innovante, svolta in aggiunta agli altri obiettivi previsti dal progetto, è considerata di grande interesse dalla Comunità Europea (Wolffrom *et al.*,, 2004).

Le attività del progetto hanno comportato la messa a punto e la standardizzazione di metodiche che, descritte in maniera particolareggiata in appendice, offrono l'opportunità di trasferire questa conoscenza tecnica ai centri di riproduzione ittica.

1. MATERIALI E METODI

1. MATERIALI E METODI

1.1 CONDIZIONI DI STABULAZIONE DEI RIPRODUTTORI

Gli studi sulla riproduzione artificiale e sui trattamenti di stimolazione ormonale, finalizzati all'ottenimento di uova di cernia, sono stati effettuati dal 10 luglio al 29 luglio 2006 presso l'impianto della stazione sperimentale per lo studio delle risorse del mare (COISPA) di Torre a Mare di Bari.

Lo stock di riproduttori utilizzato è costituito da un totale di 30 cernie (*Epinephelus marginatus*) di cui 3 maschi e 27 femmine, catturati con palangari di fondo, tra il 1990 e il 1993, nel Tirreno (Ustica - Palermo) e nello Ionio settentrionale (Porto Cesareo – Lecce). Gli animali, tutti marcati con PIT (Passive Integrated Transpoder), prima delle prove erano mantenuti in n°3 vasche circolari da 4,5 mc ciascuna. Le vasche sono alimentate a circuito aperto con acqua marina a temperatura costante, proveniente da un pozzo profondo 60 metri. Le vasche sono collocate in un ambiente chiuso, con illuminazione artificiale, che, rispettivamente, al mattino ed alla sera si accende e si spegne in maniera graduale e progressiva, nell'arco di 1 ora. I pesci sono stati alimentati *ad libitum* a giorni alterni con dieta naturale (cefalopodi e pesce azzurro decongelati). Giornalmente le vasche sono pulite mediante rimozione dei residui accumulati sul fondo.

All'inizio dello studio i riproduttori risultavano così suddivisi:

- **Vasca A**
  N°10 femmine (56C, F71, C3F, F5F, F7D, 573, B60, E5F, 834, C35);
  N°2 maschi (B5E, E16).
- **Vasca B**
  N°3 femmine (421, 008, C6E);
  N°1 maschio (87 C).
- **Vasca C**
  N°14 femmine (F38, 426, 869, B33, D25, 052, 448, 30F, 57D,C66, 978, F53, 127, F67).

Le sigle sono costituite dalle ultime tre cifre/lettere del codice con cui, mediante il sistema PIT, ogni riproduttore è identificato.

La taglia degli esemplari è riportata negli allegati 1 e 2.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti allo stesso programma di condizionamento del foto-periodo naturale (figura 3), temperatura nell'intervallo 17 ± 0,5°C in inverno e 19 ± 0,5°C in estate nella vasca A, temperatura nell'intervallo 17,5 ± 0,5°C in inverno e 18 ± 0,5°C in estate nelle vasche B e C, nonché salinità costante di circa 35 g/litro in tutte le vasche.

La somministrazione di cibo è stata sospesa 24 ore prima di ogni manipolazione (trattamenti ormonali, controlli e spremiture).

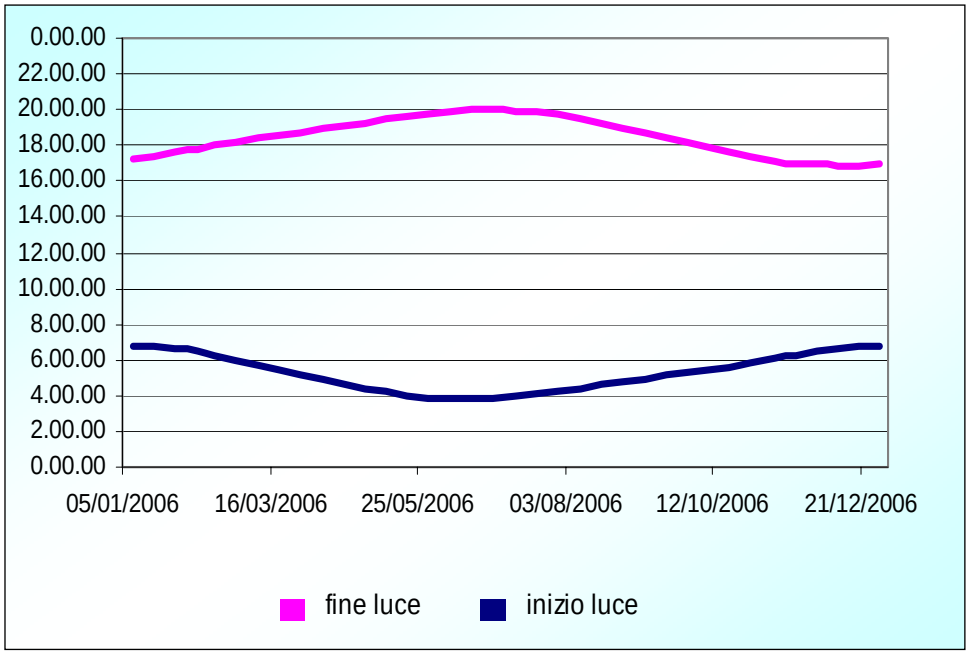


Figura 3. Curva del fotoperiodo

All'inizio delle prove le temperature in vasca erano le seguenti:

- **Vasca A**: temperatura 19 ± 0.5°C;
- **Vasca B e vasca C**: temperatura 18 ± 0.5°C.

I primi soggetti trattati sono stati mantenuti nelle stesse vasche e nelle medesime condizioni, mentre un secondo gruppo di soggetti è stato trasferito, immediatamente dopo il trattamento, in una quarta vasca allestita all'esterno ed alimentata con acqua a 20 ± 1°C (alimentata da acqua di pozzo e acqua di mare). Tale trasferimento è stato deciso per valutare l'effetto dell'innalzamento della temperatura sulla maturazione degli oociti e sull'ovulazione.

- **Vasca D esterna** Temperatura 20 ± 1°C
  Trasferimento di n°2 femmine (F5F, 573) dalla vasca A e di n°1 femmina (30F) dalla vasca C;
  Trasferimento del maschio (B5E) dalla vasca A.

1.2 MONITORAGGIO PRELIMINARE DELLA MATURAZIONE OVARICA E PROGRAMMAZIONE DEI TRATTAMENTI ORMONALI

Le operazioni di selezione hanno riguardato l'intero gruppo di riproduttori. Gli animali da sottoporre a trattamento sono stati individuati mediante due monitoraggi effettuati il 10 luglio 2006 ed il 18 luglio 2006. Il primo è stato condotto su un numero di 16 soggetti, di cui 13 femmine e 3 maschi, appartenenti alle vasche A e B. Il secondo è stato realizzato su un numero di 14 femmine tutte provenienti dalla vasca C.
I monitoraggi hanno avuto lo scopo di selezionare i riproduttori femmina in base allo stadio di maturazione ovarica, per mezzo sia della valutazione macroscopica dei parametri anatomici esterni sia della misurazione degli oociti osservati allo stereo microscopio.
Per effettuare questi controlli tutti i soggetti sono stati catturati uno alla volta e trasferiti in una vasca da 70 litri contenente l'anestico: olio essenziale di chiodi di garofano in soluzione alcolica (1 ml di principio attivo in 9 ml di alcol 95°) alla concentrazione finale di 45mg/litro.
Per le femmine, dal punto di vista macroscopico, sono stati valutati il rigonfiamento e turgidità dell'addome, nonché l'ipertrofia della papilla genitale. Dal punto di vista microscopico il livello di maturazione delle femmine è stato determinato mediante osservazione e misurazione del diametro degli oociti prelevati nell'ovario mediante biopsia. L'obiettivo del monitoraggio è quello di selezionare i soggetti idonei ai trattamenti ormonali, cioè le femmine che presentano almeno una parte degli oociti ad uno stadio di vitellogenesi medio od avanzato, ossia un diametro di almeno 300 µm.
Il prelievo oociti (biopsia) è avvenuto mediante catetere sterile da 0.6 mm x 19 mm, introdotto attraverso la papilla genitale (figura 4). La misurazione del diametro degli oociti è stata effettuata utilizzando un oculare micrometrico (obiettivo 40x). Lo stadio di sviluppo degli oociti è stato determinato immediatamente dopo il prelievo, mediante osservazione a fresco (microscopio con obiettivo 40x). Campioni di tessuto ovario, prelevati durante i monitoraggi preliminari, sono stati conservati in etanolo 90° a 4 ±2°C allo scopo di successivi accertamenti; infatti sono stati utilizzati, dopo qualche mese, per i controlli istologici effettuati come indagine supplementare per indagare circa le cause del mancato successo riproduttivo (paragrafo 1.5).

Figura 4. biopsia ovarica

Per i riproduttori maschi il monitoraggio ha verificato la fuoriuscita di liquido seminale mediante lieve pressione a livello addominale (soggetto fluente). Nei soggetti risultati fluenti è stato prelevato un campione di sperma mediante aspirazione dall'orifizio genitale per mezzo di una pipetta Pasteur, subito dopo sono valutati al microscopio la concentrazione dello sperma, lo stadio di sviluppo degli spermatozoi e la mobilità degli stessi. La concentrazione degli spermatozoi nel liquido seminale è stata stimata mediante conta in camera di Burker (diluizione 1:100 e osservazione al microscopio con obiettivo 40x), mentre lo stadio di sviluppo è stato determinato sulla base di una scala predefinita a 5 stadi (Chambeyron e Zohar,1990). Infine, la mobilità, espressa come percentuale di spermatozoi mobili sul totale degli spermatozoi osservati, è stata valutata al microscopio dopo l'attivazione dello sperma in acqua di mare.

Monitoraggio del 10 luglio e primo programma di trattamento

Nel monitoraggio del 10 luglio, il prelievo ovarico, effettuato su 13 femmine, ha dato esito negativo su 4 soggetti (impossibilità di introdurre il catetere e nessun prelievo di oociti), ha evidenziato oociti tutti in fase di pre-vitellogenesi in 2 soggetti, mentre nelle rimanenti 7 femmine sono stati riscontrati oociti ad uno stato di vitellogenesi più o meno avanzato. In questo gruppo di 7 femmine, 2 soggetti presentavano vari oociti maggiori di 400 µm e sono risultate già idonee ai trattamenti ormonali (B60 e C6E), altri 2 soggetti, che presentavano oociti tra 150 µm e 350 µm, sono stati annotati per trattamenti successivi (F5F e 573), mentre le ultime 3 femmine, sulle quali sono stati prelevati solo alcuni oociti (da 1 a 3) tra 250 e 350 µm, non sono state incluse nel primo gruppo da trattare (C3F, E5F e C35). I dati dettagliati sono riportati in allegato 1.

La femmina B60 (figura 5) e le altre femmine selezionate per ricevere i primi trattamenti ormonali, presentavano oociti a diversi stadi di sviluppo, infatti nella matrice sierosa erano presenti oociti pre-vitellogenici nonché gruppi più o meno numerosi di oociti in fase di vitellogenesi.

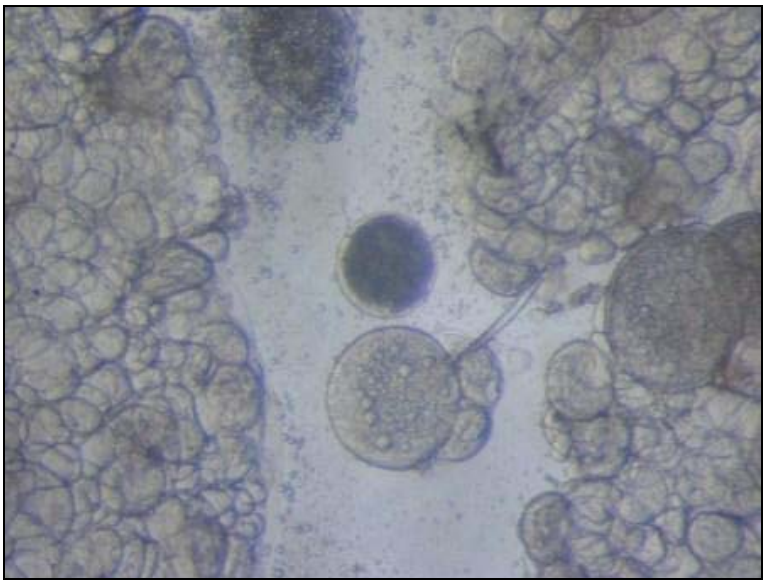


Figura 5. Oociti pre-vitellogenici e a differenti stadi di vitello-genesi (femmina B60 osservata il 10 luglio)

Per quanto riguarda i parametri macroscopici, nessuna delle femmine controllate presentava un rigonfiamento dell'addome, mentre 3 presentavano una papilla ipertrofica (F5F, C6E e 008) 3 una papilla lievemente ipertrofica (C3F, C35 e 421), mentre le rimanenti 7 femmine non presentavano nessun segno esterno di maturazione dell'ovaio. Il riscontro di segni esterni di maturazione non è risultato coerente con le osservazioni sullo stadio di maturazione degli oociti.

Dei 3 maschi monitorati il 10 luglio, 2 sono risultati fluenti. Come illustrato in figura 6, dai 2 maschi fluenti sono risultati spermatozoi a diversi stadi di sviluppo.

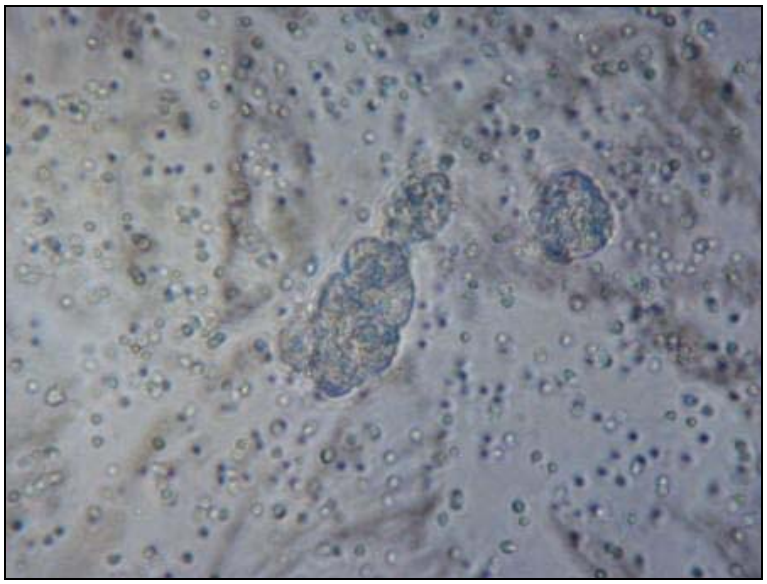


Figura 6. Spermatogoni e spermatozoi (maschio B5E osservato il 10 luglio)

Considerato il numero limitato di soggetti maschi, la limitata produzione giornaliera di sperma per singolo individuo (specie oligo-spermatica) e la necessità di disporre sperma per l'intero periodo sperimentale, è stato deciso di trattare subito tutti 3 maschi per stimolarne la produzione e di scaglionare nel tempo i trattamenti sulle femmine, in modo da non ottenere tutte deposizioni negli stessi giorni.
La decisione di trattare le femmine singolarmente, ad intervallo di 2-3 giorni, oltre ad avere lo scopo di disporre della massima quantità di sperma per ogni spremitura, aveva anche quello di

utilizzare i risultati ottenuti dopo ciascun trattamento per standardizzare progressivamente i tempi e le modalità di stimolazione ormonale.

Sulla base delle suddette osservazioni è stato deciso il seguente calendario dei trattamenti:

- 11 luglio – Trattamento dei 3 maschi B5E, E16 e 87C con LHRHa (Luteinizing Hormone Relasing Hormone analog)
- 11 luglio - Trattamento della femmina C6E con impianto a lungo rilascio tipo EVAc (Ethlylene-Vinyl Acetate) contenenti GnRHa (Gonadotropin Releasing Hormone agonists)
- 13 luglio - Trattamento della femmina B60 con impianto EVAc contenenti GnRHa

Monitoraggio del 18 luglio e secondo programma di trattamento

L'assenza di risposta nelle femmine, dopo i primi 2 trattamenti sopra descritti, ha indotto a selezionare ulteriori femmine e ad introdurre una modifica al protocollo in modo da avere maggiori probabilità di successo. Sono stati presi i seguenti provvedimenti:

- Monitoraggio di altri 14 soggetti per individuare nuove femmine da sottoporre ai trattamenti di stimolazione ormonale.
- Diversificazione dei trattamenti; alcune femmine saranno trattate con impianti EVAc, altre con doppia somministrazione intramuscolo di LHRHa.
- Preparazione di una vasca di stabulazione esterna per trasferimento dei soggetti trattati con temperatura dell'acqua di 20 ± 1°C.

Su un totale di 14 femmine esaminate nel corso del monitoraggio del 18 luglio, il prelievo ovarico ha dato esito negativo su 8 soggetti (impossibilità di introdurre il catetere e nessun prelievo di oociti), mentre ha evidenziato oociti in fase di pre-vitellogenesi in 4 soggetti; nei rimanenti 2 soggetti sono stati riscontrati oociti ad uno stato di vitellogenesi più o meno avanzato. Di queste 2 femmine, una (30F) presentava oociti tra 205 e 435 µm ed è risultata quindi idonea ai trattamenti ormonali, mentre la seconda (F67), che presentava oociti tra 115 e 250 µm, è stata selezionata per trattamenti successivi. I dati dettagliati sono riportati in allegato 2.

Per quanto riguarda i parametri macroscopici, come nel monitoraggio del 10 luglio, nessuna delle femmine controllate presentava un rigonfiamento dell'addome, solo 3 presentavano un papilla lievemente ipertrofica (869, 57D e 978), mentre le rimanenti 11 femmine non presentavano nessun segno esterno di maturazione. Anche in questo caso, il riscontro di segni esterni di maturazione non è risultato coerente con le osservazione sullo stadio di maturazione degli oociti.

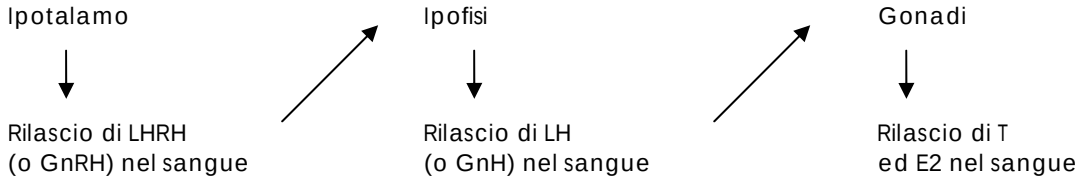
Sulla base delle suddette osservazioni è stato deciso di procedere al trattamento della femmina risultata idonea al presente monitoraggio (30F) e di 2 femmine identificate nel precedente (573 e F5F).
E' stato adottato il seguente calendario dei trattamenti:

- 19 luglio – Trattamento della femmina 573 con somministrazione intramuscolo di LHRHa
- 19 luglio - Trattamento della femmina F5F con impianto EVAc di GnRHa
- 20 luglio – Trattamento della femmina 30F con somministrazione intramuscolo di LHRHa

Come in precedenza, i trattamenti sono stati scaglionati in modo da disporre di una sufficiente quantità di sperma e per poter utilizzare i risultati ottenuti al fine di standardizzare progressivamente i tempi e le modalità di stimolazione ormonale.

1.3 STIMOLAZIONE ORMONALE

I processi riproduttivi nei pesci sono regolati a livello endocrino da una serie di ormoni che interagiscono tra di loro a cascata, controllando le fasi di maturazione dei gameti.
L'insieme dei processi ormonali coinvolti può essere riassunto nel seguente modo:



Le femmine di molte specie ittiche di interesse commerciale presentano, in cattività, disfunzioni riproduttive, si osservano infatti anomalie nel ciclo di maturazione delle gonadi, nella ovulazione o nella emissione dei gameti. Lo stress cronico indotto dal mantenimento in cattività comportano il blocco dello sviluppo ovario, con il mancato raggiungimento della maturazione finale degli oociti e quindi l'assenza di ovulazione. Le ricerche condotte su numerose specie ittiche (Rainis &t al., 2005) hanno dimostrato che è possibile intervenire sull'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi e regolare il metabolismo endocrino che regola la maturazione e l'emissione dei gameti.
La prime prove di stimolazione ormonale, condotte con la somministrazione di analoghi di LH-RH, hanno dato risultati poco soddisfacenti; uno dei principali ostacoli risulta essere la rapidità di degradazione del LHRH da parte di endopeptidasi presenti nell'ipofisi, fegato e milza.
Nel caso della sperimentazione condotta sulla cernia bruna, nell'ambito del presente lavoro, le prove di stimolazione ormonale sono state condotte mediante una doppia somministrazione di analoghi di LH-RH (LH-RHa) ed in oltre utilizzando trattamenti innovanti, quali gli impianti a lento rilascio di analoghi di GnRH (GnRHa).
Sia il GnRHa, sia LH-RHa inducono, a livello ipofisario, il rilascio, nel sistema circolatorio, dell'ormone luteinizzante LH, il quale agisce a sua volta sulle gonadi, stimolando la maturazione finale degli oociti e l'ovulazione (Mylonas &t al, 2001a).

Trattamenti con LHRHa

L'analogo di LHRH utilizzato è stato il "Suprefact iniettabile 1 mg/ml", della casa farmaceutica Aventis, il cui principio attivo è il Buserelin (Spedicato *et al.* 1998 b).

Trattamento dei maschi

L'11 di luglio, i 3 maschi (B5E, E16 e 87C), previa anestesia per bagnosono stati sottoposti a stimolazione ormonale mediante inoculazione intramuscolo nella regione dorsale (figura 7) di Buserelin alla dose di 15 µg/kg peso vivo.

Figura 7. Stimolazione ormonale con LH-RHa

Dopo il trattamento i riproduttori E16 e 87C sono stati reimmessi nelle stesse vasche da cui erano stati prelevati e sono stati mantenuti, rispettivamente, alla temperatura di 19 ± 0.5°C (vasca A) e di 18 ± 0.5°C (vasca B) per tutto l'arco della prova. Il maschio B5E, inizialmente reimmesso nella sua vasca di origine e mantenuto a 19 ± 0.5°C (vasca A), dieci giorni dopo il trattamento è stato trasferito in vasche all'esterno, dove la temperatura dell'acqua era maggiore (vasca D a 20 ± 1°C).

Trattamento delle femmine

Le femmine 573 e 30F sono state sottoposte a stimolazione ormonale mediante LHRHa. L'induzione è avvenuta rispettivamente in data 19-20 luglio e 20-21 luglio, con dosi specifiche, rispettivamente, di 21 µg per kg/peso vivo e di 31,5 µg/kg peso vivo. Le dosi somministrate ad ogni femmina sono state frazionate in due porzioni, praticate ad intervallo di 24 ore. Le due femmine sono state preventivamente anestetizzate e l'inoculazione è stata effettuata intramuscolo, come descritto precedentemente.
Dopo la somministrazione della prima dose, le 2 femmine 573 e 30F, provenienti, rispettivamente, dalla vasca A (19 ± 0.5°C) e dalla vasca C (18 ± 0.5°C), sono stato trasferite all'esterno (vasca D a 20 ± 1°C), per verificare l'effetto dell'innalzamento della temperatura sul processo di maturazione degli oociti.

Trattamenti con impianti a lento rilascio di GnRHa

Gli impianti a lento rilascio di GnRha utilizzati per l'induzione dell'ovulazione sono stati forniti dall'Hellenic Center for Marine Research (Creta, Grecia). Essi sono costituiti da pellet di ethylene vinyl acetate, contenenti analogo sintetico di GnRH a due diversi dosaggi: 100 e 250 µg/prodotto attivo per pellet.
L'EVAc è un prodotto brevettato che, una volta impiantato, è predisposto per dissolversi gradualmente, assicurando un rilascio graduale e prolungato di gonadotropine nel sangue. Attualmente gli impianti a lento rilascio di analoghi di GnRHa rappresentano il metodo più innovativo per il controllo dei processi riproduttivi: da un lato agiscono sull'ipofisi e non direttamente sulle gonadi e dall'altro consentono, mediante un rilascio continuo dell'ormone, di mantenere il livello di GnRH nel sangue su livelli costanti per un periodo prolungato (Zohar &t al., 2001b, Marino &t al.,2003), superando gli inconvenienti legati alle somministrazioni multiple.
I pellets, di forma cilindrica, lunghi 3 mm e con diametro di 2 mm, sono stati inoculati agli animali sotto la cute, nella regione dorsale, usando una siringa per l'applicazione di PIT tag. (figura 8).

Figura 8. Stimolazione ormonale con impianto di GnRha

Trattamento delle femmine

Gli impianti contenenti le due diverse concentrazioni di gonadotropine sono stati somministrati in numero tale da assicurare una dose di GnRHa di 40-50 µg/kg peso vivo. Le femmine a cui sono stati somministrati, previa anestesia, gli impianti di GnRHa sono 3. La C6E, peso 8,24 kg, è stata trattata in data 11 luglio usando n°2 impianti di GnRHa, uno da 100 e l'altro da 250 µg, ottenendo

una dose di 42,47 µg/kg pv. La femmina B60, peso 5,08 kg, è stata impiantata il 13 luglio con un unico impianto di GnRHa da 250 µg (dose 49,2 µg/kg pv).
La femmina F5F, peso 5,64 Kg, è stata trattata il 19 luglio 2006 con un unico impianto di GnRHa di 250 µg (dose 44,3 µg/kg pv).

Dopo il trattamento le femmine C6E e B60 sono state mantenute nelle loro vasche di origine (vasche B e A), rispettivamente alla temperatura di 18 ± 0.5°C e di 19 ± 0.5°C, mentre la femmina F5F, proveniente dalla vasca A (19 ± 0.5°C), è stata trasferita all'esterno (vasca D a 20 ± 1°C).

Quadro riepilogativo

Il protocollo dei trattamenti ormonali adottato durante la prova è riassunto nella tabella sottostante (Tabella 1).
La stimolazione ormonale è stata effettuata su un totale di 8 animali, di cui 3 maschi e 5 femmine, dall'11 luglio al 21 luglio 2006, nel pieno della stagione riproduttiva. L'impianto a rilascio graduale di GnRHa è stato inoculato a 3 femmine (C6E, B60 e F5F), mentre l'analogo di LH-RHa è stato iniettato a 3 maschi (B5E, E16 e 87 C) e 2 femmine (573 e 30 F).

Tabella 1. Riepilogo dei trattamenti

Data trattamento	Codice identificativo esemplare cernia	Peso esemplare (Kg)	Diametro oociti (µm)	Ormone	Dose (µg/Kg)	Temperatura prima e dopo il trattamento (°C)	
						Prima	Dopo
Maschi							
11 luglio	B5E	7,6		LHRHa	15,0	19 ± 0.5	20 ± 1
11 luglio	E16	21,3		LHRHa	15,0	19 ± 0.5	19 ± 0.5
11 luglio	87C	13,52		LHRHa	15,0	18 ± 0.5	18 ± 0.5
Femmine							
11 luglio	C6E	8,24	185-645	GnRHa	42,5	18 ± 0.5	18 ± 0.5
13 luglio	B60	5,08	205-415	GnRHa	49,2	19 ± 0.5	19 ± 0.5
19 luglio	573	3,8	185-275	LHRHa	10,5	19 ± 0.5	20 ± 1
20 luglio				LHRHa	10,5		
19 luglio	F5F	5,64	230-575	GnRHa	44,3	19 ± 0.5	20 ± 1
20 luglio	30F	2,2	205-435	LHRHa	18,0	18 ± 0.5	20 ± 1
21 luglio				LHRHa	13,5		

1.4 CONTROLLO DEI RIPRODUTTORI DOPO LA STIMOLAZIONE ORMONALE

Le femmine di cernia in condizioni di cattività non depongono le uova come avviene in natura, quindi, dopo l'ovulazione, si rende necessario procedere alla spremitura dell'addome per poterle raccogliere. E' stato osservato che, per ottenere uova di buona qualità, il periodo tra l'ovulazione e la spremitura deve essere molto breve; se la spremitura non avviene nelle ore immediatamente successive all'ovulazione, le uova vanno velocemente in sovra-maturazione (Tyler &t. al., 1996). Di conseguenza si è reso necessario sottoporre tutti soggetti trattati ad un attento monitoraggio dello sviluppo ovario, al fine di individuare con precisione il periodo dell'ovulazione.
Sono stati rilevati giornalmente i cambiamenti nella morfologia e nelle dimensioni degli oociti, determinandoli immediatamente dopo la biopsia, mediante microscopio stereo (obiettivo 40x). La misurazione del diametro è stata effettuata ogni giorno su campioni di 50 oociti ed i risultati sono stati espressi graficamente, al fine di valutare più accuratamente il progressivo sviluppo degli oociti indotto dalla terapia ormonale. Anche durante questi controlli, campioni di tessuto ovarico sono stati prelevati e conservati in etanolo 90°, alla temperatura 4 ±2°C. Sono stati utilizzati successivamente per gli esami istologici effettuati come approfondimento delle cause della difficoltà riproduttiva osservata (paragrafo 1.5).

Per quanto riguarda i maschi, non è stato necessario procedere ad un particolare programma di controllo successivo alla stimolazione ormonale, in quanto i soggetti trattati con LHRHa sono risultati fluenti per un periodo di almeno un mese. L'esame dello sperma è stato comunque effettuato nel corso delle operazioni di fecondazione artificiale, al fine di valutarne la capacità fecondante. Gli spermatozoi, che normalmente sono immobili nel liquido seminale, sono stati attivati a contatto con l'acqua di mare, in modo da potere valutare la percentuale di mobilità, quale indice della loro capacità fecondante; infatti un'alta mobilità degli spermatozoi risulta fondamentale per ottenere una buona percentuale di uova fecondate.

1.5 ESAME ISTOLOGICO DI BIOPSIE OVARICHE

Come descritto nei paragrafi precedenti, campioni di tessuto ovarico, prelevati nel corso dei monitoraggi preliminari e dei controlli post-trattamento ormonale, sono stati conservati in vista di eventuali accertamenti. Questi campioni, preso atto dei problemi riproduttivi osservati e al fine di studiarne le cause, sono stati quindi esaminati istologicamente. Gli esami a fresco degli oociti prelevati nelle biopsie sono un test veloce che permette di conoscere il diametro degli oociti e la loro morfologia, così come appare per trasparenza del corion; l'esame a fresco ha lo scopo di individuare rapidamente i soggetti pronti da trattare e poi il momento dell'ovulazione. L'esame istologico invece, più lungo e complesso, permette di studiare la struttura cellulare dell'oocita e di valutare accuratamente le fasi di maturazione e l'influenza della stimolazione ormonale sullo sviluppo della gonade.

I campioni conservati erano 21, provenienti sia da femmine non trattate, sia da femmine trattate. Nelle femmine non trattate il campione è stato prelevato solo durante monitoraggio preliminare (1°prelievo). Nelle femmine trattate i campioni sono stati prelevati, oltre che in fase di monitoraggio preliminare (1°prelievo), anche a differenti intervalli di tempo dopo il trattamento (Tabella 2).

Tabella 2. Riepilogo dei campionamenti istologici

	Codice identificativo dell'animale	Data prelievo 1° campione per istologico	Data successivi prelievi	Ore trascorse tra il trattamento ormonale e il 2° prelievo per istologico
Femmine non trattate	E5F	10 luglio 2006	-	-
	F67	10 luglio 2006	-	-
	7FD	18 luglio 2006	-	-
Femmine trattate GnRha	C6E	10 luglio 2006	16 luglio 2006	118
	B60	10 luglio 2006	16 luglio 2006	70
			18 luglio 2006	123
			20 luglio 2006	170
			21 luglio 2006	195
			26 luglio 2006	311
	F5F	19 luglio 2006	-	-
Femmine trattate LhRha	573	19 luglio 2006	23 luglio 2006	72
			25 luglio 2006	118
			26 luglio 2006	143
			28 luglio 2006	190
	30F	18 luglio 2006	23 luglio 2006	46
			28 luglio 2006	164
			29 luglio 2006	189

I campioni sono stati preventivamente conservati in fissativi di Bouin per 48 ore e poi trasferiti in alcool etilico al 70% e conservati a 4°C ± 2°C fino al momento dell'esame istologico per inclusione. L'inclusione è stata realizzata manualmente; infatti, a causa della estrema delicatezza strutturale dei tessuti in esame, non ci si è avvalsi del processatore automatico utilizzato nella routine istologica. I campioni sono stati disidratati attraverso una serie crescente di alcool dal 70 % al 100

% e chiarificati applicando tempi di disidratazione e di chiarificazione più brevi rispetto a quelli standard. Dopo inclusione in paraffina, da ogni campione sono state realizzate due sezioni di 3 µm colorate con Ematossilina-Eosina. Il protocollo istologico messo a punto nell'ambito di questo progetto, qui brevemente descritto, è riportato dettagliatamente nell'allegato 3. La lettura dei preparati istologici è stata realizzata mediante microscopio ottico con obiettivo 20x, 40x e 100x.
Lo stadio di maturazione ovarica è stato determinato in accordo con la suddivisione in 7 stadi elaborata da Marino &t al. (2001) per la specie *Epinephelus marginatus;* ad ogni stadio di maturazione corrispondono caratteristiche macroscopiche e microscopiche dell'ovaio. Dal punto di vista macroscopico l'ovario è valutato in base al suo colore, alla sua dimensione e consistenza. Dal punto di vista microscopico esso è classificato istologicamente sulla base dei differenti stadi di sviluppo di oociti presenti ma, soprattutto, in base alla maturità dell'oocita con stadio di sviluppo più avanzato, come descritto nella tabella successiva (Tabella 3).

Tabella 3. Descrizione istologica degli stadi di maturazione ovarica di *E.marginatus*

Stadio di maturazione ovarica	Descrizione istologica
J- gonade immatura	Presenza di cellule germinali primordiali, gruppi di oogoni ed oociti pre-vitellogenici (numerosi allo stadio di nucleolo cromatina e allo stadio perinucleolare iniziale, pochi allo stadio perinucleolare finale). Presenza di oociti pre-vitellogenici atresici.
F1- gonade quiescente	Situazione simile allo stadio precedente con un aumento di oociti pre-vitellogenici allo stadio perinucleolare finale.
F2 - gonade in sviluppo (vitellogenesi iniziale)	Comparsa di oociti vitellogenici allo stadio di prima vescicola lipidica distribuiti tra oogoni e tra oociti pre-vitellogenici occasionalmente allo stadio di nucleolo cromatina e soprattutto allo stadio perinucleolare finale. Quantità variabili di oociti allo stadio di prima vescicola lipidica atresici.
F3 - gonade in maturazione (vitelogenesi finale)	Gruppi di oociti vitellogenici allo stadio di primo, secondo e terzo granulo di vitello predominanti tra oociti vitellogenici al primo e secondo stadio di vescicola lipidica ed oociti pre-vitellogenici. Presenza occasionale di oociti atresici.
F4 - gonade matura	Gruppi di oociti idratati distribuiti tra gruppi di oociti vitellogenici a differenti stadi di sviluppo. Presente una scarsa quantità di oociti pre-vitellogenici e di oociti vitellogenici atresici.
F5 - gonade in riproduzione	Presenza di follicolo post-ovulatorio tra oociti a differenti stadi di vitellogenesi, soprattutto al terzo stadio di granulo di vitello ed oociti idratati. Occasionale presenza di oociti atresici.
F6 - gonade svuotata	Presenza di follicolo post-ovulatorio con scarsi residui di oociti vitellogenici distribuiti tra numerosi follicoli vitellogenici atresici. Presenza di oogoni ed oociti pre-vitellogenici allo stadio di nucleolo cromatina ed allo stadio perinucleolare.

Lo stadio di sviluppo degli oociti è stato interpretato secondo un quadro descrittivo tracciato da Mayer &t al.(1998) e da Abou-Seedo &t al. (2003), rispettivamente per la specie *Dicentrarchus labrax* e *Acanthopagrus latus.*
Entrambi gli autori distinguono 4 fasi di crescita oocitaria sulla base di trasformazioni nucleari e citoplasmatiche (Tabella 4). Nella prima fase di crescita, o pre-vitellogenesi, tutte le cellule germinali primordiali, o oogoni, presenti nell'ovario proliferano attraverso divisioni mitotiche, successivamente soltanto alcuni oociti primari aumentano di volume e si avviano a diventare gameti maturi effettuando la meiosi. In questa fase la crescita citoplasmatica è molto limitata.
La seconda fase di crescita, o vitellogenesi, è caratterizzata dal blocco della meiosi allo stadio di profase della prima divisione e da una rapida crescita degli oociti provocata da un accumulo nel citoplasma di vitello, cioè di sostanze che costituiscono la riserva proteica durante l'embriogenesi e poi, dopo la schiusa, finchè il pesce non inizia ad alimentarsi.

La fase di maturazione è contraddistinta dalla migrazione del nucleo, dalla sua degradazione e dalla ripresa della meiosi. In questa fase gli oociti raggiungono il massimo diametro in seguito all'idratazione delle componenti citoplasmatiche e fuoriescono dal follicolo (ovulazione).
L'uovo è caratterizzato da un nuovo blocco della meiosi allo stadio di metafase della seconda divisione. Il completamento della meiosi avviene solo dopo la fecondazione.
L'ultima fase, detta di atresia (degenerazione), è contraddistinta da una involuzione del follicolo post-ovulatorio e dalla morte e riassorbimento di oociti maturi non ovulati, di oociti post-vitellogenici che non raggiungono la maturazione e di oociti a diversi stadi di sviluppo che non proseguono la maturazione. Il processo di atresia può verificarsi a qualsiasi stadio di maturazione oocitaria.
Ogni fase di crescita può essere suddivisa in diversi stadi di sviluppo, identificati istologicamente sulla base delle variazioni morfologiche e della presenza e distribuzione di inclusioni citoplasmatiche, quali gocce lipidiche, alveoli corticali e granuli di vitello (Tabella 4). Le trasformazioni morfologiche delle componenti strutturali sono rappresentate schematicamente in figura 9.

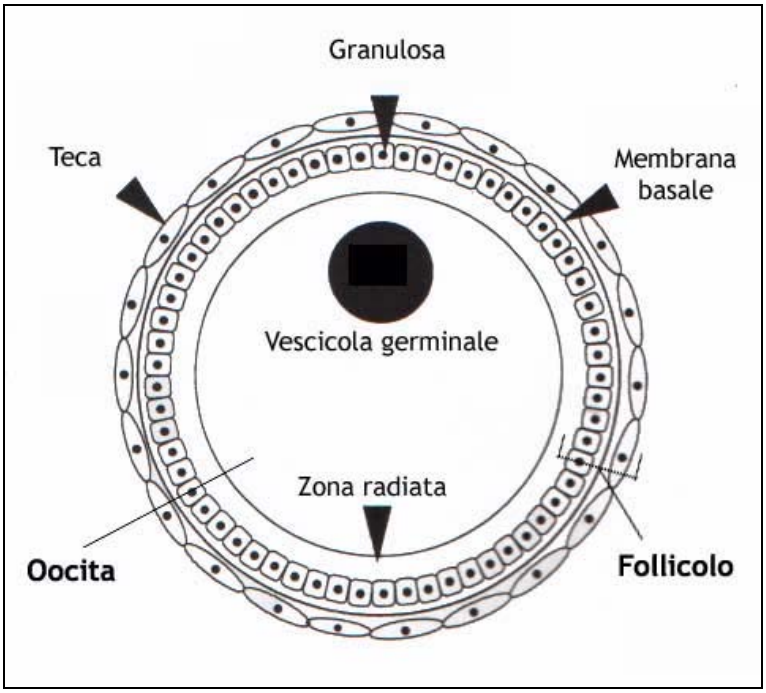


Figura 9. Struttura del follicolo ovarico

Tabella 4. Descrizione istologica degli stadi di sviluppo oocitari

Fase di crescita oocitaria	Stadio di sviluppo oocitario	Descrizione istologica
Fase di crescita primaria (pre-vitellogenesi)	Oogone	Piccola cellula dalla forma rotonda o ovale con diametro di circa 8-14 μm presente nello stroma delle pieghe ovigere isolatamente o in gruppi di 4-6 cellule che originano da proliferazione mitotica. Alto rapporto nucleo-citoplasma, scarsa presenza di quest'ultimo. Citoplasma debolmente basofilo. Nucleo voluminoso e centrale con basofilia più accentuata rispetto al citoplasma e con nucleolo in posizione centrale.
	Stadio nucleolo cromatina	Cellula dalla forma ovale o rotonda di diametro di circa 20-30 μm con un nucleo voluminoso il cui diametro rappresenta l'80% del diametro totale dell'oocita. Stretta zona di citoplasma fortemente basofila (basofilia più intensa che nello stadio precedente). Nucleo meno basofilo del citoplasma contenete un piccolo numero di nucleoli fortemente basofili e filamenti di cromosomi che indicano l'inizio della divisione meiotica. Comparsa in vicinanza del nucleo di corpo vitellino di Balbiani composto da idiosoma (componente non basofila) e da sostanza palliale (componente basofila).
	Stadio perinucleolare iniziale	Cellula di forma ovale, rotonda, triangolare o rettangolare di diametro di circa 30-60 μm. Il nucleo subisce una riorganizzazione in concomitanza con la meiosi come dimostrato dall'aumento del suo diametro e dalla presenza di cromosomi a spazzola distribuiti nel nucleoplasma granulare. La cellula presenta un voluminoso nucleo (vescicola germinale) ed una zona ristretta di citoplasma che aumenta con la crescita dell'oocita, da qui, una diminuzione del rapporto nucleo-citoplasma stimato del 65%. Il nucleo disposto centralmente contiene 8-12 nucleoli periferici.il citoplasma ed i nucleoli sono ancora fortemente basofili. Comparsa del follicolo primordiale sottoforma di un sottile strato di cellule fusiformi associato alla membrana basale.
	Stadio perinucleolare finale	Cellula di forma rotonda o rettangolare con diametro di circa 60-120 μm. Il voluminoso nucleo in posizione centrale contiene numerosi piccoli nucleoli periferici ed è caratterizzato da un blocco della meiosi allo stadio di prima divisione (profase). Nonostante il blocco della meiosi la differenziazione citoplasmatica e follicolare proseguono. Nel citoplasma compaiono piccoli vacuoli lipidici mentre il corpo vitellino di Balbiani migra alla periferia dell'oocita e si degrada. Il citoplasma perde l'intensa basofilia tipica degli stadi precedenti ed aumenta di volume provocando un ulteriore diminuzione del rapporto nucleo-citoplasma stimato del 50-55%.. Comparsa della zona radiata tra granulosa e ooplasma, membrana acellulare ed acidofila.
Fase di crescita secondaria (vitellogenesi)	Stadio di prima vescicola lipidica	Cellula con diametro di circa 110-160 μm e rapporto nucleo-citoplasma stimato del 50%. Il voluminoso nucleo contenente numerosi piccoli nucleoli periferici presenta ora contorni irregolari. Numerose piccole gocce lipidiche compaiono inizialmente nel citoplasma corticale. In concomitanza con la crescita del volume dell'oocita le gocce lipidiche rappresentate istologicamente come vuoti vacuoli aumentano in dimensioni e numero e si distribuiscono irregolarmente nel citoplasma ed intorno al nucleo. Il citoplasma ora di consistenza granulare conserva la colorazione debolmente basofila. Il follicolo si divide in due strati, granulosa e teca, separati dalla membrana basale.La sottile zona radiata con colorazione acidofila è maggiormente visibile in questo stadio.

Fase di crescita oocitaria	Stadio di sviluppo oocitario	Descrizione istologica
ase di crescita secondaria (vitellogenesi)	Stadio di seconda vescicola lipidica	Cellula con diametro di circa 155-250 μm e rapporto nucleo-citoplasma stimato del 45%. Il voluminoso nucleo centrale contenente numerosi piccoli nucleoli allineati al di sotto della membrana nucleare che presenta contorni sempre più irregolari. Le gocce lipidiche di diametro maggiore rispetto allo stadio precedente si dispongono ordinatamente nella porzione intermedia del citoplasma e soprattutto intorno al nucleo. Il citoplasma lievemente basofilo è caratterizzato a questo stadio dalla comparsa di piccoli ed acidofili granuli di vitello nella regione corticale. Il doppio strato follicolare e la zona radiata diventano più spessi.
	Stadio di primo granulo di vitello	Cellula con diametro di circa 260-440 μm e rapporto nucleo-citoplasma stimato del 40%. Il nucleo in posizione centrale presenta una membrana nucleare sempre più dentellata. Nel citoplasma i piccoli numerosi ed acidofili granuli di vitello si diffondono tra le gocce lipidiche presenti nella porzione intermedia andando a formare una distinta e vasta area assente nella regione perinucleare. Contemporaneamente prosegue la migrazione delle gocce lipidiche verso l'interno con formazione di estesi raggruppamenti intorno al nucleo. Il citoplasma ora intensamente acidofilo presenta oltre ai granuli di vitello e gocce lipidiche anche piccole vescicole acidofile, gli alveoli corticali, distribuiti nella regione più esterna. La zona radiata presenta un evidente striatura trasversale.
	Stadio di secondo granulo di vitello	Cellula con diametro di circa 440-530 μm e rapporto nucleo-citoplasma stimato del 40%. Il nucleo in posizione centrale presenta una membrana nucleare fortemente dentellata. I granuli di vitello ora più numerosi migrano centralmente e si fondono a formare dei globuli debolmente acidofili. Allo stesso modo le gocce lipidiche localizzate intorno al nucleo fondono raggiungendo dimensioni sempre maggiori. Lo spazio perinucleare scompare ed il citoplasma appare uniformemente acidofilo. Il follicolo raggiunge il massimo spessore e la zona radiata si divide in zona radiata esterna striata più sottile ed acidofila ed una zona radiata interna omogenea più spessa e debolmente acidofila.
	Stadio di terzo granulo di vitello	Cellula con diametro di circa 530-700 μm e rapporto nucleo-citoplasma stimato del 25-30%. Il nucleo in posizione centrale presenta una membrana nucleare fortemente dentellata. Il citoplasma debolmente acidofilo risulta interamente occupato da gocce lipidiche e da numerosi e grandi globuli di vitello leggermente acidofili. La coalescenza delle gocce lipidiche diventa più marcata a questo stadio. Gli alveoli corticali più numerosi rispetto agli stadi precedenti si addensano nel citoplasma corticale adiacente alla zona radiata. Il follicolo continua la differenziazione. Le cellule della granulosa assumono una forma cuboidale. La zona radiata raggiunge il suo massimo spessore.
Maturazione	Oocita maturo	Cellula con diametro > 700 μm. Il nucleo in posizione centrale contiene numerosi nucleoli periferici. La coalescenza delle gocce lipidiche si estende dal centro alla periferia con formazione di estesi ammassi lipidici. Contemporaneamente prosegue la coalescenza di granuli di vitello . la maturazione finale è caratterizzata dalla migrazione del nucleo al polo animale e dalla coalescenza di gocce lipidiche e granuli di vitello con conseguente formazione di placche estese ed amorfe. La successiva degradazione del nucleo al polo animale indica la riassunzione della meiosi bloccata allo stadio perinucleolare finale.
	Oocita idratato	Cellula con diametro fino 1200 μm forma irregolare ed aspetto traslucido delle masse amorfe originatesi dalla coalescenza delle inclusioni citoplasmatiche. Aumento di volume della cellula dovuto all'idratazione del citoplasma; assottigliamento ed allungamento del follicolo. La zona radiata presenta un aspetto più compatto.

Fase di crescita oocitaria	Stadio di sviluppo oocitario	Descrizione istologica
Atresia	Follicolo post - ovulatorio atresico	Involucro follicolare vuoto caratterizzato da un lume dalla forma irregolare originariamente occupato dall'oocita. Cellule della granulosa ipertrofiche strettamente connesse alle teca contenente numerosi capillari sanguigni. Struttura in degenerazione sempre più irregolare e contraddistinta da una riduzione del lume centrale e dalla picnosi dei nuclei delle cellule della granulosa. A questo stadio il follicolo post-ovulatorio è parzialmente riassorbito ed è difficilmente distinguibile da un oocita atresico.
	Oocita atresico	Una cellula atresica è caratterizzata dalla degenerazione delle componenti strutturali a cui segue morte cellulare. L'aspetto istologico di oociti atresici varia enormemente in relazione allo stadio di sviluppo raggiunto dalla cellula prima di andare incontro all'atresia. Il processo degenerativo si manifesta con la proliferazione ed ipertrofizzazione delle cellule follicolari e la frammentazione della zona radiata. Nel citoplasma compaiono capillari sanguigni e sono facilmente rilevabili granuli di vitello in degradazione. La distribuzione delle inclusioni citoplasmatiche diventa disordinata, sono difficilmente distinguibili ad uno stato atresico avanzato. L'ultimo stadio degenerativo è rappresentato dalla fagocitosi e dall'assorbimento del vitello da parte delle cellule della granulosa che in seguito alla frammentazione della zona radiata invadono il citoplasma provocando una riduzione delle dimensioni degli oociti. Ciò che resta dopo la fagocitosi è una struttura compatta ben vascolarizzata e circondata da tessuto connettivo denominata corpo atresico .

Nel lavoro non sono stati valutati tutti gli stadi di sviluppo sopradescritti. Gli stadi perinucleare iniziale e finale, gli stadi di prima e seconda vescicola lipidica, gli stadi di primo, secondo e terzo granulo di vitello sono stati unificati rispettivamente nei tre stadi perinucleare, di vescicola lipidica e di granulo di vitello, anche perché una classificazione più dettagliata necessita di uno studio istochimico che consente di identificare le componenti strutturali degli oociti sulla base della loro natura biochimica. Un approfondimento in questo senso sarebbe interessante per ampliare le conoscenze sinora disponibili sugli stadi di maturazione degli oociti di *Epinephelus marginatus* e potrebbe rappresentare uno spunto per studi futuri.
Nel presente studio gli oociti osservati istologicamente sono stati classificati secondo lo stadio di sviluppo e poi quantificati come presenza percentuale dei vari stadi sul totale degli oociti osservati in ogni prelievo. Il valore medio delle conte delle sezioni istologiche, ottenute da ogni campione, sono stati espressi graficamente al fine di valutare la crescita delle popolazioni oocitarie rilevate in ogni campione esaminato.

1.6 FECONDAZIONE ARTIFICIALE

Considerata l'impossibilità di ottenere l'emissione spontanea di uova e di sperma in cattività ed quindi di avere una fecondazione naturale dei gameti nella vasca dove le cernie sono stabulate, è stata effettuata la fecondazione artificiale mediante spremitura. I maschi e femmine sono stati previamente anestetizzati in 2 vasche distinte da 70 litri, alla temperatura di 20±1°C.

Prima di procedere alla spremitura, le femmine sono state sottoposte a controllo dell'aspetto esterno ed a biopsia ovarica. Tutte le femmine la cui biopsia rivelava la presenza di oociti idratati sono state sottoposte a spremitura manuale, esercitando una lieve e continua pressione addominale in senso cranio-caudale (figura 10).

Figura 10. Spremitura della femmina

Ottenute le uova, uno o più maschi sono stati sottoposti a spremitura dell'addome al fine di raccogliere un quantitativo di liquidi seminale sufficiente alla loro fecondazione.

Figura 11. Spremitura del maschio

Contestualmente alla spremitura dei maschio e prima di procedere alla fecondazione, un aliquota del liquido seminale è stata attivata con acqua di mare al fine di valutare la mobilità e la concentrazione degli spermatozoi secondo le modalità già descritte.
Successivamente, la rimanente parte di liquido seminale, diluita in acqua di mare a temperatura ambiente fino a raggiungere il volume di 1 millilitro, è stata utilizzata per la fecondazione delle uova (figura 12).

Figura 12. Attivazione sperma

La fecondazione delle uova con il liquido seminale è avvenuta con la tecnica di fecondazione "a secco", secondo due modalità diverse per tempistica della spremitura dei maschi e delle femmine. Inizialmente la spremitura del maschio è stata eseguita immediatamente dopo quella delle femmine, procedura che comportava la permanenza delle uova all'aria a temperatura ambiente per tutto il tempo necessario per il controllo e l'attivazione dello sperma.
Gli scarsi risultati raggiunti con questa prima modalità, probabilmente riconducibile alla vulnerabilità degli oociti, hanno indotto ad operare riducendo i tempi tra la spremitura delle uova e la fecondazione, mediante la spremitura iniziale dei maschi e la conservazione dello sperma fino al suo utilizzo. In questo caso, lo sperma appena prelevato è stato posto in provettina tipo eppendorf e conservato in ghiaccio a 4°C, fino all'attivazione praticata immediatamente dopo la raccolta delle uova.
Il 23 ed il 24 luglio la fecondazione artificiale si è svolta secondo la prima modalità. Dal 25 luglio in poi le fecondazioni sono avvenute con la seconda modalità.
Il metodo di fecondazione "a secco" consiste nel porre le uova, immerse nel loro liquido celomatico (figura 13), in un contenitore (bacinella o beker), aggiungendo subito dopo 1 millitro di liquido seminale attivato.

Figura 13. Fecondazione artificiale

Il suddetto contenitore è stato poi agitato delicatamente per 5 minuti (figura 14), il tempo ritenuto necessario per la fecondazione delle uova. Di norma, la mobilità degli spermatozoi non supera i 90 secondi dopo l'attivazione, periodo entro il quale la fecondazione deve avere luogo.

Figura 14. Agitazione di uova e sperma

Conclusa la fecondazione artificiale, il contenitore è stato riempito con acqua di mare alla stessa temperatura. Successivamente le uova raccolte sono state passate in volumi di acqua di mare crescenti, fino ad essere definitivamente trasferite in un secchio da 10 litri, con aerazione costante, in attesa della valutazione del tasso di fecondazione e della segmentazione.

1.7 MONITORAGGIO DELLO SVILUPPO EMBRIONALE

Nel corso dell'incubazione, campioni di uova sono stati controllati al fine di determinarne la qualità, di stimare cioè il numero delle uova fecondate e di valutare il relativo stadio di sviluppo embrionale.
La qualità delle uova è stata valutata in base ai seguenti parametri:

- galleggiabilità (le uova fecondate e vitali hanno un peso specifico inferiore all'acqua marina);
- trasparenza (uova morte e/o non fecondate traslucide, opache o biancastre);
- presenza di aree opache più o meno estese ed irregolari (uova abortite);
- presenza, numero e dimensioni di gocce lipidiche (aspetto normale goccia lipidica unica);
- forma (normalmente forma sferica e contorno regolare);
- regolarità della segmentazione durante le prime divisioni cellulari;
- distribuzione del vitello.

Stima iniziale del tasso di fecondazione e controllo delle segmentazione

Dopo 2-3 ore dalla fecondazione, le uova sono state sottoposte ad un periodo di decantazione di qualche minuto (figura 11), a seguito del quale le uova galleggianti sono state raccolte, mentre le uova sedimentate sul fondo sono state scartate. Quindi sono state raccolte con un retino a maglia da 500-600 µm e pesate con bilancia digitale. Il numero totale delle uova è stato determinato indirettamente partendo dal peso, considerando il rapporto di 1.428,57 uova/grammo di uova raccolte (Marino *et al.*2003).
Le uova raccolte sono state controllate per determinare il tasso di fecondazione e per valutare la segmentazione. A questo stadio, le uova fecondate e con sviluppo regolare, presentano normalmente una goccia lipidica in posizione centrale, il tuorlo molto abbondante e concentrato al polo vegetativo ed un disco germinativo in corso di segmentazione al polo animale. Quando la

segmentazione è regolare le cellule appaiono in numero pari, con dimensioni simili tra di loro e con disposizione ordinata. La percentuale di fecondazione è stata stabilita dividendo il numero delle uova in corso di segmentazione per il numero totale delle uova campionate. Tale stima, effettuata mediante osservazione delle uova allo stereo-microscopio, ha anche consentito una valutazione di massima sulla regolarità della segmentazione.
In alcuni casi, si è provveduto anche al controllo delle uova sedimentate, nel tentativo di individuare il motivo del mancato sviluppo. Questi primi controlli sono stati eseguiti presso il centro COISPA, prima del trasferimento delle uova presso la sede IZSAeM di Torre Cerrano.

Controlli dello sviluppo embrionale e della schiusa delle uova

Il progredire dello sviluppo embrionale è stato monitorato anche successivamente all'arrivo delle uova presso l'impianto di Torre di Cerrano, nelle relative vasche di incubazione. Sulla base della stima iniziale del numero, delle conte eseguite in vasca e nel sedimento raccolto durante le operazioni di sifonamento e spurgo della vasca, è stato possibile stimare il numero di uova schiuse. La percentuale di schiusa è stata determinata dividendo il numero di larve schiuse per il numero di uova fecondate inizialmente messe in incubazione. Le uova sedimentate raccolte durante le operazioni di spurgo e sifonamento sono state analizzate al fine di caratterizzare la popolazione delle uova di scarto costituita da uova non fecondate, sovra-mature, morte e/o abortive.
L'esame delle uova abortive raccolte ha permesso di individuare gli stadi in cui è avvenuto il blocco dello sviluppo embrionale.

1.8 STRUTTURE E PROTOCOLLI PER L'ALLEVAMENTO LARVALE

Nell'ambito del presente progetto era stato previsto l'utilizzo dei due impianti a circuito chiuso per l'allevamento larvale di specie ittiche marine disponibili presso la sede di Torre Cerrano (figura 15), nonché di tutte le strutture allestite per la produzione dell'alimento vivo (settore fito-zooplancton). Tutte le strutture sono approvvigionate con acqua marina adeguatamente filtrata e prelevata per mezzo di una presa a mare mobile. Lo scarico avviene periodicamente dopo passaggio in apposite vasche di stoccaggio e decantazione. Una soffiante a canale laterale assicura la disponibilità di aria ai vari settori. Un impianto indipendente fornisce ossigeno puro a tutte le utenze, quando ritenuto necessario. Per maggiori dettagli si rimanda alle relazioni conclusive dei precedenti progetti Docup Pesca richiamati nell'introduzione.

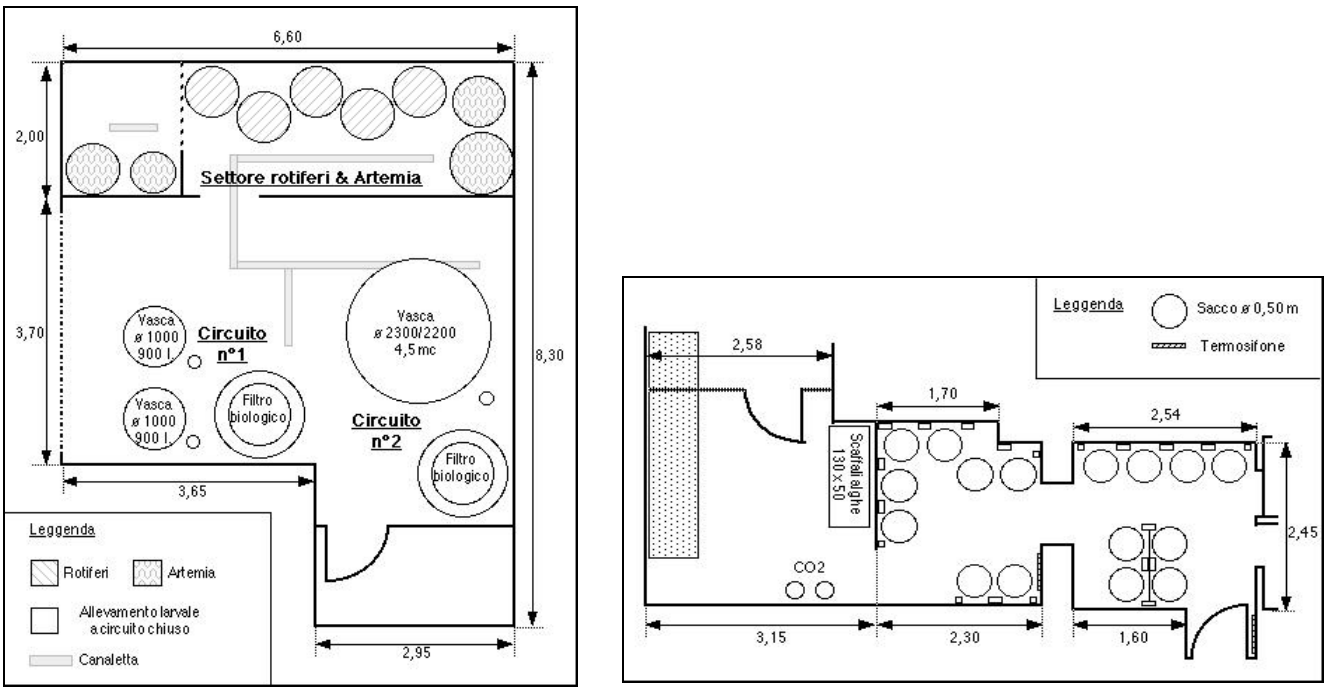


Figura 15. Circuiti chiusi, settore rotiferi-artemia e settore alghe

Strutture per l'allevamento larvale

Nell'ambito del presente progetto, i filtri biologi dei 2 circuiti sono stati avviati a metà maggio. Successivamente, considerata la scarsa quantità di uova ottenuta, solo il circuito n°1 è stato utilizzato. Tale circuito é costituito da n°2 vasche tronco-coniche di 0,9 mc (vasche V1 e V2) collegate a circuito chiuso con una vasca di 1,2 mc che ha la funzione di filtro biologico. Rispetto ai precedenti progetti, parte del materiale filtrante era stato sostituito con un nuovo prodotto dotato di una maggiore capacità di colonizzazione da parte della flora batterica.

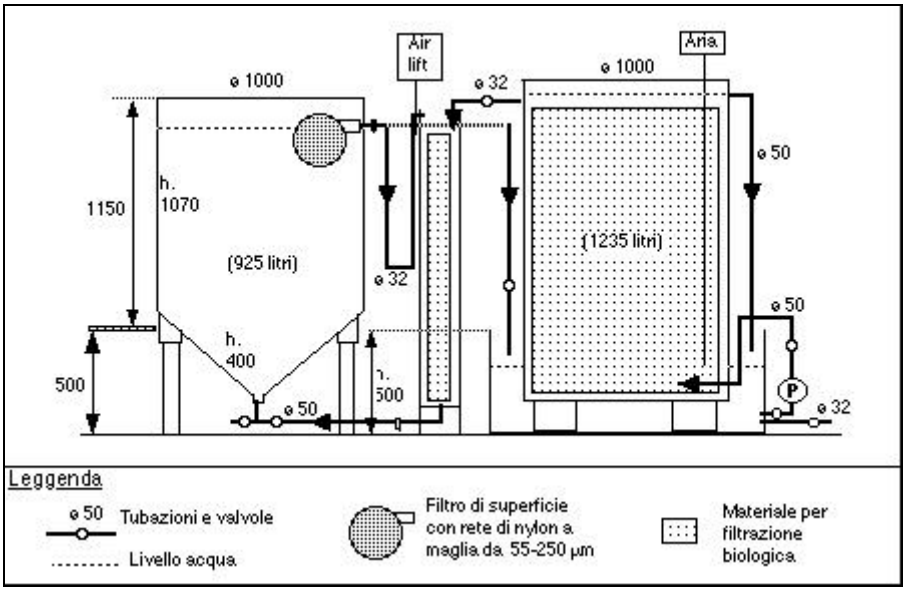


Figura 16. Vasche di'allevamento larvale

La circolazione idrica é assicurata in duplice modo, mediante "air-lift", durante le prime fasi di allevamento larvale e mediante pompa, durante le fasi successive. L'ingresso d'acqua in vasca avviene dal fondo ed é regolabile mediante valvola a sfera. Il livello dell'acqua in vasca é determinato dall'altezza del tubo di sfioro dal quale l'acqua ritorna in filtrazione. Nel circuito n°1, la portata massima di ciascuno air-lift é di 2,5-3 litri/minuto (circolazione parziale), mentre la massima portata di 1,5 litri/secondo (circolazione totale) è assicurata da una pompa di riciclo.
Il circuito è dotato di una pompa di calore in grado di mantenere la temperatura dell'acqua costante. Con un circuito indipendente, l'acqua, prelevata dalla vasca di ripresa nel punto di scarico dal filtro biologico e delle vasche, sottoposta a scambio termico, é immessa nella stessa vasca di ripresa nel punto di prelievo della pompa di riciclo.
Concluso il tentativo di allevamento larvale, i 2 circuiti sono stati definitivamente fermati all'inizio di agosto.

Settore per la produzione algale

Il settore per la produzione algale si compone di un locale per i "piccoli volumi" dove mantenere i ceppi e crescerli fino a volumi di coltura di 5-10 litri e di un locale adiacente dove sono stati collocati 16 supporti per sacchi di coltura di 200-300 litri (figura 12). Tutti gli ambienti sono dotati di termoregolazione in modo da mantenere la temperatura costante su 20-22°C in qualsiasi periodo dell'anno. L'illuminazione, fondamentale per i processi di fotosintesi, é assicurata da neon a "luce naturale".
Le attività di produzione delle alghe sono state avviate a metà maggio e sono state sono interrotte ad inizio agosto, in concomitanza con la conclusione delle prove di allevamento larvale. La produzione ha interessato il ceppo *Nannochloropsis* sp. comunemente utilizzato nell'allevamento larvale delle specie ittiche marine. Tutte le colture sono state effettuate con medium "f/2 modificato. I vari protocolli utilizzati sono rimasti invariati rispetto ai precedenti progetti.

Settore per la produzione di rotiferi ed artemia.

Per la coltura (ciclo di 3 giorni) e l'arricchimento (ciclo di 24 ore) dei rotiferi sono state previste 5 vasche tronco-coniche di 425 litri. Per la schiusa (ciclo di 24 ore) e per l'arricchimento dell'Artemia sono state previste 2 vasche tronco-conica rispettivamente di 240 litri e di 425 litri. L'ambiente é dotato di un impianto di termoregolazione indipendente in grado di mantenere una temperatura costante di 24-25°C.

Le attività di produzione dei rotiferi sono state avviate a metà maggio e sono state sono interrotte ad inizio agosto. Sono stati utilizzati i ceppi *Brachionus rotundiformis* e *Brachionus plicatilis*, il primo proveniente da una avannotteria industriale e il secondo acquistato presso il CCAP (GB). I vari protocolli utilizzati sono rimasti invariati rispetto ai precedenti progetti.

La coltura e l'arricchimento dei rotiferi sono stati eseguiti con diete artificiali INVE le cui composizioni sono descritte nelle tabelle 5 e 6.

Tabella 5. Composizione del "Culture Selco" (INVE)

Analisi indicativa (INVE)			
Proteine	min. 35 %	Vit.A	500.000 IU/kg
Lipidi	min. 15 %	Vit.D	350.000 IU/kg
Ceneri	max. 13 %	Vit.E	3.600 IU/kg
Umidità	5 %	Vit.C	3.000 IU/kg
Σ n-3 HUFA		min. 38 mg/g peso secco	
DHA/EPA		min. 2	

Tabella 6. Composizione del "DHA Protein Selco" (INVE)

Analisi indicativa (INVE)			
Proteine	min. 28 %	Vit.A	1.500.000 IU/kg
Lipidi	min. 29 %	Vit.D3	150.000 IU/kg
Ceneri	max. 13 %	Vit.E	7.200 IU/kg
Umidità	5 %	Vit.C	20.000 IU/kg
Σ n-3 HUFA		min. 75 mg/g peso secco	
DHA/EPA		min. 2	

1.9 MONITORAGGIO DEL CICLO DI ALLEVAMENTO LARVALE

Durante le fasi di allevamento larvale le condizioni in vasca sono state monitorate in continuo, con rilevamento dei seguenti parametri:

- temperatura (°C) (*);
- ossigeno disciolto (mg/litro) (*);
- luce;
- aerazione;
- tipo di circolazione a circuito chiuso (parziale o totale);
- rinnovo giornaliero di acqua in vasca (% volume della vasca).
- rinnovo giornaliero di acqua nella vasca di ripresa del filtro (% volume del filtro).
- nitriti (mg/l NO^{2-}) in vasca di allevamento larvale (*) e nel filtro biologico (*).

I suddetti parametri e tutte le variazioni apportate nella gestione della vasca, sono riportati in allegato 3.
L'indicazione (*) si riferisce alla media giornaliera di 2 o più rilevamenti.

Oltre al rilevamento dei parametri ambientali, sono stati stati eseguiti una serie di controlli in vasca e sono registrati i principali interventi come ricapitolato di seguito:

- stima popolazione larvale;
- controllo e registrazione giornaliera delle mortalità (mortalità effettive e stimate);
- controllo periodico del comportamento in vasca e della vitalità delle larve;
- registrazione delle operazione di pulizia del fondo vasca (sifonamento);
- registrazione delle operazioni di pulizia e sostituzione dei filtri di superficie;

Il monitoraggio della mortalità é avvenuto con diverse modalità. Dal momento della schiusa sono stati effettati quotidianamente lo spurgo (brusca e breve apertura della valvola a sfera che chiude il fondo della vasca) e pulizia del fondo mediante sifonamento. Il sedimento così raccolto è stato osservato al microscopio stimando la presenza di embrioni morti (n°morti/ml). Contemporaneamente, al fine di ottenere un ulteriore riscontro della popolazione rimasta in vasca, si è proceduto con stime della densità larvale mediante valutazioni visive in cono di luce, anche se, considerata l'esigua popolazione larvale presente in vasca, è risultato difficoltoso disporre di indicazioni affidabili.

1.10 MONITORAGGIO DELLA POPOLAZIONE AUTOCTONA DI CERNIA (*Epinephelus marginatus*)

La cernia (*Epinephelus marginatus*) è una specie ampiamente diffusa in tutto il Mediterraneo, nell'Atlantico orientale dalle isole Britanniche al sud Africa e nell'Atlantico occidentale lungo la costa meridionale del Brasile. E' una delle poche specie del genere *Epinephelus* presente in Adriatico, dove abita in acque poco profonde, su fondali rocciosi della fascia costiera, non oltre i 50 metri di profondità. Le catture annue nell'Adriatico sono attualmente stimate sull'ordine di circa 30 tonnellate (Jardas 1996, citato da Glamuzina &t al, 1999); non sono invece disponibili statistiche relative alla pesca professionale, in quanto è una specie catturata da pescatori sportivi, poiché vive in grotte e cavità sottomarine per cui risulta raramente pescata con i sistemi professionali rivolti, in Adriatico, alle specie demersali.

Per il monitoraggio della popolazione autoctona sono state effettuate immersioni nel medio Adriatico, lungo la costa abruzzese, in modo da individuare (visus censis) la presenza di *Epinephelus marginatus* e, ove possibile, campionare qualche esemplare per determinare il pattern genetico del ceppo autoctono di questo areale. La realizzazione di questa fase ha previsto uno studio preliminare finalizzato all'individuazione dei punti di campionamento lungo la costa abruzzese, sulla base degli avvistamenti riferiti dai pescatori sportivi e delle caratteristiche del biotopo marino. Poiché la specie è stata segnalata attorno alle piattaforme di estrazione, è stato chiesto il permesso di prelievo a fini scientifici alle competenti autorità della Capitaneria di Porto.

Le Isole Tremiti fanno parte del Parco Nazionale del Gargano e costituiscono un sito di elezione per il monitoraggio, essendo ripetutamente segnalata qui la presenza di *Epinephelus marginatus.* Purtroppo però l'immersione è stata possibile effettuarla solo nella zona C (riserva parziale), la più antropizzata. Le previste immersioni nella zona A (riserva integrale) e B (riserva generale) non sono state autorizzate dall'Ente Parco (Decreto Interministeriale del 14 Luglio 1989).

Per il monitoraggio della cernia autoctona sono stati, inoltre, allertati i servizi veterinari dei mercati ittici di Giulianova (TE) e Vasto (CH), al fine di reperire eventuali esemplari dal pescato locale e commercializzati lungo la costa.
Le immersioni sono stati eseguite nel periodo compreso tra il 24 aprile e il 28 giugno 2006. Delle 10 immersioni previste ne sono state effettuate 8. In data 11 giugno 2006 è stata realizzata un immersione alle isole Tremiti. Gli esiti delle immersioni effettuate sono riportati nella sezione Risultati (paragrafo 2.4)

1.11 STUDIO GENETICO DEI RIPRODUTTORI: ANALISI DEI MICROSATELLITI

Le analisi genetiche sono state effettuate su 10 cernie *Epinephelus marginatus:* 573, C3F, F5F, F7D, C35, 421, 008, C6E, 30F, B60, tutte selvatiche pescate nel Mar Jonio. Le analisi genetiche sono state effettuate attraverso l'amplificazione di loci microsatelliti.

I microsatelliti sono marcatori nucleari ad eredità biparentale costituiti da corte sequenze di DNA non codificante, in genere unità di 2-6 nucleotidi ripetute più volte, che seguono una trasmissione ereditaria di tipo mendeliano semplice. Il numero di volte in cui tali unità nucleotidiche si ripetono cambia e determina la variante allelica individuale che viene trasmessa da un genitore al figlio. I microsatelliti sono caratterizzati da un alto tasso di mutazione per generazione, vale a dire da un'alta variabilità: caratteristica, questa, che li rende particolarmente utili per lo studio della variabilità genetica di popolazioni isolate di dimensioni ridotte, oppure in piccoli gruppi di riproduttori, nelle quali gli effetti di deriva e di consanguineità potrebbero erodere la variabilità genetica della generazioni da questi derivanti.
In questo progetto sono stati analizzati 7 loci microsatelliti precedentemente utilizzati per studi di popolazione nella specie *Epinephelus marginatus* (De Innocentis et a. 2001). Il DNA è stato estratto dai frammenti di pinna ventrale. Per l'isolamento del DNA sono stati utilizzti kit commerciali per l'estrazione di DNA da tessuti. I microsatelliti sono stati amplificati *via* PCR (Polymerase Chain Reaction) e le reazioni di amplificazione sono state ottimizzate singolarmente per ognuno dei microsatelliti analizzati, seguendo le indicazioni fornite in De Innocentis et a. (2001). La presenza dei prodotti amplificati è stata verificata su gel di agarosio al 2.5%, mentre la separazione delle varianti alleliche è stata effettuata con un sequenziatore automatico capillare ABI prism 310, con lettura a laser. Tutti e sei i marcatori microsatelliti sono stati analizzati in ogni esemplare di cernia. In questo modo, ogni individuo è stato caratterizzato singolarmente da un pattern composito, costituito dai genotipi a tutti e sette i loci.
Il software GENETIX 4.0 (Belkhir et al. 1996) è stato utilizzato per calcolare i parametri classici di variabilità genetica, ovvero le frequenze alleliche e i valori di eterozigosi attesa (He) e osservata (Ho). Deviazioni significative dall'equilibrio di Hardy-Weinberg, espresse come deficit di eterozigoti (Fis, coefficiente di inbreeding), sono state calcolate secondo Weir e Cockerham (1986).

1.12 STUDIO DEI PARAMETRI EMATICI

Gli studi effettuati sinora su sangue di pesce hanno evidenziato problemi legati alle tecniche utilizzate e alla variabilità tra le diverse specie. Il crescente interesse per specie pregiate di acquicoltura, come la cernia, rende necessaria una maggiore attenzione verso metodi di analisi morfologiche e quantitative volte alla descrizione degli elementi corpuscolari del sangue. Il monitoraggio dei valori ematici risulta infatti un valido mezzo diagnostico per determinare lo stato di salute e di benessere, ovvero per valutare i possibili stress causati dal mantenimento in cattività e determinare gli effetti di sostanze tossiche (Alvarez-Pellitero P. *et al.* 1987; Di Marco P. *et al*., 1999; Bittencourt R. *et al*., 2003). E' importante studiare innanzitutto le variazioni ematologiche all'interno di intervalli di riferimento. La presente sperimentazione, condotta sull'intero gruppo di riproduttori di cernia bruna (*Epinephelus marginatus*) stabulati presso l'impianto della Coispa di Torre a Mare (Bari), si prefiggeva lo scopo di analizzare qualitativamente e quantitativamente i diversi parametri ematici, in modo da fornire un quadro di riferimento dettagliato che possa aggiungere utili informazioni su questa specie ed essere una base per ulteriori studi volti all'analisi della correlazione tra parametri ematici e benessere (fish welfare).
Nelle specie ittiche, così come nei mammiferi, le cellule ematiche più numerose sono gli eritrociti. Queste cellule si formano, nei pesci superiori (Osteitti) ai quali appartiene la specie oggetto di studio, nel rene, a partire da precursori detti eritroblasti e svolgono la funzione di trasportare ossigeno per mezzo dell'emoglobina e, in maniera minore, anidride carbonica; a differenza dei globuli rossi dei mammiferi, gli eritrociti di specie ittiche sono nucleati.
La popolazione dei globuli bianchi, coinvolta nei meccanismi di difesa dell'organismo, si divide in due grandi sub-popolazioni: cellule linfoidi o agranulociti e granulociti. Del primo gruppo fanno parte linfociti e monociti, cellule prive di granuli citoplasmatici coinvolte, rispettivamente, nella risposta immunitaria specifica e nell'attivita fagocitaria aspecifica e di secrezione di sostanze a funzione difensiva, come il lisozima.
I linfociti sono le cellule più importanti del sistema immunitario e possono essere classificati in due sotto-classi: linfociti T e B, derivanti rispettivamente dal timo e dal rene; non è tuttavia possibile effettuare una distinzione tra i due suddetti tipi in base a forma e caratteristiche di colorazione e quindi al microscopio ottico.
I granulociti si originano nel rene da precursori detti granuloblasti e devono il loro nome alla presenza di granuli nel citoplasma che assumono colorazioni differenti in base alle quali sono classificati. Esistono tre tipologie di granulociti: neutrofili, eosinofili e basofili: i primi non mostrano

affinità specifica per coloranti acidi o basici e risultano i più abbondanti nel sangue dei pesci, i secondi si colorano preferenzialmente con coloranti acidi, come l'eosina e i terzi con coloranti basici. Il nucleo, eccentrico, può risultare reniforme, bilobato e a volte tondeggiante, sempre di colore rosso-violetto.
I trombociti, assimilabili alle piastrine dei mammiferi, sono le cellule coinvolte nel meccanismo di coagulazione del sangue. La loro origine non è molto chiara, alcuni autori suggeriscono una derivazione dalle stesse cellule dei linfociti, altri sostengono una derivazione dai linfociti stessi; tuttavia il gran numero di trombociti presenti nella milza suggerisce che possa essere questo l'organo da cui si originano.

Esecuzione dei prelievi ematici

I prelievi ematici sono stati effettuati sull'intero gruppo di riproduttori, corrispondenti a 30 animali. I pesci oggetto di studio sono stati trasferiti, uno alla volta, in vaschette da 70 litri e anestetizzati.
Si è proceduto al prelievo utilizzando siringhe eparinate da 2 ml con ago da 23 gauge, cioè avente un diametro tale da evitare la lisi cellulare dovuta al passaggio delle cellule in ago di diametro troppo piccolo. I campioni di sangue sono stati prelevati da vaso branchiale (figura 17). Per ciascun animale sono stati prelevati 1,5 ml di sangue.

Figura17. Prelievo da vaso branchiale

Esecuzione di strisci di sangue

L' esecuzione degli strisci è stata fatta a fresco; infatti, effettuando gli strisci da un campione di sangue posto in provetta con anticoagulante, si possono avere fenomeni di interferenza tra quest'ultimo e l'anestetico, la qual cosa può creare lisi cellulare.
Per ciascun animale sono stati eseguiti 5 strisci; la quantità di sangue utilizzata per i 5 strisci è stata di 50 μl, con un ripARTO DI 10μl per ciascun vetrino.
La procedura operativa seguita è illustrata nella figura 18 .

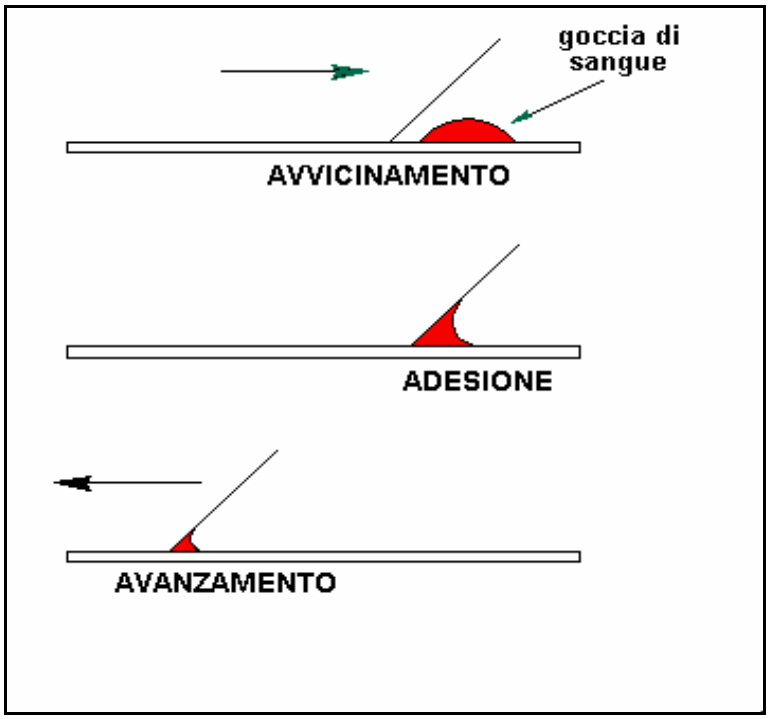


Figura18: Esecuzione di uno striscio di striscio di sangue

Analisi qualitativa delle cellule ematiche e calcolo della formula leucocitaria

L'analisi qualitativa dei diversi elementi cellulari è stata effettuata osservando gli strisci di sangue, colorati con il kit per colorazione Hemacolor (Merck), al microscopio ottico ad un ingrandimento di 100x. Contemporaneamente alla suddetta analisi, è stata determinata la formula leucocitaria per ciascun campione.
La procedura operativa per l'analisi qualitativa delle cellule ematiche e per la determinazione della formula leucocitaria, messa a punto nell'ambito di questo progetto, è riportata dettagliatamente in allegato 7.
La dimensione di ciascun tipo di cellule è stata misurata avvalendosi del programma Leica IM 500.

Analisi quantitativa delle cellule ematiche: conta su emocitometro

La conta degli eritrociti e dei leucociti/trombociti è stata effettuata utilizzando il metodo Blaxhall e Daisley (1973) utilizzando il Dacies Fluid: una soluzione colorante diluente in grado di differenziare i globuli rossi dai bianchi (allegato 8).
Ciascun campione di sangue da analizzare è stato diluito in rapporto 1:200 nella suddetta soluzione, quindi, nel nostro caso, 20μl di sangue in 4 ml di *Dacies fluid* e posto, per la conta, in un emocitometro di Burker (figura 19).
La conta degli eritrociti è stata effettuata contando i globuli rossi presenti all'interno e sul lato superiore e destro di 10 quadrati aventi volume 0,004 mm^3 e moltiplicando il valore medio M per l'area contata e la diluizione, quindi: Eritrociti/mm^3 = M*250*200.
La conta dei leucociti e trombociti è stata effettuata contando i globuli bianchi e i trombociti presenti all'interno e sul lato superiore e destro di 5 quadrati aventi volume 0,1 mm^3 e moltiplicando il valore medio M per l'area contata e la diluizione, quindi: Leucociti+trombociti/mm^3 = M*10*200.

La procedura operativa messa a punto nell'ambito di questo progetto è riportata dettagliatamente in allegato 6.

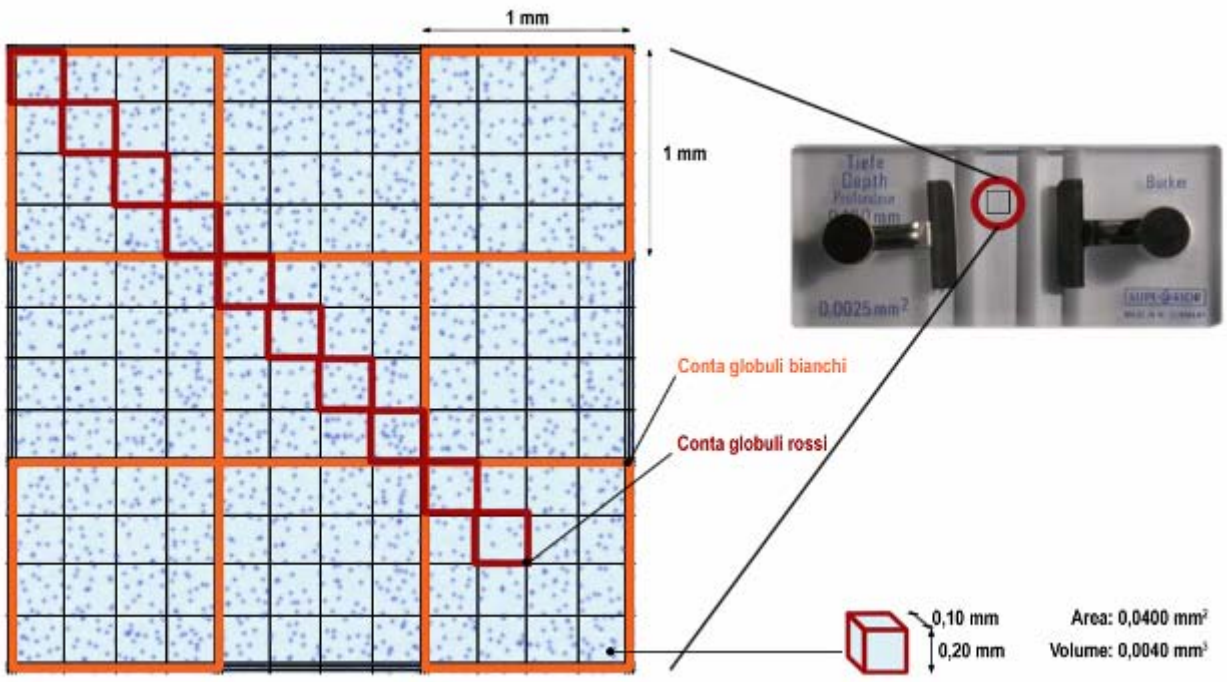


Figura19. Conta su emocitometro

Ematocrito

L'ematocrito è il volume eritrocitario in una quantità di sangue conosciuta, serve quindi a valutare il volume corpuscolare rispetto al volume di sangue totale.
La determinazione dell'ematocrito è stata eseguita immediatamente dopo il prelievo. Il campione di sangue non coagulato è stato messo in una provetta da 1,5 ml e prelevato con un capillare in vetro eparinato della lunghezza di 75 mm e di diametro di 1 mm fino a riempire, per capillarità, i 2/3 della lunghezza di quest'ultimo. Tale operazione è mostrata nella figura 20:

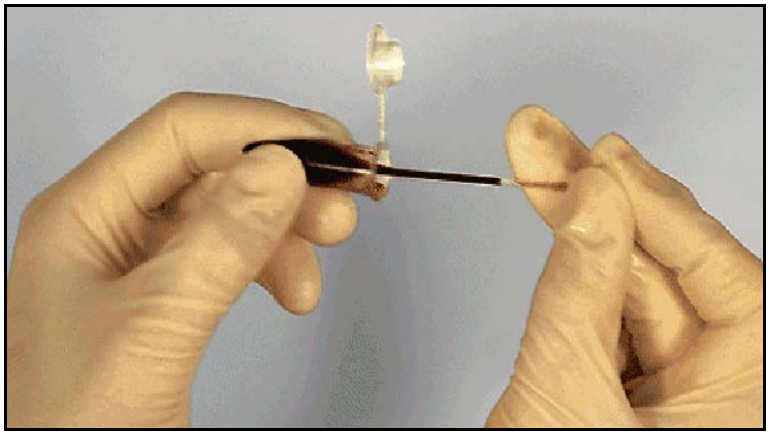


Figura20. Ematocrito: Riempimento del capillare

Ciascun capillare è stato sigillato all'estremità (figura 21) e successivamente centrifugato per 30 min a 3.000 rpm.

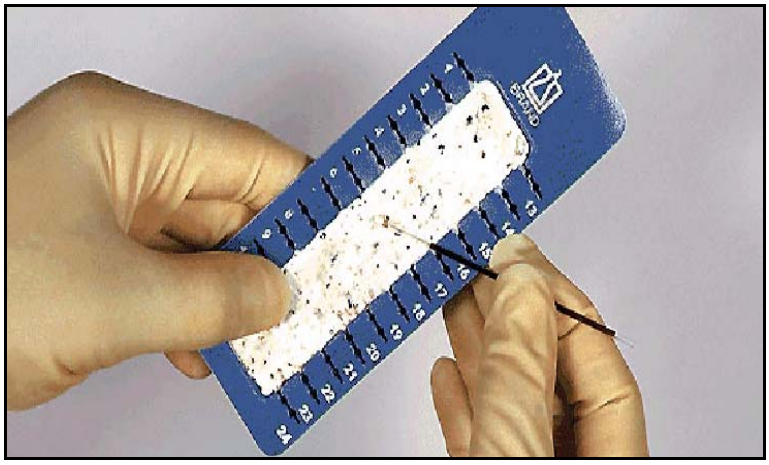


Figura21. Ematocrito: Sigillatura del capillare

Il risultato è stato letto valutando la percentuale del volume del capillare occupato dai globuli rossi.

Emoglobina

La concentrazione di emoglobina totale (g/dl) è stata determinata con un kit commerciale (Sigma, St Louis, Missouri, USA) basato sulla conversione dell'emoglobina in cianmetemoglobina, un composto di colore rosso molto stabile e la sua comparazione spettrofotometrica (540 nm) con una curva di calibrazione standard costruita con emoglobina umana. Per l'analisi si è utilizzato un'aliquota di 5 µl di sangue conservato a -20 °C.

Costanti eritrocitarie

Le costanti eritrocitarie o valori assoluti secondo Dacie consentono la valutazione della biometria eritrocitaria.
Tali valori derivano da tre parametri quantitativi esaminati dall'emogramma e cioè l'emoglobina espressa in g/dl, il valore ematocrito in % ed il numero di globuli rossi per µl.
Questi dati consentono il calcolo delle costanti eritrocitarie e cioè il volume corpuscolare medio (MCV) espresso in fl (femtolitri), la concentrazione emoglobinica corpuscolare media (MCHC) espressa in % e il contenuto emoglobinico corpuscolare medio (MCH) espresso in pg.

MCV

La formula per calcolare l'MCV è la seguente:
MCV= (Ematocrito %/ milioni di emazie µl)*10. Il risultato si esprime in femtolitri (fl).

MCH

L'MCH rappresenta la quantità emoglobinica contenuta in un globulo rosso.
La formula per calcolare l'MCH è la seguente:
MCH= (Emoglobina g/dl/ milioni di emazie µl)*10. Il risultato si esprime in pg.

MCHC

L'MCHC rappresenta la percentuale di emoglobina della massa totale dei globuli rossi ed esprime quindi la concentrazione attuale di emoglobina nel sangue.
La formula per calcolare l'MCHC è la seguente:
MCHC= (Emoglobina g/dl/Ematocrito %)*100.

Analisi ematochimiche

Dopo aver eseguito gli strisci di sangue, i campioni di sangue sono stati trasferiti, dalla siringa, in provette contenenti ciascuna circa 1,5 ml di sangue e sono stati centrifugati a 3.000 rpm per 10 min in modo da separare il siero; successivamente sono state fatte aliquote di siero per le analisi

ematochimiche (350µl) e per quelle ormonali (150µl per l'estradiolo, solo per gli esemplari B60 e F5F, e 300µl per il cortisolo)e i campioni sono stati congelati ad una temperatura di –20°C.
Dopo la scongelamento si è verificato un problema di gelificazione del siero, si è quindi proceduto a pestellare lo stesso con un puntale da micropipetta in modo da recuperare parte del siero liquido. Il suddetto fenomeno avviene sovente nei pesci, a causa di proteine plasmatiche che tendono a gelificare e intrappolare il resto del materiale in un ammasso gelatinoso (figura 22)

Figura 22. Siero gelificato

I parametri ematici rilevati per ogni campione sono stati:

- GOT (AST);
- GPT (ALT);
- Albumina;
- Urea;
- Colesterolo;
- Glucosio;
- Proteine totali.

Il GOT (Transaminasi glutammico-ossalacetico) o AST (aspartato amino-trasferasi) è un'enzima presente nel fegato e viene analizzato per studiare le condizioni di questo organo e lesioni del muscolo cardiaco.
Il GPT (Transaminasi glutammico-piruvica) o ALT (alanino amino-trasferasi) è un'enzima che dà l'esatta valutazione della gravità dell'alterazione del fegato.
L' azotemia/ Urea (BUN) è il tasso della quantità di azoto nel sangue ed indica la funzionalità dei reni; valori diversi da quelli di riferimento indicano una imperfetta depurazione del sangue da parte dei reni.
L'albumina è una proteina prodotta nel fegato. Valori superiori a quelli ritenuti normali possono essere determinati da disidratazione.
Il colesterolo è un grasso che può avere origina dal cibo o dal fegato. La ricerca di questa sostanza nel sangue aiuta a valutare i grassi nell'organismo.
Le proteine totali indicano lo stato di idratazione ed apportano informazioni ulteriori su fegato, reni e eventuali infezioni.
Le analisi sui suddetti parametri sono state eseguite mediante strumenti e metodi della Ilab 650. Le tecniche analitiche sono quelle utilizzate tradizionalmente in campo umano: colorimetrico (albumina, proteine totali), cinetico (GOT, GPT), enzimatico (azotemia, glucosio) ed enzimatico-colorimetrico (colesterolo).
I sieri di 18 animali sono stati analizzati singolarmente. Nei casi in cui il siero è risultato insufficiente, sono state unite aliquote di più campioni appartenenti allo stesso gruppo individuato in base alle caratteristiche del soggetto da cui sono stati prelevati.

Sono stati individuati 4 gruppi differenti:

- Femmine trattate con ormoni: C6E, B60, F5F, 30F, 573;
- Maschi : B5E, E16, 87C;
- Femmine grandi non trattate (peso>3kg): 56C, F71, C3F, F7D, E5F, 834, C35, 421, 008;
- Femmine piccole non trattate (peso<3kg): F38, 426, 869, B33, D25, 052, 448, 57D, C66, 978, F53, 127, F67.

Sono stati analizzati complessivamente 23 campioni:

1	F67	13	008
2	E16	14	56C
3	B5E	15	834
4	87C	16	F38
5	C6E, B60, F5F	17	426
6	30F, 573	18	869
7	F71	19	B33
8	F7D	20	D25, 052, 448
9	421	21	57D, C66
10	C3F	22	978
11	E5F	23	F53, 127
12	C35		

Dosaggio dell'estradiolo

La valutazione della quantità di estradiolo è stata effettuata sul siero di due esemplari di cernia: B60 e F5F prima e dopo il trattamento ormonale rispettivamente con GnRH e LHRH e su 4 campioni di siero provenienti dai 4 gruppi già individuati per le analisi ematochimiche, corrispondenti a:

- Femmine trattate con ormoni: C6E, B60, F5F, 30F, 573;
- Maschi : B5E, E16, 87C;
- Femmine grandi non trattate (peso>3kg): 56C, F71, C3F, F7D, E5F, 834, C35, 421, 008;
- Femmine piccole non trattate (peso<3kg): F38, 426, 869, B33, D25, 052, 448, 57D, C66, 978, F53, 127, F67.

Questi accertamenti avevano lo scopo di fornire un riscontro di valori di estradiolo prima e dopo il trattamento di stimolazione ormonale, di valutare la differenza con femmine non trattate e, nel caso del gruppo dei maschi, per effettuare un confronto, considerando che l'estradiolo nel maschio è prodotto dal catabolismo degli androgeni.

Il dosaggio dell'estradiolo è stato eseguito mediante il kit radioimmunologico (RIA) per la determinazione in vitro dell'estradiolo in siero e plasma umani ESTR-CTK-4 (DiaSorin). Campioni, calibratori e controlli vengono incubati assieme ad estradiolo marcato con I^{125} in provette sensibilizzate con un anticorpo anti- estradiolo. Dopo l'incubazione, le provette vengono aspirate e contate in un contatore gamma. La radioattività legata alle provette è inversamente proporzionale alla concentrazione di estradiolo in campioni e calibratori. Si traccia una curva di taratura e si calcolano per interpolazione sulla curva le concentrazioni dei campioni.

La sensibilità del kit ESTR-CTK-4 va dai 0 ai 5.000 pg/ml; per valori superiori è necessario effettuare una diluizione. Non sono state effettuate diluizioni per i 3 campioni provenienti dal gruppo dei maschi e da quelli di femmine grandi e piccole non trattate per i quali i valori attesi erano bassi, mentre per campioni B60, F5F e gruppo femmine trattate è stata eseguita una diluizione di 1:20.

Dosaggio del cortisolo

La valutazione della quantità di cortisolo è stata effettuata, sul siero di tutti i 30 esemplari di cernia bruna stabulati presso la Coispa, mediante kit EIA (Assay Designs Correlate-EIA™ Cortisol kit) per la determinazione del cortisolo nei fluidi biologici.

La procedura operativa seguita consta di diverse fasi:

Trattamento del campione

- Prelevare 50 µl di siero;
- Aggiungere 1 ml di etere etilico,
- Vortexare e centrifugare;
- Prelevare lo strato etereo superiore e porlo in una vial;

- Ripetere l'estrazione altre 2 volte raccogliendo gli strati eterei nella stessa vial (volume totale=3ml);
- Prelevare 225 µl dello strato etereo;
- Evaporare;
- Riprendere il residuo con 300 µl di assay buffer;
- Vortexare.

Campione con aggiunta standard

Come controllo qualità, si è utilizzato un campione di cernia negativo fortificato con 200 ppb di cortisolo.

Test EIA

I reagenti devono stare a temperatura ambiente per 30 min prima dell'uso.

Preparazione degli standard

Il kit fornisce cortisolo standard a 100.000 pg/ml (100 ng/ml)

Standard 1(10 ng/ml): prelevare 100 µl dello standard a 100 ng/ml e diluire con 900 µl di assay buffer.

Standard 2(5ng/ml): prelevare 500 µl dello standard 1 e diluire con 500 µl di assay buffer.

Standard 3 (2.5 ng/ml): prelevare 500 µl dello standard 2 e diluire con 500 µl di assay buffer.

Standard 4 (1.25 ng/ml): prelevare 500 µl dello standard 3 e diluire con 500 µl di assay buffer.

Standard 5 (0.625 ng/ml): prelevare 500 µl dello standard 4 e diluire con 500 µl di assay buffer.

Wash buffer

Diluire il wash buffer concentrato prima dell'uso. Diluire 5 ml di wash buffer concentrato con 95 ml di H_2O distillata. L'assay buffer, il coniugato, l'anticorpo, il substrato e la stop solution sono già pronti all'uso, il wash buffer diluito può essere conservato a temperatura ambiente per 3 mesi.

Procedimento del kit

- Depositare 100 µl di assay buffer (bianco), 100 µl degli standard, 100 µl dei campioni;
- Depositare 50 µl di Coniugato;
- Depositare 50 µl di Anticorpo;
- Incubare la piastra a temperatura ambiente per 2 ore su uno shaker a 500 rpm;
- Scaricare il contenuto della piastra e aggiungere 400 µl di wash buffer diluito;
- Fare altri 2 lavaggi;
- Eliminare bene il wash buffer;
- Aggiungere 200 µl di substrato. Incubare a temperatura ambiente per 1 ora;
- Aggiungere 50 µl di stop solution. Leggere la piastra immediatamente a 405 nm.

2. RISULTATI E CONSIDERAZIONI

2. RISULTATI E CONSIDERAZIONI

2.1 LA MATURAZIONE DEGLI OOCITI: RISULTATI DEI CONTROLLI A FRESCO E DEGLI ESAMI ISTOLOGICI

Tutti i trattamenti eseguiti sono riassunti nella tabella 1 ed hanno interessato 5 femmine e 3 maschi. Le femmine trattate sono state in ordine cronologico la C6E, la B60, la 573, la F5F e la 30F, mentre i 3 maschi trattati sono stati il B5E, l'E16 e l'87C. Gli animali stimolati durante la prova sono stati complessivamente 8, di cui 3 maschi e 2 femmine con LHRHa e 3 femmine con GnRHa.
Il presente paragrafo riporta per ciascuna delle 5 femmine trattate lo sviluppo degli oociti dopo trattamento e l'esito dei tentativi di spremitura.

Femmina C6E

La femmina C6E, proveniente dalla vasca B (18 ± 0,5°C), presentava nello screening del 10 luglio degli oociti di diametro compreso tra 185 e 645 μm (media di 418 μm); gli oociti prelevati si mostravano a due stadi di sviluppo: il 71,8% degli oociti osservati presentava un diametro tra 185 e 460 μm, i rimanenti oociti (28,2%), più maturo, avevano un diametro tra 530 e 645 μm. Nessuno degli oociti osservati al momento del trattamento aveva iniziato il processo di maturazione finale.
La femmina C6E è stata pertanto stimolata in data 11 luglio con GnRHa alla dose di 42,5 μg/Kg di peso vivo.
Dopo il trattamento, l'animale è stato sottoposto a 5 controlli e 4 tentativi di spremitura come riportato in Tabella 7.

Tabella 7. Femmina C6E - risposta ai trattamenti ormonali

Ore dopo Trattamento	Operazione svolta	n° oociti prelevati	Diametro oociti Vitellogenici	Diametro oociti Idratati	Esito della spremitura
-	Monitoraggio preliminare	32	185-645 μm	-	n.e.*
0	Trattamento 42,5 μg GnRHa/kg	-	-	-	n.e.
48	Controllo n°1	1	320 μm	-	n.e.
118	Controllo n°2	48 + 2	230-690 μm (n°48)	735-780 μm (n°2)	n.e.
171	Controllo n°3 Prova di spremitura	30	-	775-960 μm	Esito negativo
191	Controllo n°4 Prova di spremitura	Alcuni	-	n.d.°	Esito negativo
218	Controllo n°5 Prova di spremitura	Alcuni	-	n.d.	Esito negativo
243	Prova di spremitura	-	-	-	Esito negativo

*n.e.=non effettuata; °n.d.=non determinato

Il primo controllo è stato effettuato a 48 ore dal trattamento ed è risultato il prelievo piuttosto difficoltoso di un unico oocita vitellogenico di 320 μm di diametro.
Nel secondo controllo, svolto dopo 118 ore dal trattamento, il prelievo ovarico si è svolto agevolmente. Sono stati prelevati oociti di diametro compreso tra 230 e 780 μm (media di 416 μm), con due popolazioni di taglia diversa, come evidenziato nello screening iniziale. L'88% degli oociti prelevati presentava un diametro tra 230 e 506 μm, i rimanenti (12%), più maturi, un diametro tra 575 e 782 μm. Anche se la media dei diametri rimane invariata, si è osservato uno spostamento dei due gruppi nel senso di un maggior sviluppo. Inoltre 2 oociti sono risultati al termine del processo di maturazione, in fase di idratazione (diametri di 735 e 780 μm).

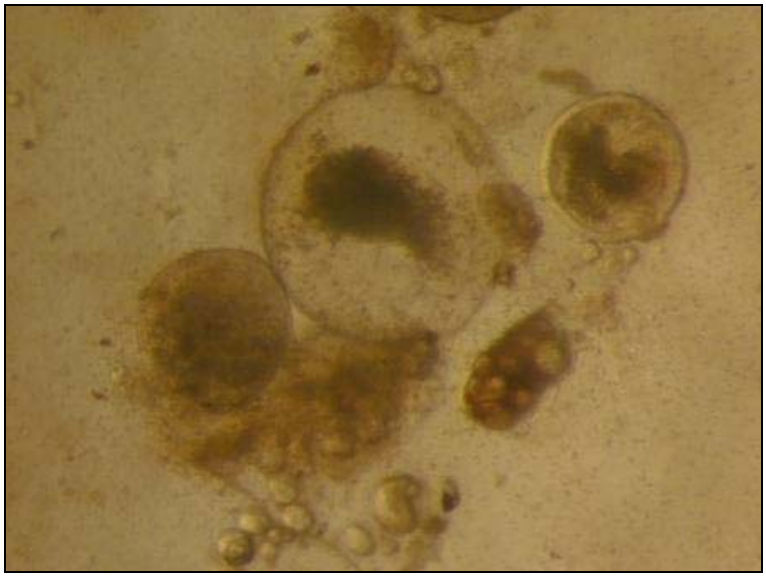
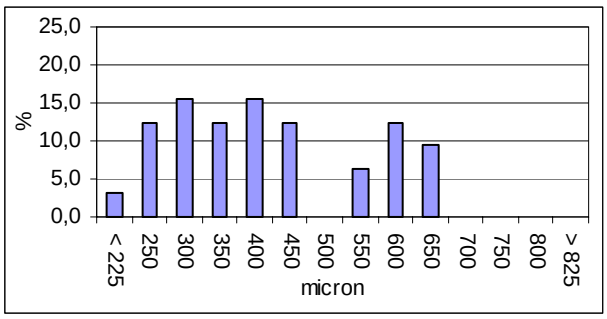


Figura 23. Oociti a diversi stadi di vitellogenesi

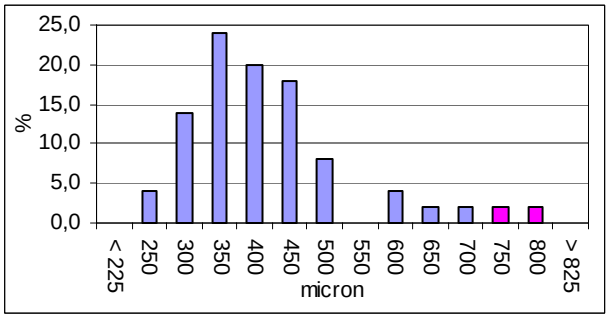
Nel terzo controllo, effettuato 171 ore dopo il trattamento, tutti gli oociti prelevati sono risultati idratati, di cui 5% di oociti regolari ed 95 % di oociti sovra-maturi in parziale disfacimento come illustrato in figura 24. I successivi controlli effettuati dopo 191 e 218 ore dal trattamento hanno evidenziato un quadro identico al precedente, con la maggior parte degli oociti in sovra-maturazione. In tutti e tre i controlli, il tentativo di spremitura ha avuto esito negativo per la presenza di un tappo ovarico.

Figura 24. Oociti sovra-maturi

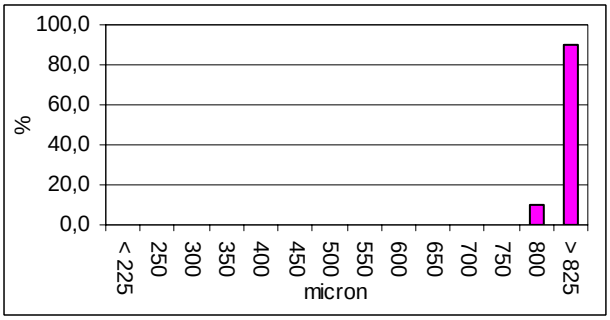
Si riportano di seguito i grafici con la distribuzione del diametro degli oociti prima del trattamento, a 118 e 171 ore post-trattamento.



Screening



118 ore post-trattamento



171 ore post-trattamento

Figura 25. Diametro degli oociti della femmina C6E

Dall'analisi della frequenza del valore di diametro osservato, si desume una graduale crescita dei vari gruppi di oociti fino alla maturazione finale, idratazione ed ovulazione dei più maturi. Il trattamento con GnRHa mediante impianto EVAc, effettuato in una femmina con gonadi in avanzato stadio di vitellogenesi, ha avuto esito positivo sulla maturazione finale degli oociti e sull'ovulazione. Tuttavia, l'assenza di qualsiasi rigonfiamento dell'addome fa supporre l'ovulazione di quantità molto ridotte di oociti.
Dai controlli effettuati 118 e 171 ore post-trattamento, si evince che la prima ovulazione è avvenuta, seppure in modo lieve, dopo circa 110 ore dal trattamento, mentre una seconda ovulazione probabilmente più consistente dovrebbe essersi verificata dopo 130-140 ore dal trattamento. Nei controlli svolti dopo 171, 191 e 218 ore dal trattamento, la presenza di alcuni di oociti non sovra-maturi potrebbe indicare ulteriori piccole ovulazioni. In sintesi si possono ipotizzare da 2 a 5 ovulazioni successive, avvenute a 24 ore d'intervallo l'una dall'altra.
Purtroppo, l'assenza di rigonfiamento addominale inoltre ha lasciato erroneamente supporre che la gonade si trovasse in fase non avanzata di maturazione, questo ha determinato uno slittamento di 24 ore nello svolgere il terzo controllo. Tale ritardo e quindi la mancata spremitura nel momento opportuno sono probabilmente stati all'origine della formazione di un tappo ovarico che ha segnato negativamente l'esito delle spremiture successive e che ha precluso l'ipotesi di ulteriori interventi.
Considerato l'avanzato stadio di maturazione degli oociti al momento del trattamento è probabile che si sarebbe raggiunto lo stesso risultato con una semplice iniezione di LHRHa o di GnRHa. Si può quindi concludere che l'utilizzo di impianti EVAc a lento rilascio è più indicato nel caso di femmine ad uno stadio di maturazione ovarica più arretrato.

Femmina B60

La femmina B60 ha presentato nel monitoraggio iniziale svolto il 10 luglio oociti di diametro compreso tra 205 e 415 μm (media di 291 μm), è stata stimolata il 13 luglio con GnRHa alla dose di 49,2 μg/Kg pv. Nel monitoraggio iniziale la popolazione degli oociti prelevati ha evidenziato un gruppo di oociti in vitellogenesi, ed un gruppo di oociti pre-vitellogenici. Nessuno degli oociti osservati al momento del trattamento aveva iniziato il processo di maturazione finale.

Dopo il trattamento, l'animale è stato sottoposto a 9 controlli e 5 tentativi di spremitura come riportato in Tabella 8.

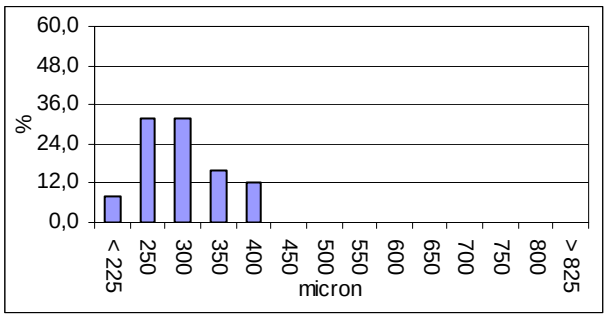
Tabella 8. Femmina B60 - risposta ai trattamenti ormonali

Ore dopo Trattamento	Operazione Svolta	n° oociti prelevati	Diametro oociti Vitellogenici	Diametro oociti Idratati	Esito della spremitura
-	Monitoraggio preliminare	25	205-415 µm	-	n.e.*
0	Trattamento 49,2 µg GnRHa/kg	-	-	-	n.e.
70	Controllo n°1	50	185-345 µm	-	n.e.
123	Controllo n°2	60	205-435 µm	-	n.e.
144	Controllo n°3	50	185-530 µm	-	n.e.
170	Controllo n°4	50	205-460 µm	-	n.e.
195	Controllo n°5	50	255-460 µm	-	n.e.
216	Controllo n°6 Prova di spremitura	9	405-445 µm (n°3)	775-850 µm (n°6)	Esito negativo
239	Prova di spremitura	-	-	-	1-2 g. (parte Lotto 1)
266	Prova di spremitura	-	-	-	1-2 g. (parte Lotto 2)
288	Controllo n°7 Prova di spremitura	12	-	690-830 µm	Esito negativo
311	Controllo n°8 Prova di spremitura	61	260-555 µm (n°50)	850-925 µm (n°11)	1-2 g. (parte Lotto 4)
360	Controllo n°9	50	-	555-575 µm	-

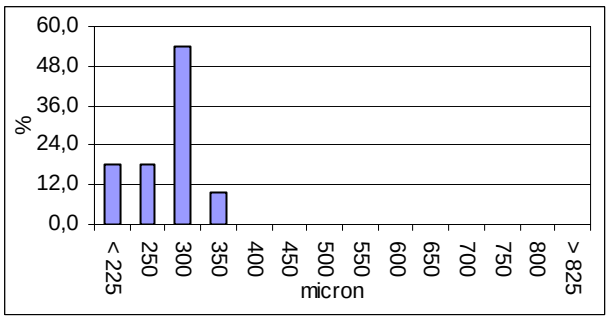
***n.e.=non effettuata**

Nei primi 5 controlli effettuati da 70 a 195 ore dopo il trattamento, risulta una progressiva e lenta maturazione degli oociti con diametri medi di 270, 300, 311, 351 e 362 µm in costante aumento.
Nel sesto controllo, effettuato 216 ore dopo il trattamento, risulta la presenza dei primi oociti che hanno completato il processo di maturazione finale e che si trovavano in fase di idratazione (diametri di 775-850 µm). Dal sesto controllo in poi, la presenza di oociti idratati risulta costante. Dalla prima ovulazione avvenuta a circa 210 ore post-trattamento al settimo controllo svolto 288 ore post-trattamento, gli oociti prelevati sono risultati maturi ed idonei ad eventuali prove di fecondazione artificiale. Successivamente, 80% degli oociti del controllo effettuato 311 ore post-trattamenti sono risultati sovra-maturi, mentre la totalità degli oociti del controllo dopo 360 ore dal trattamento sono risultati in fase di riassorbimento.

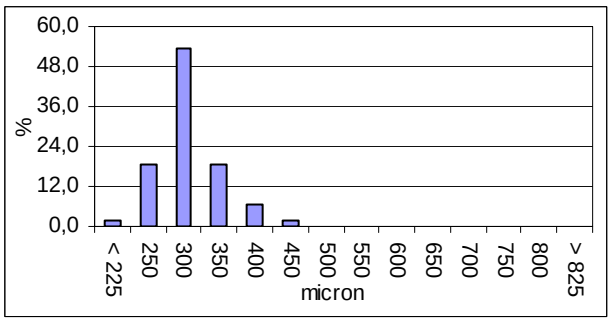
Si riportano di seguito i grafici con la distribuzione del diametro degli oociti prima del trattamento, a 70, 123, 144, 170, 195, 216, 288, 311 e 360 ore post-trattamento.



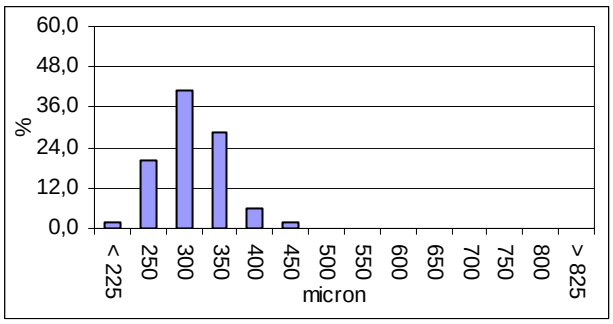
Screening



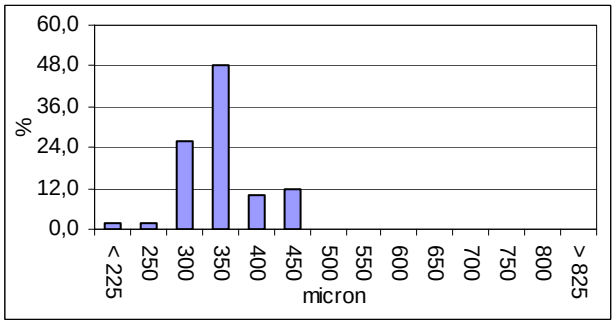
70 ore post-trattamento



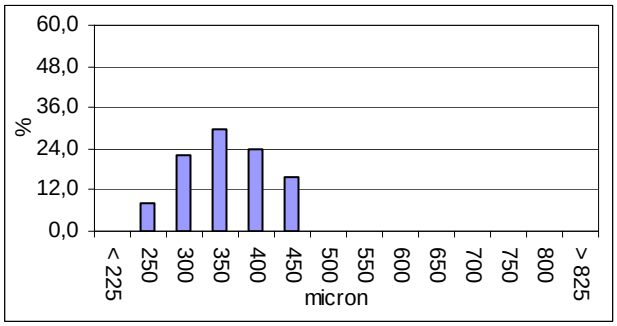
123 ore post-trattamento



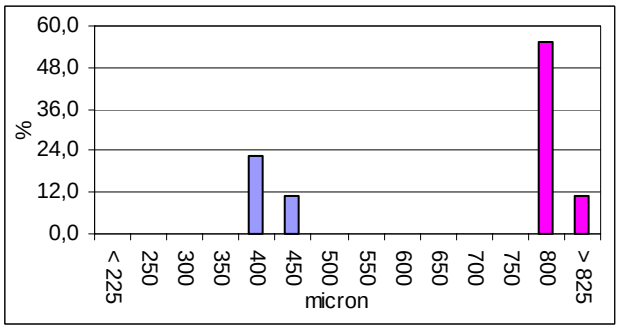
144 ore post-trattamento



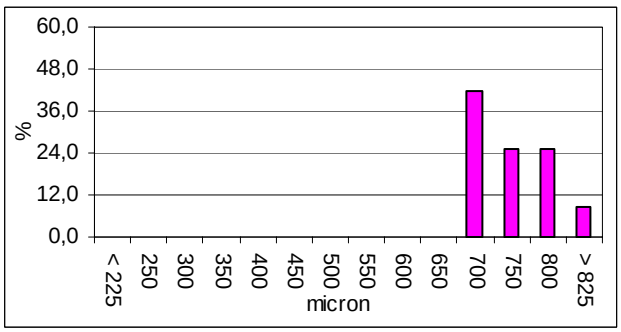
170 ore post-trattamento



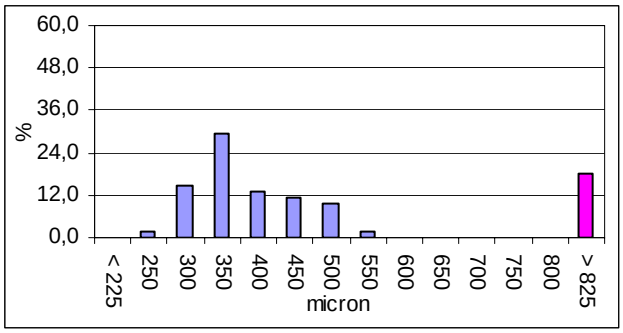
195 ore post-trattamento



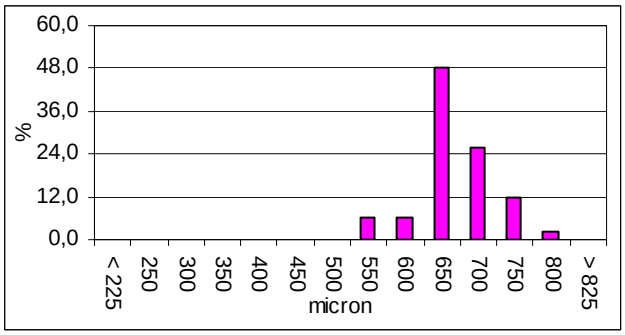
216 ore post-trattamento



288 ore post-trattamento



311 ore post-trattamento



360 ore post-trattamento

Figura 26. Diametro degli oociti della femmina B60

Dall'analisi delle distribuzioni del diametro degli oociti si osserva la graduale crescita dei vari gruppi di oociti fino alla maturazione finale, idratazione ed ovulazione dei più maturi. Tale processo sembra anche proseguire dopo la prima ovulazione. Di conseguenza, si può affermare che il trattamento con GnRHa mediante impianto EVAc, in una femmina in uno stadio di vitellogenesi medio, ha avuto esito positivo sulla maturazione finale degli oociti e sull'ovulazione. Tuttavia, come per la femmina precedente, l'assenza di qualsiasi rigonfiamento dell'addome fa supporre l'ovulazione di quantità molto ridotte di oociti.
Dal sesto controllo effettuato 216 ore post-trattamento, si evince che la prima ovulazione è probabilmente avvenuta dopo circa 210 ore dal trattamento. Considerando un intervallo di circa 6 ore dopo l'ovulazione, nel quale le uova devono essere raccolte e possono essere fecondate con successo, e il fatto che le uova raccolte per 4 giorni consecutivi siano risultate morfologicamente idonee, si può ipotizzare che diverse ovulazioni siano avvenute nel periodo tra 210 e 288 ore post-trattamento. Inoltre, la presenza di un 20% di oociti non sovra-maturi nel controllo svolto dopo 311 ore dal trattamento potrebbe indicare un'ulteriore lieve ovulazione. In sintesi si possono ipotizzare da 4 a 5 ovulazioni successive, avvenute a 24 ore d'intervallo l'una dall'altra.
Dal momento della prima ovulazione avvenuta a circa 210 ore dal trattamento l'animale è stato sottoposto a 5 prove di spremitura di cui 3 hanno dato esito positivo. Da queste, effettuate a 239 ore, 266 ore e a 311 ore post-trattamento, sono stati ottenuti scarsi quantitativi di uova pari a 1-2 grammi per ciascuna spremitura. Come per la prima femmina trattata (C6E), l'esito del trattamento, anche se positivo, rimane caratterizzato dalla scarsa proporzione di oociti interessati dal processo di maturazione finale ed idratazione. Ciò si evidenzia, sia dall'assenza di rigonfiamento addominale, sia dalla scarsa quantità di uova ottenute.

Risultato degli esami istologici

Nei mesi successivi parte delle biopsie ovariche effettuate e conservate sono state analizzate mediante tecniche istologiche al fine di osservare le strutture cellulari durante la maturazione ed indagare i problemi riscontrati, riferiti nel paragrafo precedente.
I risultati degli esami istologici effettuati sulla femmina B60 sono riportati nella tabella 9

Tabella 9. Presenza percentuale di oociti ai diversi stadi maturativi nella femmina B60

Ore dopo Trattamento	Controllo	Fase di pre-vitellogenesi			Fase di vitellogenesi		Fase di maturazione	Fase di atresia	
		Stadio oogoni	Stadio nucleolo cromatina	Stadio perinucleare	Stadio goccia lipidica	Stadio granulo di vitello	Stadio oociti maturi	Follicolo atresico	Oociti atresici
-	Monitoraggio prima del trattamento	0 %	5 %	50 %	30 %	11 %	0 %	0 %	4 %
70	Controllo n°1	0 %	9 %	31 %	34 %	12 %	0 %	0 %	9 %
123	Controllo n°2	0 %	5 %	32 %	28 %	16 %	0 %	0 %	19 %
170	Controllo n°4	0 %	3 %	29 %	36 %	14 %	0 %	0 %	18 %
195	Controllo n°5	0 %	5 %	17 %	35 %	16 %	0 %	0 %	27 %
311	Controllo n°8	0 %	3 %	17 %	23 %	30 %	2 %	5 %	20 %

L'esame istologico delle biopsie ottenute dalla femmina B60 prima della stimolazione ormonale ha evidenziato, come massimo stadio di maturazione, la presenza di oociti allo stadio di granulo di vitello, con corrispondente stadio di maturazione ovarica F3 seconda la scala di Marino *et al.* (2001) riportata in tabella 3. All'osservazione delle dette biopsie, l'animale presentava prima del trattamento una struttura ovarica caratterizzata da 55 % di oociti pre-vitellogenici, 41 % di oociti vitellogenici e 4 % di oociti atresici. Dopo 70 ore dal trattamento le biopsie esaminate hanno rilevato la presenza nell'ovario di 40 % di oociti pre-vitellogenici e di 46 % di oociti vitellogenici. Il restante 9 % è risultato essere costituito da oociti atresici. Al controllo successivo, effettuato 123 ore dopo il trattamento, l'esame istologico di biopsie ovariche ha rilevato una struttura ovarica costituita da 37 % di oociti pre-vitellogenici posti nel tessuto fra numerosi oociti vitellogenici e oociti atresici, in proporzioni rispettivamente pari al 44 % e al 19 % degli oociti esaminati. A 170 ore la struttura ovarica è risultata caratterizzata da 32 % di oociti pre-vitellogenici e da 50 % di oociti vitellogenici. Il restante 18 % è risultato costituito da oociti atresici. Al controllo successivo, effettuato 195 ore dopo il trattamento, le biopsie esaminate sono caratterizzate dalla presenza di 22 % di oociti pre-vitellogenici, da 51 % di oociti vitellogenici e da 27 % di oociti atresici. L'esame istologico di biopsie prelevate dopo 311 ore dal trattamento hanno rilevato la presenza nell'ovario di 20 % di oociti pre-vitellogenici e di 53 % di oociti vitellogenici. Il resto era costituito da 2% di oociti maturi, da 5% di follicoli post-ovulatori atresici e da 20 % di oociti atresici.
Le percentuali degli oociti ai vari stadi di sviluppo osservati ad ogni campionamento, sono riportati graficamente nel grafico (Figura 27).

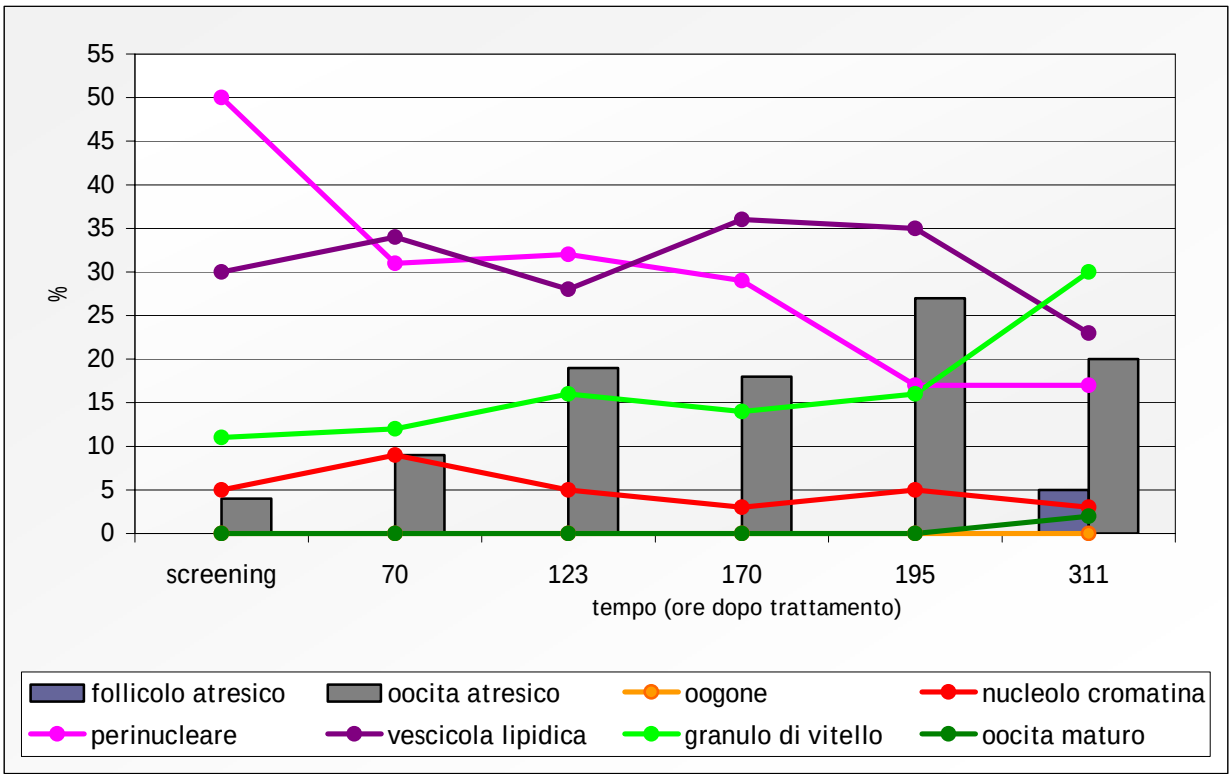


Figura 27. Stadi di maturazione degli oociti della femmina B60

L'esame istologico di biopsie ovariche e l'analisi della distribuzione del diametro degli oociti prelevati ad ogni controllo hanno rilevato la presenza nell'ovario della femmina B60 di gruppi di oociti a differenti stadi di sviluppo che maturano contemporaneamente all'interno del gruppo e successivamente un gruppo rispetto all'altro confermando che lo sviluppo ovarico della specie *Epinephelus marginatus* avviene secondo un modello a gruppo sincrono come delineato da Tyler &t al. (1996) e Marino &t al. (2003).

I risultati istologici evidenziano nella femmina B60 una graduale e lenta maturazione degli oociti esaminati fino allo stadio di vitellogenesi iniziale come confermato dalla progressiva diminuzione della quantità degli oociti allo stadio perinucleare (dal 50 % al 17 %) e dall' incremento degli oociti allo stadio di vescicola lipidica risultati essere in costante aumento nel corso dei controlli (dal 30 % al 35 %). Gli oociti vitellogenici osservati durante i controlli risultano essere costituiti principalmente da oociti allo stadio di vescicola lipidica e da una ridotta quantità di oociti allo stadio di granulo di vitello risultati essere all'incirca del 15 % ad ogni controllo.
Gli oociti atresici risultati essere pari al 4 % degli oociti esaminati al momento del trattamento aumentano progressivamente nei controlli successivi fino ad attestarsi intorno al 20 % nell'ultimo controllo effettuato dopo 311 h dal trattamento. Essi risultano essere costituiti da oociti degenerati a diversi stadi di sviluppo. Gli oociti atresici allo stadio di granulo di vitello risultano essere la maggioranza fino a 170 ore dal trattamento. Dopo 195 ore dal trattamento tutti gli oociti atresici osservati risultano essere ad uno stadio di post-vitellogenesi.
Dall'analisi dei risultati si desume una regolare maturazione di tutti i gruppi di oociti esaminati fino allo stadio di vescicola lipidica ed un blocco della maturazione allo stadio successivo per la maggior parte dei gruppi, blocco confermato dalla scarsa quantità di oociti allo stadio di granulo di vitello osservata ad ogni controllo e dalla presenza di numerosi oociti atresici in fase di vitellogenesi avanzata rilevati nel corso dei controlli. Tra gli oociti che hanno proseguito lo sviluppo oltre questo stadio pochi hanno raggiunto la maturazione finale come confermato dall'assenza di oociti maturi nelle biopsie osservate e dalla presenza di oociti atresici allo stadio di post-vitellogenesi rilevati nel corso degli ultimi due controlli.

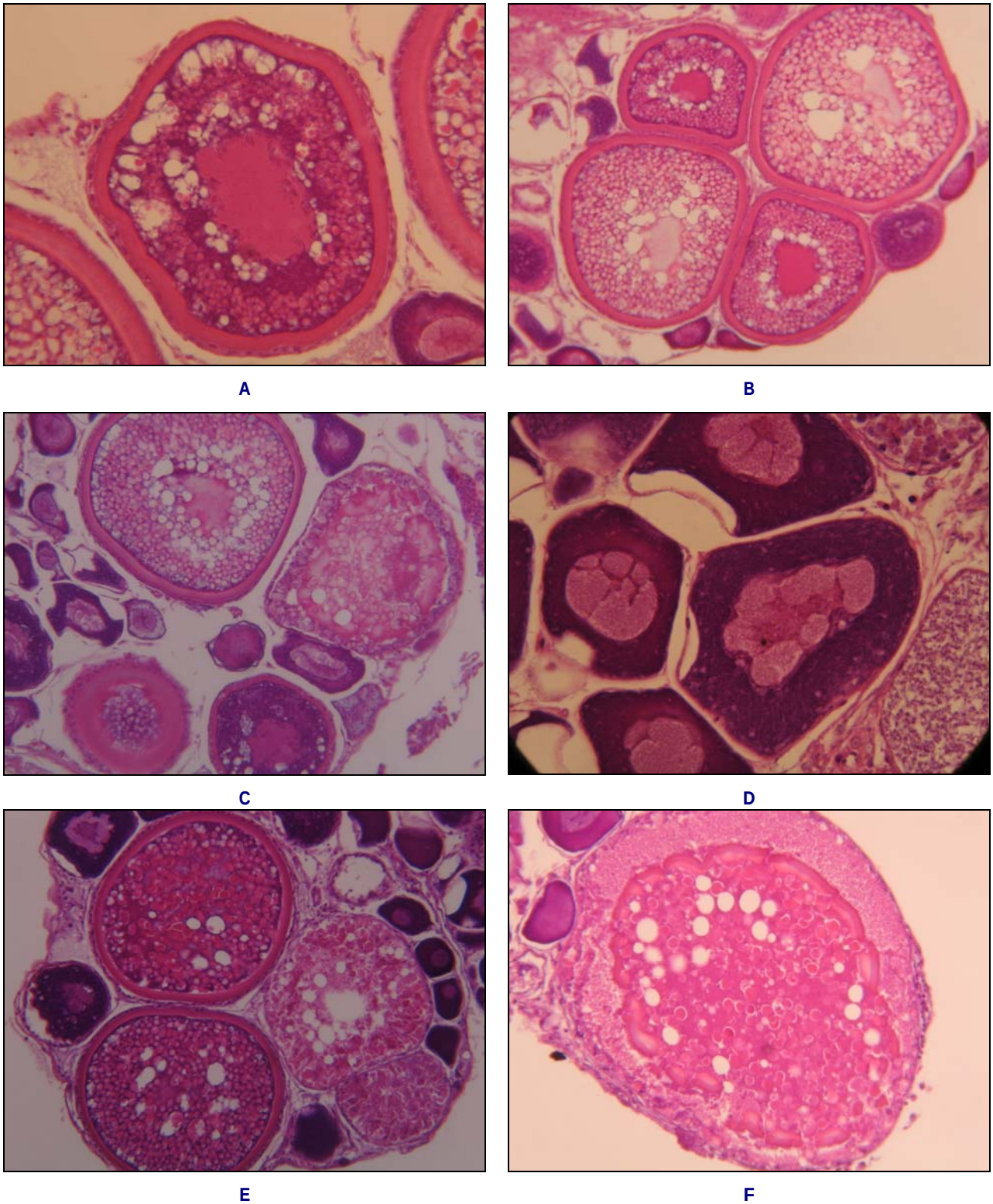


Figura 28. Biopsie ovariche della femmina B60. A: oocita al primo stadio di granulo di vitello (EE, 40x). B: oociti a differenti stadi di granulo di vitello (EE, 20x). C: oociti al primo stadio di vescicola lipidica ed al terzo stadio di granulo di vitello. Oociti allo stadio di granulo di vitello a differenti livelli di atresia (EE, 20 x). D: oociti pre-vitellogenici ad uno stadio perinucleare iniziale e finale (EE, 100x). E: oociti pre-vitellogenici allo stadio di nucleolo cromatina, perinucleare iniziale e finale. Oociti vitellogenici ad uno stadio di prima vescicola lipidica e a differenti stadi di granulo di vitello. Oociti atresici ad uno stadio di vitellogenesi iniziale (EE, 20x). F: oocita atresico ad uno stadio di vitellogenesi avanzata (EE, 40x).

L'utilizzo di un impianti EVAc a lento rilascio è risultato perfettamente adatto al trattamento di questa femmina ad uno stadio ancora abbastanza arretrato di maturazione ovarica. Considerata

la durata del processo di maturazione osservato, sarebbe stato impossibile raggiungere lo stesso risultato con una semplice iniezione di LHRHa o di GnRHa.
In questo caso la temperatura dell'acqua inferiore a quella stagionale naturale sembrano avere influito negativamente sulla risposta alla stimolazione ormonale. Pertanto è stato deciso di sottoporre le altre femmine ad un incremento di temperatura immediatamente dopo il trattamento (paragrafo 1.2).
Non è possibile quantificare l'eventuale effetto negativo dello stress riconducibile alla frequenza dei controlli, ma anche questo fattore potrebbe avere influito negativamente sulla risposta ai trattamenti ormonali e sulla qualità delle uova.

Le analisi istologiche hanno aggiunto ulteriori elementi di valutazione che, sommati alle informazioni ricavate con l'esame a fresco, hanno consentito di tracciare un quadro completo sullo sviluppo ovarico della femmina B60. L'esame istologico delle biopsie ovariche effettuate prima e dopo il trattamento hanno permesso di evidenziare il progressivo sviluppo delle popolazioni oocitarie indotto dalla terapia ormonale e ha confermato l'azione graduale e prolungata dell'impianto EVAc nell'indurre la maturazione finale degli oociti e l'ovulazione come sottolineato da diversi autori (Mylonas *et al*.,2001 a, Zohar e*t al*., 2001 b). L'assenza di oociti maturi ed idratati nei preparati istologici può essere influenzata dalle modalità do processazione in quanto, gli oociti ad uno stadio avanzato di sviluppo sono liberati nel lume ovarico durante le fasi di preparazione delle sezioni come riportato da West (1990). La presenza di numerosi oociti atresici ad uno stadio di granulo di vitello indica un arresto dello sviluppo della maggior parte degli oociti ad una fase di vitellogenesi avanzata ed il raggiungimento della maturazione finale solo da parte di quantità ridotte di oociti come dimostrato dall'assenza di un rigonfiamento addominale dell'animale e dalla scarsa quantità di uova ottenute.

Femmina 573

La femmina 573 ha presentato, nel monitoraggio preliminare del 10 luglio, oociti di diametro compreso tra 140 e 275 μm (media di 212 μm); è stata stimolata il 19 e 20 luglio con somministrazioni di LHRHa a distanza di 24 ore, ciascuna alla dose di 10,5 μg/Kg pv. Nel monitoraggio preliminare, la biopsia ha evidenziato un gruppo di omogeneo di oociti in vitellogenesi, nonché oociti pre-vitellogenici. Nessuno degli oociti osservati al momento del trattamento aveva iniziato il processo di maturazione finale. Dopo il trattamento l'animale è stato spostato in una vasca con temperatura dell'acqua superiore (vasca A 19± 0,5° → vasca D 20 ±1° C).

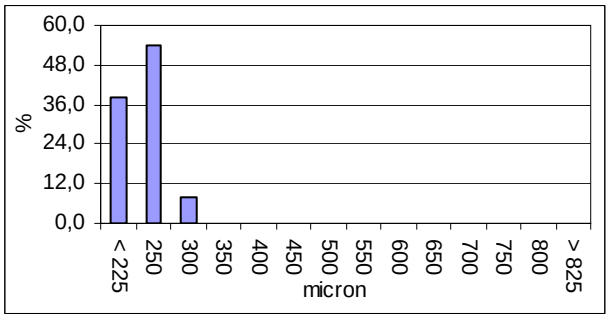
Come riportato in Tabella 10, oltre ai controlli al momento dei trattamenti, l'animale è stato sottoposto a 5 controlli successivi e a 2 tentativi di spremitura:

Tabella 10.: risposta della femmina 573 ai trattamenti di stimolazione ormonale

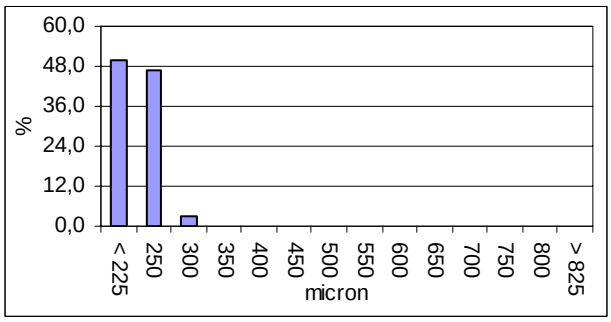
Ore dopo Trattamento	Operazione svolta	n° oociti prelevati	Diametro oociti Vitellogenici	Diametro oociti Idratati	Esito della spremitura
-	Monitoraggio preliminare	13	140-275 μm	-	n.e.*
0	Trattamento t.0 10,5 μg LHRHa/kg	34	185-275 μm	-	n.e.
	Trattamento t.24 10,5 μg LHRHa/kg	51	140-275 μm	-	n.e.
46	Controllo n°1	alcuni	140-275 μm	-	n.e.
72	Controllo n°2	51	160-275 μm	-	n.e.
118	Controllo n°3 Prova di spremitura	60	185-345 μm (n°50)	760-895 μm (n°10)	Esito negativo
143	Controllo n°4 Prova di spremitura	42	220-480 μm	-	Esito negativo
190	Controllo n°5	50	295-665 μm	-	n.e.

***n.e.=non effettuata**

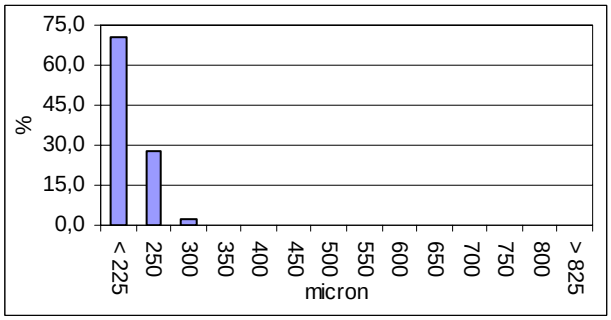
La situazione riscontrata nel monitoraggio preliminare del 10 luglio e quella riscontrata 10 giorni dopo, al momento trattamento, è risultata sostanzialmente la stessa: è stato osservato un gruppo omogeneo di oociti, con diametro nell'intervallo 140-275 μm. Nemmeno nei controlli effettuati 46 e 72 ore dopo il trattamento sono state riscontrate variazioni significative, la media dei diametri degli oociti rimane pressoché invariata. Nel controllo effettuato 118 ore dopo il trattamento, oltre ad un cospicuo gruppo di oociti in fase di vitellogenesi (diametro medio di 286 μm), appaiono i primi oociti che, completato il processo di maturazione, si trovano in fase di idratazione (diametri di 760-895 μm). Nel quarto e quinto controllo, contrariamente alle aspettative, non sono stati prelevati altri oociti idratati. Si riportano di seguito i grafici con il diametro degli oociti prima del trattamento, durante il trattamento e a 72, 118, 143 e 190 ore post-trattamento.



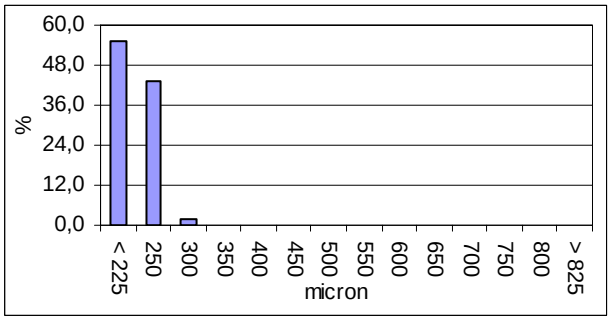
Screening



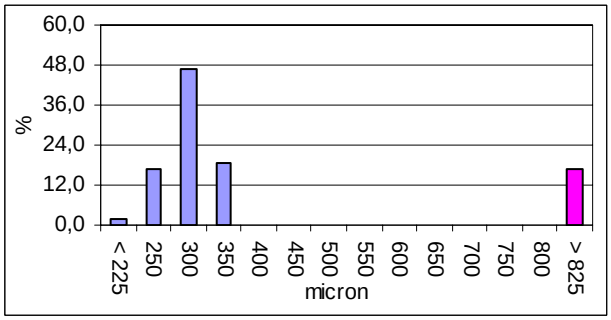
Trattamento (tempo 0)



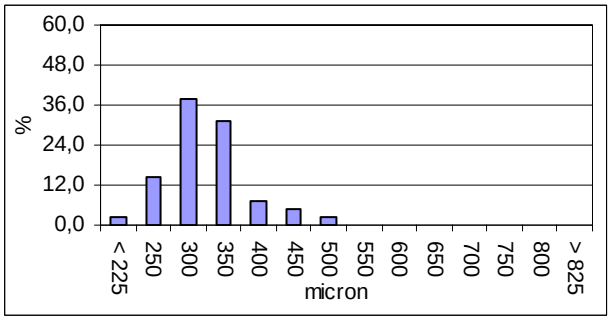
Trattamento (tempo 24 ore)



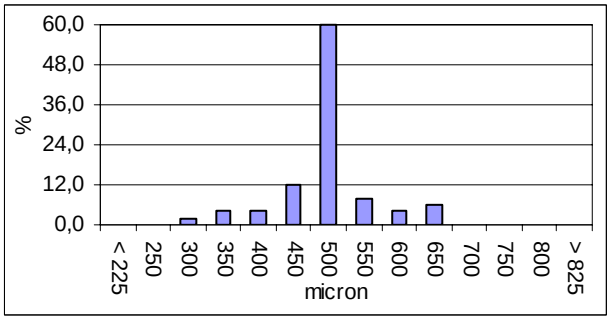
72 ore post-trattamento



118 ore post-trattamento



143 ore post-trattamento



190 ore post-trattamento

Figura 29: diametro degli oociti della femmina 573

Dall'analisi delle distribuzioni del diametro degli oociti si osserva una graduale crescita dei gruppi di oociti fino alla maturazione finale, idratazione ed ovulazione dei più maturi. Tuttavia, l'intero processo di maturazione risulta più limitato rispetto alle precedenti due femmine e porta ad un'unica ovulazione. Di conseguenza, si può affermare che il trattamento con LHRHa mediante doppia iniezione, in una femmina in uno stadio di vitellogenesi piuttosto arretrato, ha avuto un effetto di stimolazione piuttosto limitato sulla maturazione finale degli oociti e sull'ovulazione. Come per le femmine precedenti, l'assenza di un rigonfiamento evidente dell'addome e l'esito negativo delle prove di spremitura fanno supporre l'ovulazione di una quantità molto ridotta di oociti.
Dal terzo controllo effettuato 118 ore post-trattamento, si evince che la prima ovulazione è probabilmente avvenuta dopo circa 110 ore dal trattamento. Considerando che non sono stati riscontrati oociti idratati nei controlli successivi, si può ipotizzare un'unica ovulazione.
Le due prove di spremitura hanno dato esito negativo.
Entrambi i prelievi effettuati dopo la prima ovulazione hanno evidenziato la presenza di oociti in vitellogenesi. Da tale prelievi risulta un ulteriore sviluppo degli oociti anche dopo la prima ovulazione.
Il trattamento con LHRHa ha avuto un effetto limitato nel tempo, portando ad un'unica ovulazione e ad un ulteriore, ma anch'essa limitata, maturazione degli oociti in fase di vitellogenesi.

Femmina F5F

La femmina F5F, nel monitoraggi effettuato il 10 ha presentato oociti di diametro 160-345 μm (media di 247 μm) e 230-575 μm (media di 351 μm); la popolazione degli oociti risulta disomogenea, inoltre il numero di oociti prelevati era molto esiguo.
Questa femmina è stata stimolata in data 19 luglio con GnRHa alla dose di 44,3 μg/Kg pv, nella popolazione degli oociti prelevati prima del trattamento era presente un unico gruppo di oociti in vitellogenesi, in nessuno degli oociti era iniziato il processo di maturazione finale. Dopo il trattamento l'animale è stato posto in una vasca con temperatura dell'acqua superiore (vasca A 19± 0,5° C → vasca D 20 ±1° C).

Come riportato in Tabella 11, oltre ad un controllo all'atto del trattamento, l'animale è stato sottoposto a 4 controlli e 5 tentativi di spremitura dopo il trattamento:

Tabella 11. Risposta della femmina F5F

Ore dopo Trattamento	Operazione svolta	n° oociti prelevati	Diametro oociti Vitellogenici	Diametro oociti Idratati	Esito della spremitura
-	Monitoraggio preliminare	12	160-345 μm	-	n.e.*
0	Trattamento 44,3 μg GnRHa/kg	61	230-575 μm	-	n.e.
70	Controllo n°1 Prova di spremitura	6	-	775-850 μm	Esito negativo
93	Prova di spremitura	-	-	-	10 g. (parte Lotto 1)
120	Controllo n°2 Prova di spremitura	50	-	740-925 μm	20 g. (parte Lotto 2)
141	Controllo n°3 Prova di spremitura	40	-	690-850 μm	16 g. (parte Lotto 3)
165	Controllo n°4 Prova di spremitura	20	-	775-890 μm	8 g. (parte Lotto 4)

***n.e.=non effettuata**

Nel primo controllo, effettuato 70 ore dopo il trattamento, risulta solo la presenza di oociti che hanno completato il processo di maturazione finale e che si trovava in fase di idratazione (diametro 775-850 μm).
Nei controlli successivi, salvo per i prelievi di oociti più cospicui, la situazione è risultata invariata con la presenza esclusiva di oociti idratati di diametro nell'intervallo 740-925 μm.
Dalla prima ovulazione avvenuta a 60-70 ore post-trattamento al 3° controllo effettuato 141 ore post-trattamento, gli oociti prelevati sono risultati normalmente maturi ed idonei ad eventuali prove di fecondazione artificiale. Successivamente, nel 4° controllo, effettuato 165 ore post-trattamento, l'80% degli oociti sono risultati sovra-maturi.

Si riportano di seguito i grafici con la distribuzione del diametro degli oociti prima del trattamento, all'atto del trattamento e a 70, 120, 141 e 165 ore post-trattamento.

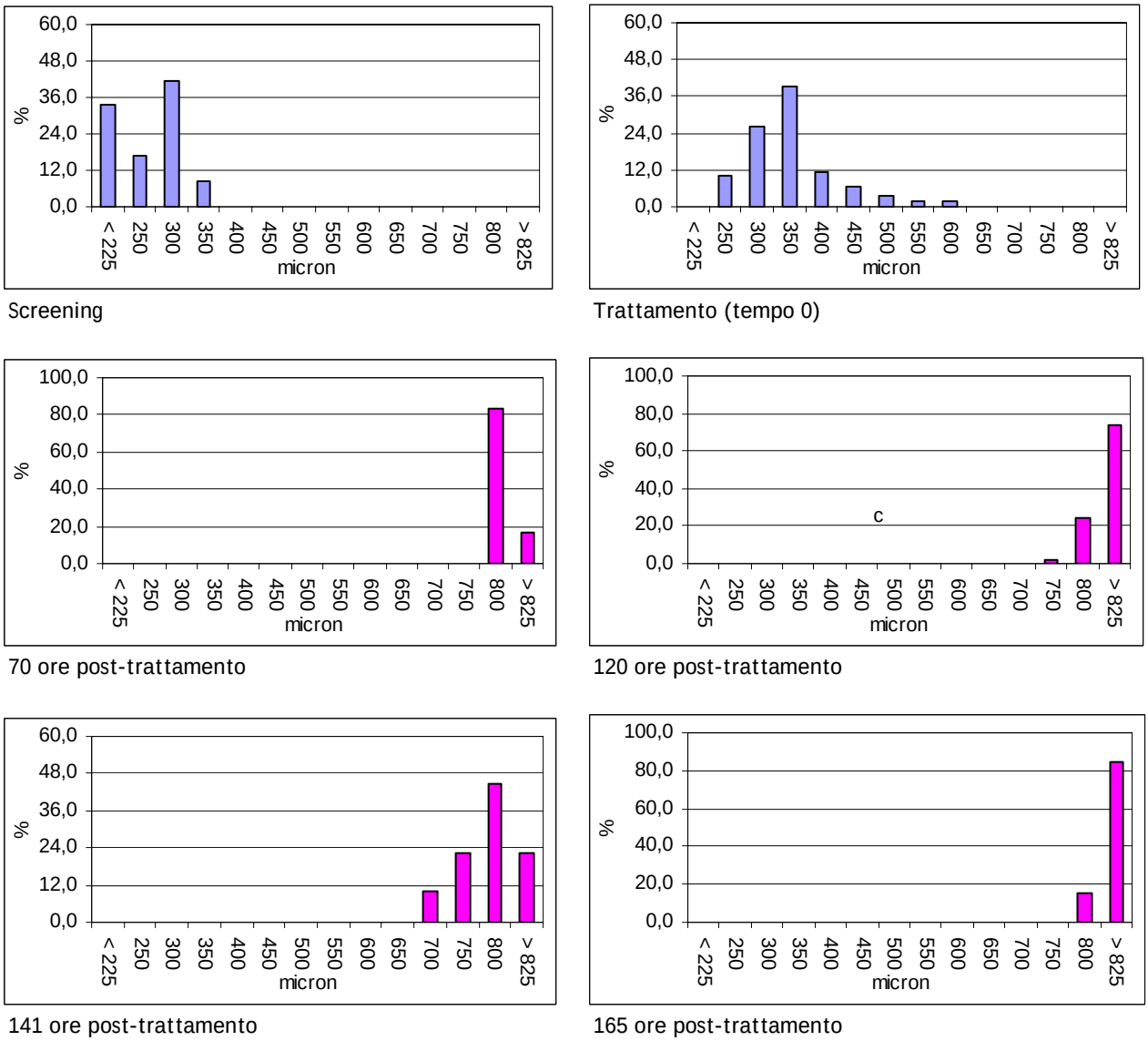


Figura 30. diametro degli oociti della femmina F5F

Anche in questo caso, il trattamento con GnRHa mediante impianto EVAc, in una femmina in uno stadio di vitellogenesi mediamente avanzato, ha avuto esito positivo sulla maturazione finale degli oociti e sull'ovulazione, anche se l'assenza di qualsiasi rigonfiamento dell'addome fa supporre l'ovulazione di quantità molto ridotte.

Dal primo controllo effettuato 70 ore post-trattamento, si evince che la prima ovulazione è probabilmente avvenuta dopo circa 60 ore dal trattamento. Considerando un intervallo di circa 6 ore dopo l'ovulazione, nel quale le uova devono essere raccolte e possono essere fecondate con successo, e il fatto che le uova raccolte per 4 giorni consecutivi sono risultate idonee alla fecondazione, si possono ipotizzare diverse ovulazioni avvenute successivamente nel periodo tra 60 e 141 ore post-trattamento. Inoltre, la presenza di 10% di oociti non sovra-maturi nel controllo svolto dopo 165 ore dal trattamento potrebbe indicare un'ulteriore lieve ovulazione. In sintesi si possono ipotizzare da 4 a 5 ovulazioni successive, avvenute a 24 ore d'intervallo l'una dall'altra.

Dal momento della prima ovulazione avvenuta a 60-70 ore dal trattamento l'animale è stato sottoposto a 5 prove di spremitura di cui le ultime 4 hanno dato esito positivo. Nelle spremiture effettuate a 93, 120 , 141 e 165 ore post-trattamento sono stati ottenuti rispettivamente 10, 20, 16 e 8 grammi di uova (totale 54 grammi). Come per le prime due femmine trattate (C6E e B60), l'esito del trattamento, anche se positivo, rimane caratterizzato dalla scarsa proporzione di oociti

interessati dal processo di maturazione finale ed idratazione. Ciò si evidenzia, sia dall'assenza di rigonfiamento addominale, sia dalla scarsa quantità di uova ottenute.
Inoltre, dal primo controllo in poi, non sono più stati prelevati oociti in fase di vitellogenesi.

In questo caso, l'utilizzo di un impianti EVAc a lento rilascio è risultato adatto al trattamento di una femmina inizialmente ad uno stadio medio di maturazione ovarica. Tuttavia, considerata la rapidità della risposta alla stimolazione sarebbe stato probabilmente possibile raggiungere lo stesso risultato con una semplice iniezione di LHRHa o di GnRHa.

Se si fa il confronto con le altre femmine trattate con l'impianto di GnRHa a lento rilascio, che si trovavano ad una stadio di maturazione più avanzato (C6E) e più arretrato per (B60), si può ipotizzare che l'innalzamento della temperatura, seppure limitato ad 1°C, ha determinato un'accelerazione della risposta alla stimolazione ormonale, con una prima ovulazione dopo circa 70 ore, invece di circa 110 ore (C6E) e di circa 210 ore per la (B60).

Femmina 30F

La femmina 30F nel monitoraggio preliminare del 18 luglio ha presentato oociti di diametro compreso tra 205 e 435 μm (media di 286 μm) la popolazione era composta da un unico gruppo di oociti in vitellogenesi, nessuno degli oociti osservati aveva iniziato il processo di maturazione finale. Questa femmina è stata stimolata il 20 e 21 luglio con due somministrazioni intramuscolo di LHRHa a 24 ore d'intervallo, alle dose di 18,0 μg/Kg pv la prima e 13,5 μg/Kg di pv la seconda. Dopo il trattamento l'animale è stato trasferito in una vasca con temperatura dell'acqua più elevata (vasca C 18,5± 0,5° C → vasca D 20 ±1° C).

Risultato dell'esame a fresco delle biopsie ovariche

Dopo il trattamento, l'animale è stato sottoposto a 4 controlli e 3 tentativi di spremitura come riportato in Tabella 12:

Tabella 12. risposta della femmina 30F

Ore dopo Trattamento	Operazione svolta	n° oociti prelevati	Diametro oociti Vitellogenici	Diametro oociti Idratati	Esito della spremitura
-	Monitoraggio preliminare	50	205-435 μm	-	n.e.*
0	Trattamento t.0 18 μg LHRHa/kg	-	-	-	n.e.
	Trattamento t.24 13,5 μg LHRHa/kg	-	-	-	n.e.
46	Controllo n°1	20	160-300 μm	-	n.e.
116	Controllo n°2 Prova di spremitura	50	-	775-925 μm	20 g. (parte Lotto 4)
164	Controllo n°3 Prova di spremitura	53	370-705 μm (n°42)	740-850 μm (n°11)	Esito negativo
189	Controllo n°4 Prova di spremitura	40	370-665 μm	-	Esito negativo

***n.e.=non effettuata**

Nel primo controllo, svolto dopo 46 ore dalla fine del trattamento, è stato prelevato un gruppo di 20 soli oociti abbastanza disomogeneo, con diametro compreso tra 160 e 300 μm (media di 230 μm). Rispetto al monitoraggio iniziale, la situazione sembra essere invariata.
Nel secondo controllo, effettuato 116 ore dalla fine del trattamento, risultano presenti oociti che hanno completato il processo di maturazione finale e che si trovavano in fase di idratazione (diametro 775-925 μm).
Nel terzo controllo, effettuato 164 ore dalla fine del trattamento, oltre ad un cospicuo gruppo di oociti in fase di vitellogenesi (diametro medio di 505 μm), risulta ancora la presenza di oociti che hanno completato il processo di maturazione finale e che si trovavano in fase di parziale riassorbimento (diametri di 740-850 μm).

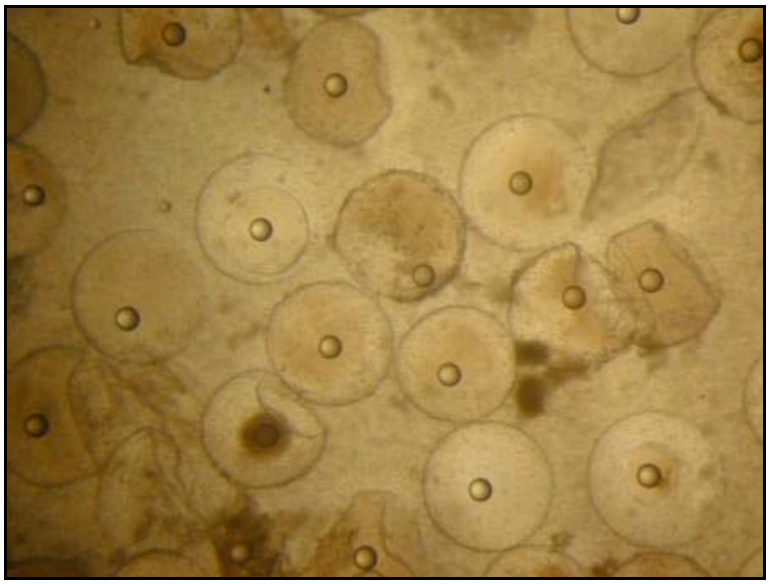
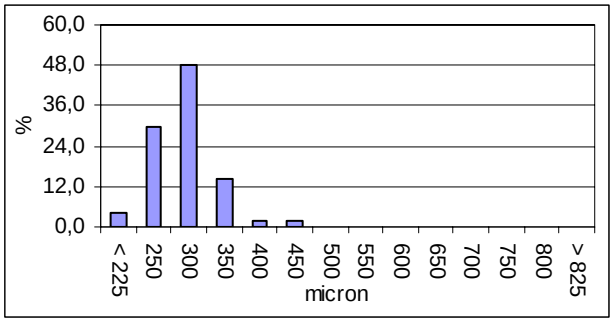


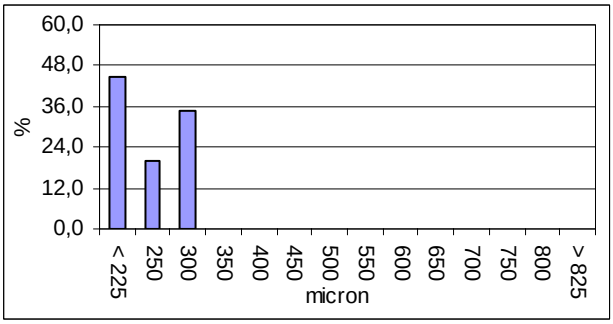
Figura 31. oociti in vitellogenesi avanzata e in riassorbimento/atresia

Nel quarto controllo, contrariamente alle aspettative, non sono stati prelevati oociti idratati.
Negli ultimi due controlli, le popolazioni di oociti vitellogenici presentano un diametro medio di 505 e 475 μm, in entrambi i casi significativamente superiori alle medie iniziali.

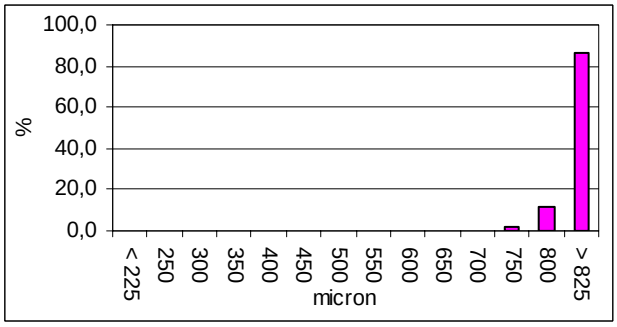
Si riportano di seguito i grafici con la distribuzione del diametro degli oociti prima del trattamento e a 46, 116, 164 e 189 ore post-trattamento.



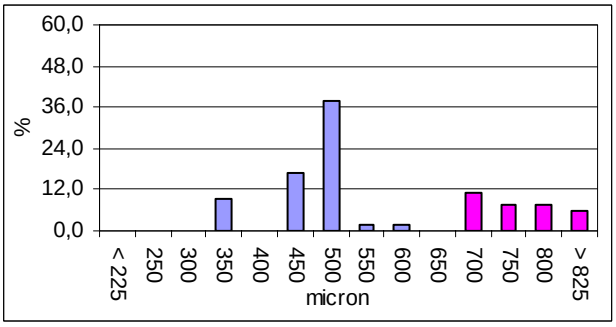
Screening



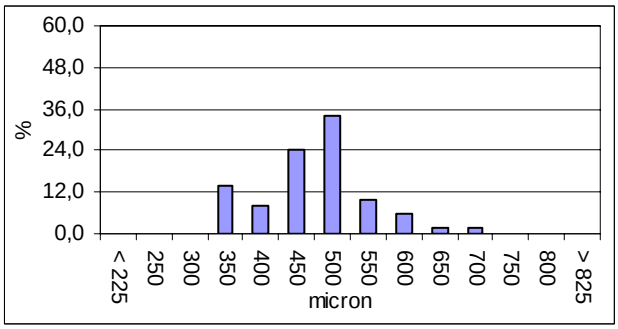
46 ore post-trattamento



116 ore post-trattamento



164 ore post-trattamento



189 ore post-trattamento

Figura 32. diametro degli oociti della femmina 30F

In assenza di controlli nel periodo da 46 a 116 ore post-trattamento, non si ha riscontro dell'andamento dello sviluppo dei gruppi di oociti fino alla maturazione finale, idratazione ed ovulazione dei più maturi. In ogni modo, si può affermare che il trattamento con LHRHa mediante doppia iniezione, in una femmina in uno stadio medio di vitellogenesi, ha avuto un esito positivo sulla maturazione finale degli oociti e sull'ovulazione. Come per le femmine precedenti, l'assenza di un rigonfiamento evidente dell'addome fa supporre l'ovulazione di una quantità molto ridotta di oociti.

Dal secondo controllo effettuato 116 ore post-trattamento, si evince che un'ovulazione è avvenuta dopo circa 110 ore dal trattamento, ma non è possibile collocare nel tempo la prima ovulazione che potrebbe essere intervenuta nell'intervallo 60-110 ore dopo il secondo trattamento. Considerando che gli oociti idratati riscontrati nel terzo controllo, svolto 164 ore post trattamento, sono risultati in parziale riassorbimento, e che non sono stati riscontrati oociti idratati nel controllo successivo, si può ipotizzare l'assenza di ulteriore ovulazione. In sintesi si possono ipotizzare 3 ovulazioni successive, avvenute a 24 ore d'intervallo l'una dall'altra. Come per l'altra femmina trattata con LHRHa (573) la risposta al trattamento ormonale risulta più limitato nel tempo rispetto alle femmine trattate con impianti EVAc di GnRHa.

L'animale è stato sottoposto a 3 prove di spremitura di cui una ha dato esito positivo. Dalla spremitura effettuata a 116 ore dopo il secondo trattamento sono stati ottenuti circa 20 grammi di uova. Come per tutte le altre femmine trattate, l'esito del trattamento, anche se positivo, rimane caratterizzato dalla scarsa proporzione di oociti interessati dal processo di maturazione finale ed idratazione. Ciò si evidenzia, sia dall'assenza di rigonfiamento addominale, sia dalla scarsa quantità di uova ottenute.

Risultato del'esame istologico delle biopsie ovariche

L'esame istologico delle biopsie effettuate sulla femmina 30F prima del trattamento di stimolazione ormonale ha evidenziato come massimo stadio di maturazione la presenza di oociti allo stadio di granulo di vitello, con corrispondente stadio di maturazione ovarica F3 seconda la scala di Marino &t al. (2001), riportata in tabella 3. Infatti, prima del trattamento, l'animale presenta una struttura ovarica caratterizzata da 61 % di oociti pre-vitellogenici, 21 % di oociti vitellogenici e 13 % di oociti atresici. Dopo 46 ore dalla fine del trattamento con LHRHa il 41 % degli oociti esaminati è risultato essere ad uno stadio di pre-vitellogenesi, il 37 % ad uno stadio di vitellogenesi, mentre il restante 17 % è risultato essere costituito da oociti atresici. Al controllo successivo, effettuato 164 ore dalla fine del trattamento, le biopsie esaminate erano caratterizzate dalla presenza di 26 % di oociti pre-vitellogenici e di 42 % di oociti vitellogenici. Inoltre era presente un 6 % di oociti maturi, 2 % di follicoli post-ovulatori atresici e 24 % di oociti atresici. L'esame istologico dopo 189 ore dal secondo trattamento ha rilevato la presenza nel campione di 11 % di oociti pre-vitellogenici e 47 % di oociti vitellogenici. Erano inoltre presenti un 9 % di oociti maturi, 3 % di follicoli post-ovulatori atresici e da 30 % di oociti atresici.

Tabella 13. percentuale degli di maturazione ovarica della femmina 30F

Ore dopo Trattamento		Fase di pre-vitellogenesi			Fase di vitellogenesi		Fase di maturazione	Fase di atresia	
		Stadio oogoni	Stadio nucleolo cromatina	Stadio perinucleare	Stadio goccia lipidica	Stadio granulo di vitello	Stadio oociti maturi	Follicolo atresico	Oociti atresici
-	Screening	0 %	9 %	52 %	17 %	9 %	0 %	0 %	13 %
46	Controllo n°1	0 %	9 %	37 %	20 %	17 %	0 %	0 %	17 %
164	Controllo n°3	0 %	0 %	26 %	15 %	27 %	6 %	2 %	24 %
189	Controllo n°4	0 %	2 %	9 %	1 %	46 %	9 %	3 %	30 %

Le percentuali degli oociti riscontrati ad ogni campionamento sono riportati graficamente nella figura 33

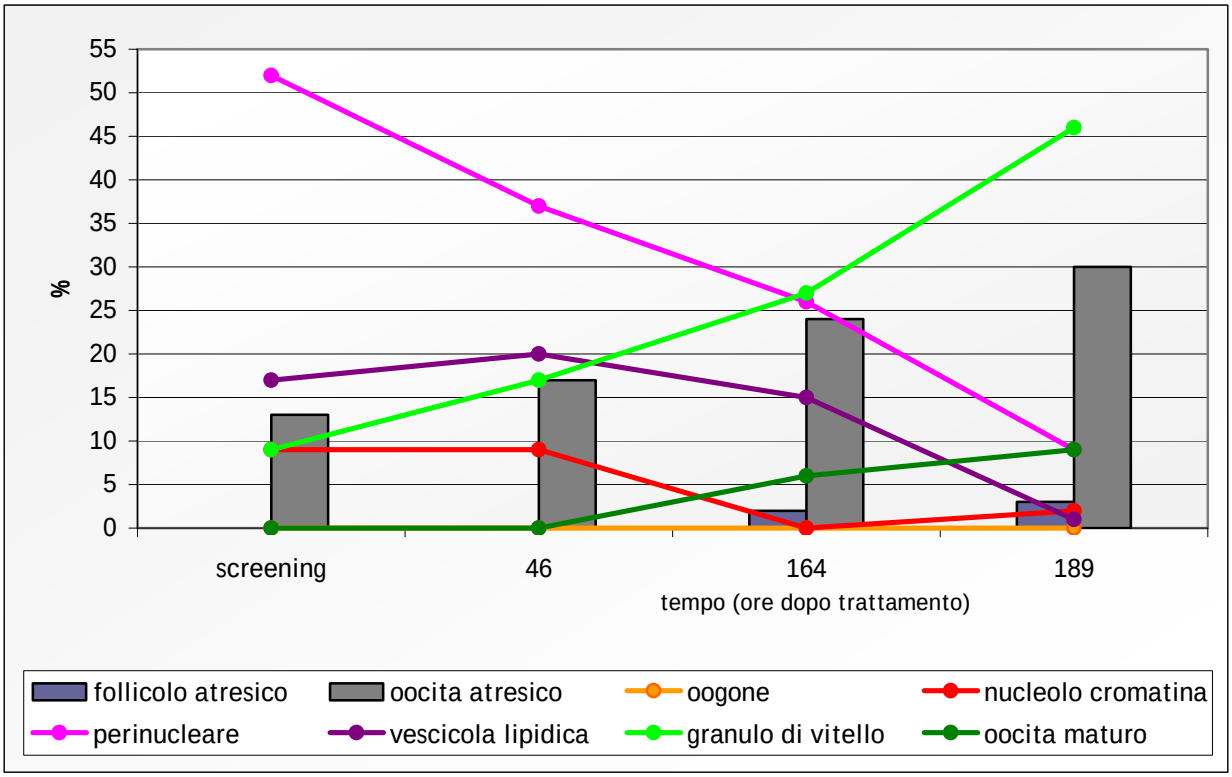


Figura 33. grafico stadi di maturazione degli oociti nei campioni bioptici della femmina 30F

Come per la femmina B60, i risultati istologici e l'esame a fresco degli oociti concordano nel rilevare la presenza, nell'ovaio della femmina 30F, di gruppi di oociti a differenti stadi di sviluppo che maturano in modo sincrono, come già affermato per la specie *Epinephelus marginatus* da Marino &t al. (2003).

Dalla osservazione del grafico si evidenzia la graduale diminuzione degli oociti pre-vitellogenici. Al momento del trattamento gli oociti allo stadio di nucleolo cromatina e allo stadio perinucleare risultano essere rispettivamente pari al 9 % e al 52 % degli oociti esaminati, mentre nell'ultimo controllo, effettuato dopo 189 ore dal secondo trattamento, si attestano rispettivamente intorno al 2 % ed al 9 %. Contrariamente alla femmina B60 gli oociti allo stadio di vescicola lipidica rilevati nel corso dei controlli subiscono un forte decremento: essi risultano essere solo pari ad 1 % degli oociti esaminati nell'ultimo controllo. Un'altra importante differenza è rappresentata dalla rapida crescita degli oociti allo stadio di granulo di vitello che stimati intorno al 9 % al momento del trattamento sono risultati essere pari al 17 % e al 27 % rispettivamente 46 ore e 164 ore dopo il trattamento. A 189 ore il 46 % degli oociti osservati era costituito da oociti allo stadio di granulo di vitello. Un analisi dettagliata degli oociti agli stadi successivi alla vitellogenesi ha rilevato la presenza di quantità ridotte di oociti maturi stimati intorno al 6 % e al 9 % rispettivamente 164 ore e 189 ore dopo il trattamento. Contemporaneamente negli stessi controlli sono state registrate quantità ridotte di follicoli post-ovulatori atresici. Come per la femmina B60, si evidenzia nel corso dei controlli una graduale aumento della proporzione di oociti atresici che risulta essere pari al 13 % degli oociti esaminati al momento del trattamento e al 30 % nell'ultimo controllo. Essi risultano essere costituiti esclusivamente da oociti atresici allo stadio di post-vitellogenesi. Contrariamente agli oociti atresici osservati nella femmina B60 risultano evidenti differenti livelli di atresia.
Dall'analisi dei risultati istologici si desume una regolare maturazione di tutti i gruppi di oociti esaminati fino allo stadio di granulo di vitello ed un blocco dello sviluppo della maggior parte dei gruppi di oociti in fase di maturazione iniziale come confermato dalla presenza di numerosi oociti atresici allo stadio di post-vitellogenesi rilevati nel corso dei controlli.

Immagini dei preparati istologici relativi ad ogni controllo sono riportati in figura 34.

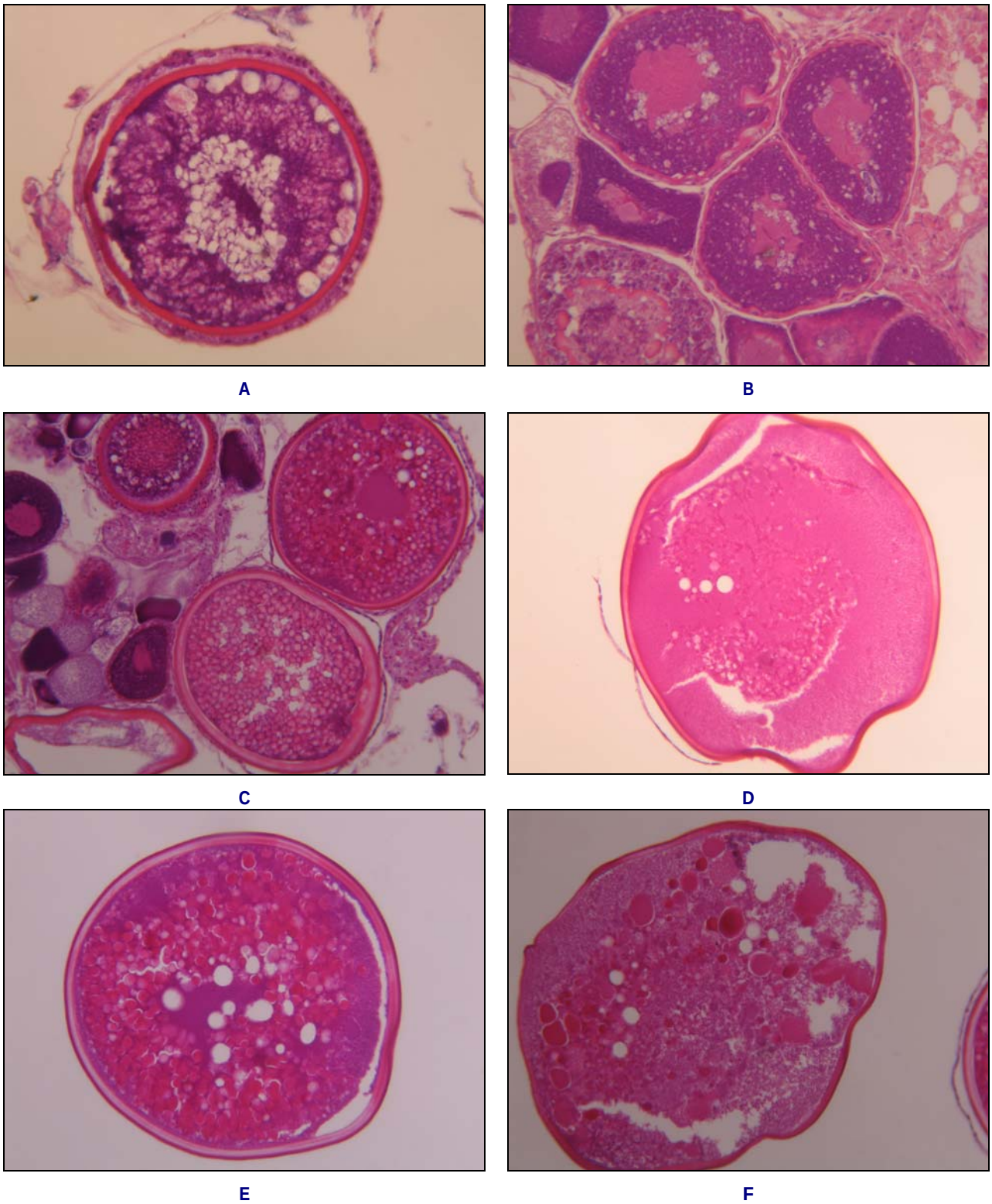


Figura 34. Biopsie ovariche della femmina 30 F. A: oocita allo stadio di seconda vescicola lipidica (EE, 40x). B: oociti allo stadio di prima vescicola lipidica ed oocita atresico ad uno stadio di vitellogenesi iniziale (EE, 40 x). C: oociti pre-vitellogenici ed oociti vitellogenici allo stadio di prima vescicola lipidica e a differenti stadi di granulo di vitello. Oocita vitellogenico ad uno stadio finale di atresia (EE, 20x). D: oocita ad uno stadio finale di maturazione o di degradazione della vescicola germinale (EE, 40x). E: oocita post-vitellogenico ad uno stadio iniziale di atresia (EE, 20x). F: oocita post-vitellogenico atresico (EE, 20x). G: oocita post-vitellogenico ad uno stadio finale di atresia (EE, 20x). H: follicolo post-ovulatorio (EE, 20x).

Il trattamento con LHRHa ha avuto effetto in un arco minore di tempo, portando ad un numero limitato di ovulazioni. Contrariamente alla prima femmina trattata con LHRHa (573) risulta uno

sviluppo significativo degli oociti in fase di vitellogenesi dopo la prima ovulazione, osservazione che potrebbe derivare dal fatto che la presente femmina era ad uno stadio di maturazione iniziale comunque più avanzato.

L'esame istologico delle biopsie effettuate prima e dopo il trattamento hanno permesso di evidenziare il progressivo sviluppo delle popolazioni oocitarie indotto dalla terapia ormonale. La maggiore quantità di oociti allo stadio di granulo di vitello rilevata dopo solo 46 ore dal secondo trattamento e ad ogni controllo nella femmina 30 F rispetto alla femmina B60 conferma una risposta più veloce dell'animale al trattamento causata dall'azione immediata di LHRHa rispetto all'impianto EVAC. Essendo entrambe le femmine, prima del trattamento, ad uno stadio di maturazione ovarica iniziale simile, la rapida risposta della femmina 30 F può essere riconducibile sicuramente alla natura dell'ormone utilizzato. I risultati istologici hanno evidenziato una risposta dell'animale al trattamento come confermato dalla presenza di oociti maturi e follicoli post-ovulatori rilevati negli ultimi due campionamenti. Tutti gli oociti maturi osservati erano ad uno stadio finale di maturazione contraddistinto dalla degradazione della vescicola germinale. All'esame istologico non sono risultati oociti maturi con evidente coalescenza delle vescicole lipidiche e dei granuli proteici. Allo stesso modo non è stata osservata la migrazione della vescicola germinale al polo animale. Anche in questo caso, come si è verificato per la femmina B60, non sono stati osservati oociti idratati ed ovulati, ciò può essere riconducibile alle tecniche istologiche, come affermato da West (1990).
La presenza di numerosi oociti atresici ad uno stadio di post-vitellogenesi conferma il raggiungimento della maturazione finale e dell'ovulazione solo da parte di piccole popolazioni di oociti come dimostrato dall'assenza di un rigonfiamento addominale dell'animale e dalla scarsa quantità di uova ottenute.
Nella femmina 30 F la presenza di numerosi oociti atresici può essere dovuta al tipo di trattamento utilizzato. Infatti LHRHa non consente di mantenere il livello di gonadotropine nel sangue su livelli costanti e per un periodo prolungato come avviene nel caso del GnRha. La mancanza di gonadotropine nel sangue, dovuta alla degradazione da parte di enzimi, provoca un blocco del processo di maturazione finale e l'instaurarsi di fenomeni atresici come confermato da Mylonas &t al. (1997).

Riepilogo dei risultati dei trattamenti ormonali sulle femmine

Si riporta di seguito il riepilogo delle risposte delle 5 femmine trattate.

Tabella 14: riepilogo risposta delle femmine

Femmina trattata	Diametro degli oociti prima del trattamento	Data del trattamento	Prodotto	Dose (µg/Kg p.v.)	Variazioni temperatura	Prima ovulazione	n° presunto di ovulazioni	Uova prodotte
C6E	185-645 µm	11 luglio	GnRHa	42,5	-	dopo circa 110 ore	da 2 a 5	-
B60	205-415 µm	13 luglio	GnRHa	49,2	-	dopo circa 210 ore	da 4 a 5	3-6 g (n°3 lotti)
573	185-275 µm	19 luglio	LHRHa	10,5	+ 1°C	dopo circa 110 ore	1	-
		20 luglio	LHRHa	10,5				
F5F	230-575 µm	19 luglio	GnRHa	44,3	+ 1°C	dopo circa 60 ore	da 4 a 5	54 g (n°4 lotti)
30F	205-435 µm	20 luglio	LHRHa	18,0	+ 2°C	dopo 60-110 ore	da 1 a 3	20 g (n°1 lotto)
		21 luglio	LHRHa	13,5				

Nelle 3 femmine trattate con GnRHa mediante impianto EVAc sono state osservate da 2 a 5 ovulazioni successiva.
Nelle femmine sottoposte a trattamento che presentavano uno stadio di maturazione iniziale con parte degli oociti di più di 300 µm di diametro, tutti i trattamenti hanno avuto esito positivi e hanno

determinato, sia la maturazione finale e l'idratazione degli oociti inizialmente più maturi, sia un ulteriore maturazione degli oociti in fase di vitellogenesi o di pre-vitellogenesi.
L'osservazione di oociti a stadi di maturazione diversi, nonché la maturazione progressiva degli stessi con ovulazioni consecutive hanno confermato lo stato "multiple-batch group-synchronous ovarian development" che caratterizza la specie (sviluppo ovarico a gruppi sincroni).

Maschi B5E, E16, 87C

L'induzione ormonale dei maschi B5E, E16 ed 87C è avvenuta l'11 luglio 2006 con un'unica somministrazione di LHRHa alla dose di 15 μg/Kg di peso vivo. Al momento del trattamento ormonale il maschio B5E è risultato fluente, con sperma molto concentrato, con spermatozoi al terzo e quarto stadio e con una mobilità del 70-80%. Il maschio E16, lievemente fluente, con sperma molto concentrato, presentava spermatozoi al primo stadio e una mobilità inferiore al 30%. Il maschio 87C è risultava ancora immaturo al momento del trattamento.

Dopo il trattamento, gli animali sono stati utilizzati per la riproduzione dal 23 luglio 2006 al 26 luglio 2006 in base alla necessità di sperma nel corso delle operazioni di fecondazioni.
Il maschio BE5 è stato spremuto 4 volte, per 4 giorni consecutivi. Nel primo prelievo, 287 ore post-trattamento, è stato ottenuto 0,5 ml di sperma ad una concentrazione di spermatozoi $2,61 \times 10^9$/ml. Nei successivi 3 controlli effettuati a 314 ore, 336 ore e a 360 ore post-trattamento sono stati raccolti rispettivamente 0,4 ml, 0,3 ml e 0,15 ml di liquido seminale. Nel corso dell'ultimo controllo è stata nuovamente valutata la mobilità degli spermatozoi, che ha confermato il dato del 70-80% di mobilità ottenuto al momento del trattamento.
Il maschio E16 è stato spremuto 3 volte, per 3 giorni consecutivi, 314 ore, 336 ore e 360 ore post-trattamento. La quantità di liquido seminale ottenuta da ogni spremitura è stata rispettivamente di 0,1 ml, 0,1 ml e di 0,05 ml. Lo sperma analizzato alla prima spremitura ha mostrato una concentrazione di spermatozoi $2,67 \times 10^9$/ml, mentre la mobilità è risultata dell'80% al momento dell'ultima spremitura.
Il maschio 87C è stato spremuto un'unica volta a 360 ore post-trattamento. La quantità di liquido seminale prelevata è stata di 0,1 ml, la mobilità degli spermatozoi è risultata essere dell'80%.

I risultati ottenuti hanno quindi evidenziato una risposta positiva al trattamento con LHRHa, per tutta la durata delle prove di fecondazione con una mobilità media pari al 70-80% degli spermatozoi. Il maschio B5E, già perfettamente maturo all'atto del trattamento, ha mantenuto la stessa condizione per tutta la durata della sperimentazione. Il maschio E16 ha fatto registrare un incremento significativo della mobilità degli spermatozoi dal 30% all'80 %, mentre il maschio 87C, immaturo all'atto del trattamento, è risultato fluente con un'ottima mobilità degli spermatozoi.
La maggiore quantità di liquido seminale fornita dal maschio B5E è probabilmente riconducibile sia all'innalzamento di temperatura a cui esso è stato sottoposto a 10 giorni dal trattamento, sia allo stadio di maturazione iniziale superiore rispetto a quello degli altri maschi.
Le basse quantità di sperma ottenute hanno confermato il carattere "oligo-spermatico" dei maschi di cernia bruna.

2.2 LA PERCENTUALE DI FECONDAZIONE E LO SVILUPPO EMBRIONALE

Prove di fecondazione artificiale sono state realizzate giornalmente dal 23 luglio al 26 luglio. In totale le prove di fecondazioni effettuate sono state cinque ed hanno portato alla costituzione di quattro lotti di uova.
Le uova ottenute ad ogni spremitura sono state accorpate come riportato in tabella 15 e fecondate con sperma prelevato da 1 o da 2 maschi a seconda del quantitativo di sperma ottenuto. La costituzione dei vari lotti è riassunta di seguito insieme alle modalità di fecondazione adottate.

Tabella 15. modalità di fecondazione

Data spremitura	Femmine spremute	Uova ottenute	Maschi spremuti	Sperma ottenuto	Lotto costituito
23 luglio	F5F B60	10 g. 1-2 g.	B5E	0,5 ml	1
24 luglio	F5F B60	20 g. 1-2 g.	E16 B5E	0,1 ml 0,4 ml	2
25 luglio	F5F	16 g.	E16 B5E	0,1 ml 0,3 ml	3
26 luglio	F5F B60	8 g. 1-2 g.	E16 87C	0,05 ml 0,1 ml	4a
	30F	20 g.	B5E	0,15 ml	4b

Fecondazione del 23 luglio 2006 – Lotto 1

Il primo lotto risulta dalla fecondazione artificiale a secco, con 0,5 ml di sperma del maschio B5E diluito con acqua di mare nelle proporzioni di 1:2, di 10 grammi di uova provenienti dalla spremitura della femmina F5F e di 1-2 grammi di uova provenienti dalla spremitura della femmina B60. In questo caso si è proceduto prima alla spremitura delle femmine, poi a quella del maschio.
Circa 2 ore dopo la fecondazione, dopo un periodo di sedimentazione di qualche minuto, le uova sul fondo sono state scartate, mentre sono stati raccolti e conservati 6 grammi di uova galleggianti. Da un primo controllo effettuato al microscopio (stadio di divisione a 2-4 cellule), immediatamente dopo la raccolta, è risultato un tasso di fecondazione del 50% della frazione a galla e una segmentazione più o meno irregolare nella maggiore parte delle uova fecondate. Da un simile controllo fatto sulle uova di scarto immediatamente dopo la raccolta, è risultato un 8% di uova abortite e un 92% di uova sovra-mature non fecondate.

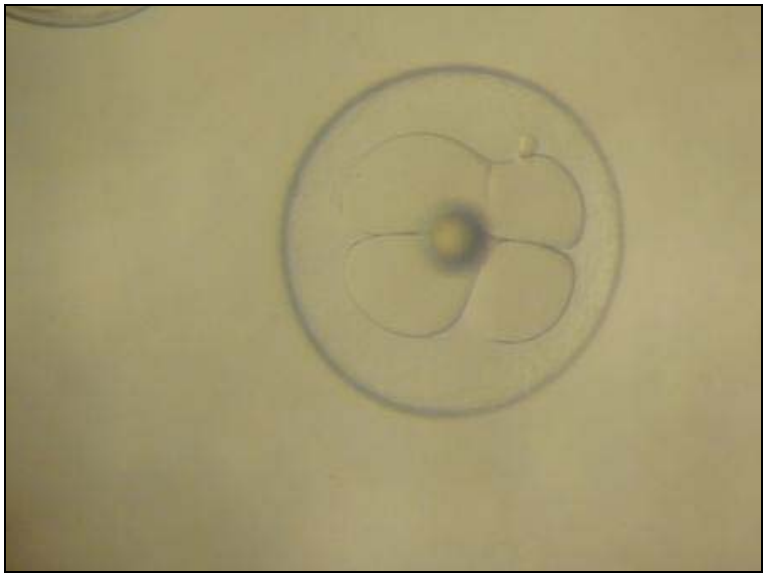


Figura 35. Segmentazione irregolare- uova stadio 2-4 blastomeri lotto 1

Da un secondo controllo, svolte dopo altre 2-3 ore (stadio morula), è risultato un tasso di fecondazione del 71%. Di seguito si è considerato il tasso di fecondazione medio del 64%.

Questo primo lotto è stato trasferito la notte stessa presso l'avannotteria di Torre Cerrano. Considerando un numero di 1.428 uova / grammo, il presente lotto è stato stimato in un totale di 8.570 uova, di cui 5.480 fecondate (64%).

Fecondazione del 24 luglio 2006 - Lotto 2

Il secondo lotto risulta dalla fecondazione artificiale a secco, con 0,5 ml di sperma dei maschi E16 e B5E attivato con acqua di mare nelle proporzioni di 1:2, di 20 grammi di uova provenienti dalla spremitura della femmina F5F e di 1-2 grammi di uova provenienti dalla spremitura della femmina B60. Anche in questo caso si è proceduto prima alla spremitura delle femmine, poi a quella dei maschi.
Circa 3 ore dopo la fecondazione, dopo un periodo di sedimentazione di qualche minuto, le uova sul fondo sono state scartate, mentre sono stati raccolti e conservati 6,5 grammi di uova galleggianti. Da un controllo effettuato al microscopio, immediatamente dopo la raccolta, è risultato un tasso di fecondazione del 16,5% della frazione a galla e una segmentazione più o meno irregolare nella maggiore parte delle uova fecondate. La maggior parte delle uova rimaste sul fondo sono risultate non fecondate.

Considerata la scarsità di uova di qualità, questo secondo lotto è stato mantenuto presso la COISPA in vista dell'accorpamento al lotto del giorno successivo. Considerando un numero di 1.428 uova / grammo, il presente lotto è stato stimato in un totale di 9.280 uova, di cui 1.530 fecondate (16,5%). A 24 h dalla fecondazione, dopo decantazione nella vasca d'incubazione, sono state raccolte a galla 100 uova che sono state accorpate al lotto 3.

Fecondazione del 25 luglio 2006 - Lotto 3

Il terzo lotto risulta dalla fecondazione artificiale a secco di 16 grammi provenienti dalla spremitura della femmina F5F, utilizzando 0,4 ml di sperma dei maschi E16 e B5E attivato con acqua di mare nelle proporzioni di 1:2,5. Considerati i scarsi risultati ottenuti nelle precedenti 2 prove di fecondazione, si è proceduto diversamente in modo da non esporre le uova appena spremute ad un periodo di attesa troppo lungo. Si è proceduto prima alla spremitura dei maschi, con conservazione in freddo (4°C)dello sperma non ancora attivato, poi alla spremitura delle femmine e all'immediata fecondazione dopo attivazione dello sperma in acqua di mare a temperatura ambiente (20°C).
Circa 2 ore dopo la fecondazione, dopo un periodo di sedimentazione di qualche minuto, le uova sul fondo sono state scartate, mentre sono stati raccolti e conservati 6 grammi di uova galleggianti. Da un controllo effettuato al microscopio, immediatamente dopo la raccolta, è risultato un tasso di fecondazione del 43,5% della frazione a galla e una segmentazione più o meno irregolare nella maggiore parte delle uova fecondate. Quasi tutte le uova non galleggianti sono risultate sovra-mature.

Questo terzo lotto è stato trasferito la notte stessa presso l'avannotteria di Torre Cerrano. Considerando un numero di 1.428 uova / grammo, il presente lotto è stato stimato in un totale di 8.570 uova, di cui 3.730 fecondate (43,5%). Considerato il numero esiguo di uova accorpate dal lotto 2, il tasso di fecondazione medio del lotto 2-3 può essere considerato del 43,5 % uguale a quello del lotto 3.

Fecondazioni del 26 luglio 2006 - Lotto 4

In tale data sono state effettuate due fecondazioni successive ad un'ora d'intervallo. Un primo lotto (4a) risulta dalla fecondazione artificiale a secco, con 0,15 ml di sperma dei maschi E16 ed 87C diluito con acqua di mare nelle proporzioni di 1:6, di 8 grammi di uova provenienti dalla spremitura della femmina F5F e di 1-2 grammi di uova provenienti dalla spremitura della femmina B60. Un secondo lotto (4b)risulta dalla fecondazione artificiale a secco, con 0,15 ml di sperma del maschio B5E diluito con acqua di mare nelle proporzioni di 1:6, di 20 grammi di uova provenienti dalla spremitura della femmina 30F. In entrambi i casi, si è proceduto come per il lotto 3.
Dal primo lotto (4a), circa 3 ore dopo la fecondazione, dopo un periodo di sedimentazione di qualche minuto, le uova sul fondo sono state scartate, mentre sono stati raccolti e conservati 2 grammi di uova galleggianti. Da un controllo effettuato al microscopio, immediatamente dopo la raccolta, è risultato un tasso di fecondazione del 43% della frazione a galla e una segmentazione più o meno irregolare nella maggiore parte delle uova fecondate.
Dal secondo lotto(4b), circa 3 ore dopo la fecondazione, dopo un periodo di sedimentazione di qualche minuto, le uova sul fondo sono state scartate, mentre sono stati raccolti e conservati 18 grammi di uova galleggianti. Da un controllo effettuato al microscopio, immediatamente dopo la raccolta, è risultato un tasso di fecondazione del 73% della frazione a galla e una segmentazione

più o meno irregolare nella maggiore parte delle uova fecondate(stadio di divisione a 8-16 cellule). Il 100% delle uova non galleggianti è risultato essere sovra-maturo.

Dopo accorpamento dei 2 suddetti lotti del 26 luglio, per costituire il lotto 4, quest'ultimo è stato trasferito la notte stessa presso l'avannotteria di Torre Cerrano. Considerando un numero di 1.428 uova / grammo, il presente lotto è stato stimato in un totale di 28.560 uova (2.860+25.700), di cui 19.995 (1.230+18.765) fecondate (43% e 73%). Il tasso di fecondazione medio del lotto 4 risulta del 70%.

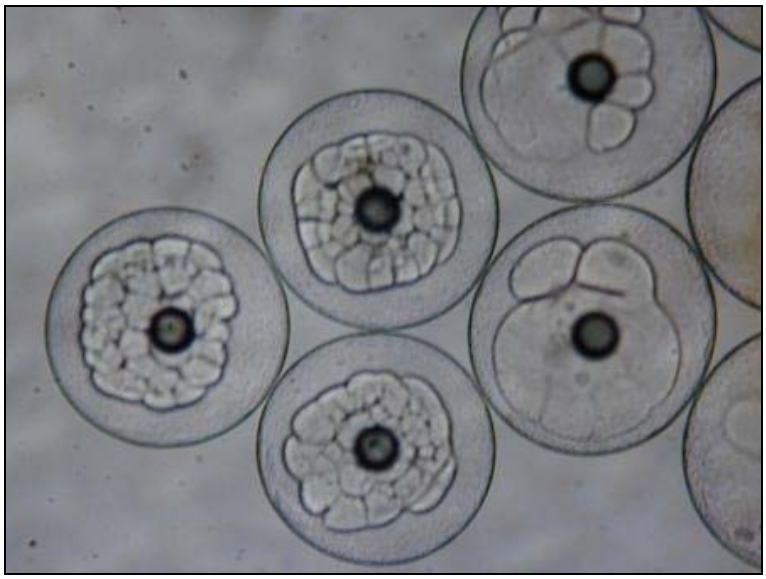


Figura 36. segmentazione irregolare- uova stadio 8-16 blastomeri lotto 4

Riepilogo dei risultati della fecondazione artificiale

I risultati delle 5 fecondazioni sono riassunti nella tabella sottostante.

Tabella 16. Risultati delle fecondazioni

Data fecondazione	Femmina	Uova ottenute	Maschio	Sperma utilizzato	Uova raccolte a galla			% di fecondazione	n° uova fecondate	Lotto
					Peso (g.)	% a galla	n° uova			
23 luglio	F5F B60	10 g. 1-2 g.	B5E	0,5 ml	6,0 g.	50,0 %	8.570	64,0 %	5.480	1
24 luglio	F5F B60	20 g. 1-2 g.	B5E E16	0,4 ml 0,1 ml	6,5 g.	31,0 %	9.280	16,5 %	1.530	2
25 luglio	F5F	16 g.	B5E E16	0,3 ml 0,1 ml	6,0 g.	37,5 %	8.570	43,5 %	3.730	3
26 luglio	F5F B60	8 g. 1-2 g.	E16 87C	0,05 ml 0,1 ml	2,0 g.	18,0 %	2.860	43,0 %	1.230	4
	30F	20 g.	B5E	0,15 ml	18,0 g.	90,0 %	25.700	73,0 %	18.765	

Il tasso di fecondazione è compreso tra il 16,5% ed il 73%, cioè piuttosto basso, il cambiamento nelle modalità di fecondazione non sembra avere prodotto un miglioramento significativo. Inoltre la segmentazione risulta irregolare in quasi tutte le uova fecondate osservate. Ciò può essere riconducibile a varie cause, quali la temperatura inferiore a quella ottimale, le manipolazioni a cui gli animali sono stati sottoposti, e, per alcune femmine, l'eccessivo lasso di tempo tra ovulazione e spremitura.

2.3 RISULTATI DELLE PROVE DI ALLEVAMENTO LARVALE

Dopo la fecondazione artificiale, le uova ottenute sono state trasferite presso l'avannotteria di Torre Cerrano per la conduzione di 2 cicli di allevamento larvale nella vasche V1 e V2.
Il trasporto è avvenuto con l'ausilio di un automezzo dotato di aria condizionata in contenitori da 30 litri, riempiti con 10-15 litri di acqua e il rimanente volume di ossigeno, collocati in un'apposita scatola coibentata mediante fogli di polistirolo.
Per i vari lotti le temperature di trasporto sono state le seguenti:

Lotto	*Temperatura alla partenza*	*Temperatura all'arrivo*	*Temperatura di destinazione*
Lotto 1	21,0°C	21°C	21,2°C
Lotto 2-3	21.0°C	21,5°C	21,4°C
Lotto 4	22,0°C	22,1°C	21,5°C

All'arrivo presso l'impianto di Torre Cerrano, i contenitori, ancora chiusi, sono stati immersi nella vasca di destinazione affinché le temperature interne ed esterne si potessero equilibrare. Raggiunta la temperatura, il contenitore è stato aperto e le uova fecondate sono state lasciate libere in vasca.

Ciclo V2 - Lotti 1-2-3

La vasca 2 è stata seminata in due volte, in data 24 luglio con uova del lotto 1 e in data 26 luglio con larve del lotto 2 e uova del lotto 3.
Il lotto 1, ottenuto dalla prova di fecondazione del 23 luglio, è stato trasferito presso l'impianto di Torre Cerrano il giorno stesso ed è stato seminato in V2 il giorno successivo:

- arrivo del lotto 1 presso Torre Cerrano alle 22.30 del 23 luglio;
- incubazione in n°2 volumi da 12 litri fino alle 17.00 del 24 luglio;
- decantazione prima della semina in vasca;
- semina nella vasca V2 alle 18.00 del 24 luglio;
- schiusa completata nella mattinata del 25 luglio.

I lotti 2 e 3, ottenuti dalle prove di fecondazione del 24 e del 25 luglio, accorpati come precedentemente descritto, sono stati trasferiti presso l'impianto di Torre Cerrano il 25 luglio ed sono stati seminati in V2 il giorno successivo:

- arrivo del lotto 2-3 presso Torre Cerrano alle 22.00 del 25 luglio;
- incubazione in n°2 volumi da 12 litri fino alle 22.00 del 24 luglio;
- schiusa di alcune uova del lotto 2 il 26 luglio;
- decantazione prima della semina in vasca;
- semina nella vasca V2 alle 22.30 del 26 luglio;
- schiusa completata nella mattinata del 27 luglio.

Dopo completamento della schiusa, in data 27 luglio, il gruppo in vasca era costituito da larve al giorno 2/1/0 dalla schiusa.

Incubazione e successiva decantazione

Considerata la scarsa quantità di uova del lotto 1 e dei lotti 2-3, si è deciso in entrambi i casi di procedere all'incubazione in 2 secchi da 12 litri, immersi in vasca in modo da non subire sbalzi termici. L'incubazione del primo lotto si è svolta alla temperatura di 21,2-21,6°C, mentre durante l'incubazione del secondo-terzo lotto si è avuta un progressivo aumento delle temperature da 21,5°a 23,9°C nell'arco di 24 ore.
In ogni secchio, un punto di aerazione centrale, regolato al minimo, ha assicurato una corretta ossigenazione dell'acqua, nonché una minima circolazione della stessa tale da mantenere le uova in sospensione e distribuiti in modo omogeneo. Salvo nel caso del lotto 3, in cui è stato registrato un calo di ossigeno a 5,7 ppm (giorno -1), le concentrazioni di ossigeno disciolto sono rimaste costanti nell'intervallo 7,5-8,0 mg/litro. Per tutto il periodo di incubazione la luce è rimasta sempre spenta.

Prima della semina in vasca, le uova sono state selezionate una seconda volta mediante decantazione. Dopo avere interrotto l'erogazione dell'aria nei secchi, le uova rimaste a galla sono state trasferite nella vasca V2, mentre quelle sedimentate sul fondo sono state contate e successivamente eliminate.

Lotto	*Uova raccolte post-fecondazione*	*Uova trasferite a Torre Cerrano*	*Uova scartate dopo decantazione*	*Uova seminate in vasca*
Lotto 1	8.570	8.570	3.900	4.670
Lotto 2	9.280	100 (1)	9.180 (1)	100
Lotto 3	8.570	8.570	8.000	570
Totale	26.420	17.240	21.080	5.340
	(100 %)	-	(79,8%)	(20,2%)

(1) Processo di decantazione svolto presso la COISPA.

Nelle operazioni di semina nella V2 sono state trasferite complessivamente 5.340 uova, con una densità iniziale di circa 6 uova/litro.

Condizioni di schiusa e di allevamento larvale

I rilevamenti giornalieri sono riportati in allegato 6. Nel corso del ciclo le condizioni in vasche sono state le seguenti:

- temperatura di 21,8 ± 0,2°C nei primi 2 giorni, in aumento fino a 23,9°C il terzo giorno e di poi stabile intorno a 24,4 ± 0,5°C fino alla conclusione del ciclo;
- ossigeno disciolto mediamente tra 7,1 e 8,5 mg/l;
- nitriti tra 0,01 e 0,09 mg/litro (misure interrotte nel corso del ciclo);
- luce inizialmente spenta, poi accesa in corrispondenza dell'inizio dell'alimentazione (08.30 alle 21.00);
- unico punto di aerazione centrale, senza pietra porosa;
- filtro di superficie con rete da 55µm;
- fino a giorno 4/3/2 vasca isolata dall'impianto, poi ricambio in vasca a circuito chiuso con portata media di 1,1 litro/minuto da giorno 5/4/3.

L'aumento della temperatura si è verificato tra la schiusa del lotto 1 e quella del lotto 3, immediatamente dopo la semina in vasca del primo lotto. Tale aumento è stato determinato dall'impossibilità, una volta eseguita la semina in V2, di mantenere un ricambio sufficiente al mantenimento della temperatura, la quale si è progressivamente assestata sui valori di temperatura ambiente.

Tabella 17. Sintesi del ciclo larvale in vasca V2

Data	Giorno	Semine	Pulizia del fondo	Spurgo	Rimanenza in vasca	Osservazioni
24 luglio	-1	+ 4.670			4.670	Semina in vasca del lotto 1 (ore 17.00)
25 luglio	0		- 850		3.820	Schiusa uova lotto 1
26 luglio	1/0/-1	+ 670	- 20	- 3.840	630	Semina in vasca de lotti 2-3 (ore 22.30)
27 luglio	2/1/0			- 360	270	Schiusa uova lotto 3
28 luglio	3/2/1			- 70	200	Inizio somministrazione dei rotiferi
29 luglio	4/3/2				200	
30 luglio	5/4/3			- 35	165	
31 luglio	6/5/4				165	
01 agosto	7/6/5				-	Vasca eliminata

Oltre alla conta delle uova e delle larve raccolte a fondo vasca e/o nello spurgo, sono state eseguiti una serie di stime visive al fine di avere una stima più attendibile della popolazione in vasca. Immediatamente dopo la semina in vasca, tali stime hanno evidenziato un notevole calo di densità, poi confermato nelle operazioni di pulizia e di spurgo. In data 27 luglio e 28 luglio, a conferma dei dati riportati in tabella 11, la popolazione di larvale in vasca è stata stimata rispettivamente pari a 980 e 370 soggetti. Il 29 luglio, si stimava visivamente un massimo di 50-100

larve in vasca. Il giorno successivo (giorno 5/4/3) sono state individuate solo poche larve in uno stato moribondo, con sacco vitellino esaurito e tutte non alimentate. Il 02 agosto, a giorno 8/7/6 dopo la schiusa, il ciclo è stato eliminato per assenza di larve vive.
Dai 3 lotti seminati, si stima siano schiuse da 500 a 1.000 larve, ossia il 7 % delle uova fecondate osservate nel primo controllo effettuato 2-3 ore dopo la fecondazione (10.740 uova fecondate per i 3 lotti - Vedere tabella 10).
Dopo la schiusa e fino all'eliminazione della vasca V2, il numero di larve raccolte dalla pulizia del fondo e dagli spurghi è risultato comunque trascurabile ed ammonta ad un massimo di qualche centinaio di esemplari. Sia prima che dopo la schiusa sono state raccolti notevoli quantità di uova in cui si è osservato un blocco dello sviluppo embrionale a diversi stadi.

Nel lotto 1, durante l'incubazione, rispetto ai 6 grammi raccolti e trasferiti presso Torre Cerrano (8.570 uova di cui 5.480 fecondate), sono state scartate 4.750 uova pari al 55,4 % del lotto. Nel lotto 2, entro 36 ore dalla fecondazione e prima del trasferimento presso Torre Cerrano, sono state scartate 9.180 uova pari al 98,9 % del lotto. Infine, nel lotto 3, sempre durante l'incubazione, rispetto ai 6 grammi raccolti e trasferiti presso Torre Cerrano (8.570 uova di cui 3.730 fecondate), sono state scartate almeno 8.000 uova pari al 93,3% del lotto. In tutti casi la percentuale di scarto ha superato la percentuale di uova non fecondate, a dimostrazione del fatto che il basso tasso di schiusa deriva da una duplice causa: da un parte, l'alta percentuale di uova non fecondate e dall'altra il blocco dello sviluppo embrionale sopra-citato. Tale situazione è probabilmente da mettere in correlazione con la segmentazione irregolare riscontrata già dalle prime divisioni cellulari. Tuttavia, altri fattori come lo stress derivante dal trasporto o l'aumento della temperatura cui è stato sottoposto il terzo lotto, potrebbero avere influito negativamente sullo sviluppo dell'uovo.
Dai controlli effettuati sulle uova del lotto 1, raccolte a fondo vasca o nello spurgo al momento della schiusa ed il giorno successivo, comunque prima della semina in vasca del lotto 2-3, è risultato un blocco dello sviluppo prima della formazione dell'embrione nel 78,5% delle uova osservate e un blocco dello sviluppo ad embrione già abbozzato nel 1,5 % delle uova osservate. Il restante 20% era costituito da uova non fecondate.
Considerando lo scarto del 45,5% delle uova del lotto 1 all'atto del trasferimento in vasca e il fatto che il presente campione non è rappresentativo della situazione in vasca, ma solo delle uova raccolte sul fondo, non è possibile confrontare le percentuali ottenute con quelle registrate 2-3 ore dopo la fecondazione.

Tabella 18. controllo delle uova di scarto del lotto 1 (vasca V2)

Descrizione delle uova osservate	25 luglio n° %	26 luglio n° %	Media n° %	Interpretazione
Uova trasparenti, con globulo lipidico nella norma e senza impurità di sorta	13 37,1 %	12 40,0 %	25 38,5 %	Uova fecondate, abortite poco prima del momento in cui sono state osservate
Uova trasparenti, con globulo lipidico nella norma, ma con lievi impurità interne				Uova fecondate, abortite 3-6 ore prima del momento in cui sono state osservate
Uova con area opaca o biancastra almeno pari ad un quarto della superficie visibile	16 45,7 %	10 33,3 %	26 40,0 %	Uova fecondate abortite da 12-24 ore prima del momento in cui sono state osservate
Uova totalmente opaca in modo abbastanza uniforme, dove si riesce ad individuare la bozza dell'embrione	1 2,9 %	0 0,0 %	1 1,5 %	Uova fecondate abortite da più di 24 ore prima del momento in cui sono state osservate.
Uova totalmente opaca in modo abbastanza uniforme, senza che si riesca ad individuare particolari conformazioni	5 14,3 %	8 26,7 %	13 20,0 %	Uova non fecondate
TOTALE	**35**	**30**	**65**	

Da un controllo svolto sulle uova del lotto 2-3, raccolte in uno dei secchi alla fine della fase di incubazione, è risultato un 12.9% di uova con sviluppo embrionale nella norma, mentre il 58,1% ha presentato un blocco dello sviluppo a vari stadi. Il restante 29% era costituito da uova non fecondate.

Tabella 19. Controllo delle uova di scarto del lotto 2-3 (vasca V2)

Descrizione delle uova osservate	26 luglio n° %	Interpretazione
Uova lievemente traslucidi e con embrione nella norma	8 12,9 %	Sviluppo nella norma
Uova trasparenti, con globulo lipidico nella norma e senza impurità di sorta	8 12,9 %	Uova fecondate, ancora vive con probabile blocco dello sviluppo
Uova trasparenti, con globulo lipidico nella norma, ma con lievi impurità interne	14 22,6 %	Uova fecondate, abortite da 3-6 ore. Blocco dello sviluppo
Uova con area opaca o biancastra almeno pari ad un quarto della superficie visibile	14 22,6 %	Uova fecondate abortite da 12-24 ore. Blocco dello sviluppo
Uova totalmente opaca in modo abbastanza uniforme, senza che si riesca ad individuare particolari conformazioni	18 29,0 %	Uova non fecondate
TOTALE	**62**	

Queste osservazione confermano sia le notevoli percentuali di uova non fecondate, sia un blocco dello sviluppo embrionale a vari stadi, con conseguenti basse percentuali di schiusa.

Somministrazione delle alghe

Il ciclo in vasca V2 è stato condotto con la tecnica detta delle "acque verdi", tecnica prescelta per i vari vantaggi che presenta:

- attenuazione dell'intensità luminosa in vasca;
- maggiore stabilità dei vari parametri chimici per effetto “tampone” del metabolismo algale
- apporto alimentare per i rotiferi presenti in vasca;
- apporto nutrizionale (vitamine e acidi grassi polinsaturi) per le larve.

Le alghe del ceppo *Nannochloropsis sp.* sono state introdotto in vasca immediatamente dopo la semina del lotto 1 in modo da ottenere una concentrazione in vasca di circa 500.000 cellule algali per cc. Dall’accensione della luce e dall’inizio della somministrazione dei rotiferi , la concentrazione in vasca è stata portata a 1.000.000 cellule per cc.
Le concentrazioni finali sono riassunte nelle tabelle successive.

Tabella 20. alghe somministrate in vasca V2

Data	Giorno	Alghe A.M.		Alghe P.M.		Osservazioni
		Aggiunta	Concentrazione (cellule/cc)	Aggiunta	Concentrazione (cellule/cc)	
24 luglio	-1	si	500.000	no	500.000	Semina in vasca del lotto 1 (ore 17.00)
25 luglio	0	no	" "	no	" "	Schiusa uova lotto 1
26 luglio	1/0/-1	no	" "	no	" "	Semina in vasca de lotti 2-3 (ore 22.30)
27 luglio	2/1/0	no	" "	no	" "	Schiusa uova lotto 3
28 luglio	3/2/1	no	" "	si	1.250.000	Inizio somministrazione dei rotiferi
29 luglio	4/3/2	no	1.450.000	no	1.250.000	
30 luglio	5/4/3	no	1.100.000	no	" "	Inizio ricambio in vasca
31 luglio	6/5/4	si	1.000.000	no	1.025.000	
01 agosto	7/6/5	si	1.000.000	si	975.000	Vasca eliminata

Somministrazione dei rotiferi

Malgrado la scarsa densità di larve in vasca, la prima somministrazione di rotiferi è iniziata come da programma al terzo giorno dopo la schiusa del lotto 1, Nei giorni successivi la concentrazione in vasca è stata progressivamente aumentata da 2 a 7,5 rotiferi/cc.
I rotiferi arricchiti per la mattina erano filtrati alle 09.00 e disponibili fino alle 14.00 (5 ore), mentre quelli per il pomeriggio erano filtrati alle 15.00 e disponibili fino alle 21.00 (6 ore). Dopo la prima somministrazione della mattina (ore 09.00) e del pomeriggio (ore 15.00), la concentrazione di rotiferi in vasca era mantenuta costante, mediante controlli nel numero rimasto in vasca e successiva integrazione quando necessario (controlli ogni 2-3 ore).
I quantitativi giornalieri somministrati in entrambi i cicli sono riassunti nelle tabelle successive.
Le concentrazioni finali sono riassunte nelle tabelle successive.

Tabella 2. rotiferi somministrati in vasca V2

Data	Giorno	Rotiferi A.M.		Rotiferi P.M.		Osservazioni
		Aggiunta	Concentrazione (n°/cc)	Aggiunta	Concentrazione (cellule/cc)	
28 luglio	3/2/1	no	-	si	2,0	Inizio somministrazione dei rotiferi P.M.
29 luglio	4/3/2	si	5,0	no	4,6	
30 luglio	5/4/3	si	7,5	no	7,5	Inizio ricambio in vasca
31 luglio	6/5/4	no	" "	no	8,7	
01 agosto	7/6/5	no	> 20,0	no	> 20	Vasca eliminata

L'incremento finale delle concentrazioni è riconducibile all'assenza di predazione da parte delle larve e alla riproduzione dei rotiferi in vasca.

Ciclo V1 (lotto 4)

La vasca 1 è stata seminata con un unico lotto di uova. Il lotto 4, ottenuto dalla prova di fecondazione del 26 luglio, è stato trasferito presso l'impianto di Torre Cerrano e seminato direttamente in V1 il giorno stesso. Diversamente dal ciclo V2, l'incubazione si è svolta in vasca e non si è proceduto alla decantazione come descritto precedentemente.

- arrivo del lotto 4 presso Torre Cerrano alle 23.30 del 26 luglio;
- semina nella vasca V1 alle 23.30 del 26 luglio;
- schiusa completata nella mattinata del 28 luglio.

Dopo completamento della schiusa, in data 28 luglio, le larve in vasca erano a giorno 0.

Lotto	*Uova raccolte post-fecondazione*	*Uova trasferite a Torre Cerrano*	*Uova scartate dopo decantazione*	*Uova seminate in vasca*
Lotto 4a	2.860	2.860	-	2.860
Lotto 4b	25.700	25.700	-	25.700
Totale	28.560	28.560	0	28.560

Nella semina della V1 sono state trasferite un totale di 28.560 uova, con una densità iniziale di circa 32 uova/litro.

Condizioni di schiusa e di allevamento larvale

I rilevamenti giornalieri sono riportati in allegato 8. Nel corso del ciclo le condizioni in vasche sono state le seguenti:

- temperatura di 21,5°C all'atto della semina, in aumento progressivo fino a 24,3°C nei due giorni successivi (incubazione e schiusa) e poi stabile intorno a 24,5 ± 0,5°C fino alla conclusione del ciclo;
- ossigeno disciolto tra 7,5 e 8,5 mg/l;
- nitriti tra 0,05 e 0,08 mg/litro (misure interrotte nel corso del ciclo);
- luce inizialmente spenta, poi accesa in corrispondenza dell'inizio dell'alimentazione (08.30 alle 21.00);
- unico punto di aerazione centrale, senza pietra porosa;
- filtro di superficie con rete da 55µm;
- fino a giorno 2 vasca isolata dall'impianto, poi ricambio in vasca a circuito chiuso con portata media di 0,9 litro/minuto.

Come accennato per il ciclo precedente, l'aumento della temperatura che si è verificato durante la schiusa del lotto 4, è stato determinato dall'impossibilità, una volta eseguita la semina in V1, di mantenere un ricambio sufficiente al mantenimento della temperatura, la quale si è progressivamente assestata sui valori di temperatura ambiente.

Tabella 22. Sintesi del ciclo larvale in vasca V1

Data	Giorno	Semine	1° spurgo	2° spurgo	Rimanenza in vasca	Osservazioni
26 luglio	-2	+ 28.560			28.560	Semina in vasca del lotto 4 (ore 23.30)
27 luglio	-1		- 11.730	- 5.640	11.190	
28 luglio	0		- 7.980	- 960	2.250	Schiusa uova lotto 4
29 luglio	1		- 450		1.800	
30 luglio	2		- 125		1.675	spurgo: 75 uova e 50 larve morte
31 luglio	3				1.675	Inizio somministrazione dei rotiferi
01 agosto	4				-	Vasca eliminata

Oltre alla conta delle uova e delle larve raccolte a fondo vasca e/o nello spurgo, sono state eseguiti una serie di stime visive al fine di avere una stima più attendibile della popolazione in vasca. Immediatamente dopo la semina in vasca, tali stime hanno evidenziato un notevole calo di densità, poi confermato nelle operazioni di pulizia e di spurgo. In data 28 luglio (giorno 0), sulla delle conte di controllo, si è stimata una rimanenza in vasca di circa 1.500

larve. A giorno 1 e giorno 2, secondo lo stesso procedimento, la popolazione larvale in vasca è stata stimata rispettivamente di circa 500 larve e di 200-300 larve. Le suddette stime hanno evidenziato una popolazione in vasca inferiore a quella ricavata in tabelle 16. All'inizio dell'alimentazione esogena (giorno 3) la rimanenza in vasca è risultata quasi nulla. Come nel ciclo precedente il riassorbimento del sacco vitellino è apparso precoce, e non sono state osservate larve alimentate. Alcune larve controllate a giorno 3 hanno mostrato un sacco vitellino totalmente riassorbito e un globulo lipidico molto ridotto, allorché la bocca non era ancora aperta. Il 02 agosto, a giorno 5 dopo la schiusa, il ciclo è stato eliminato per assenza di larve vive. Si stima siano schiuse circa 1.500 larve, ossia il 7,5 % delle uova fecondate osservate nel primo controllo effettuato 2-3 ore dopo la fecondazione (19.995 uova fecondate - Vedere tabella 16).

Dopo la schiusa e fino all'eliminazione della vasca V2, il numero di larve raccolte dalla pulizia del fondo e dagli spurghi è risultato trascurabile ed ammonta ad un massimo di qualche centinaio di esemplari. Sia prima che dopo la schiusa sono state raccolti notevoli quantità di uova in cui si è osservato un blocco dello sviluppo embrionale a diversi stadi.
Alla luce delle mortalità registrate nel primo ciclo, le uova seminate in vasca V1 sono state sottoposte ad un controllo iniziale al fine di ottenere ulteriori indicazione su tempi e modalità del blocco dello sviluppo embrionale. All'arrivo delle uova presso l'impianto di Torre Cerrano, circa 12 ore dopo la fecondazione, il 60,9% delle uova presentavano una aspetto apparentemente normale, mentre il 16,6% delle uova mostravano anomalie con i primi segni di un blocco dello sviluppo embrionale. Il restante 22,5% era costituito da uova non fecondate.
La percentuale del 77,5% di uova fecondate conferma sostanzialmente la percentuale media del 70 % riscontrata 2-3 ore dopo la fecondazione artificiale.

Tabella 23. controllo delle uova seminate in vasca V1

Descrizione delle uova osservate	26 luglio (n° e %)	Interpretazione
Uova trasparenti, con globulo lipidico nella norma e senza impurità di sorta (Ø int. = Ø est.)	84 60,9 %	Uova fecondate e sviluppo nella norma
Uova trasparenti, con globulo lipidico nella norma e senza impurità di sorta (Ø int. < Ø est.)	13 9,4 %	Uova fecondate con spazio peri-vitellino anomalo
Uova trasparenti, con globulo lipidico nella norma, ma con aree lievemente opache (Ø int. = Ø est.)	10 7,2 %	Primi sintomi di blocco dello sviluppo e scarsa galleggiabilità
Uova trasparenti, con globulo lipidico nella norma, ma con aree opache fino ad un quarto della superficie visibile	19 13,8 %	Uova non fecondate
Uova trasparenti, con globulo lipidico nella norma, ma con aree opache fino oltre metà della superficie visibile	12 8,7 %	
TOTALE	**138**	

Infine, dai controlli svolti sulle uova di scarto dei 2 spurghi effettuati a giorno -1, è risultato un ritardo e/o un blocco dello sviluppo prima della formazione della corda nel 66% delle uova osservate. Solo un 2,7% presentava uno sviluppo embrionale nella norma. Il restante 39,3% era costituito da uova non fecondate.

Tabella 24. Controllo delle uova di scarto del lotto 4 (vasca V1)

Descrizione delle uova osservate	27 luglio (n° e %)	27 luglio (n° e %)	Media (n° e %)	Interpretazione
Uova lievemente traslucide e normalmente embrionale	3 4,3 %	0 0,0 %	3 2,7 %	Sviluppo nella norma
Uova lievemente traslucide, ma nei quali non risulta la bozza dell'embrione	1 1,4 %	0 0,0 %	1 0,9 %	Ritardo nello sviluppo
Uova trasparenti, con globulo lipidico nella norma e senza impurità di sorta (Ø int. = Ø est.)	2 2,9 %	3 7,1 %	8 7,1 %	Uova fecondate, non ancora del tutto abortite, ma con blocco dello sviluppo e/o anomalie
Uova trasparenti, con globulo lipidico nella norma, ma con lievi impurità interne (Ø int. < Ø est.)	2 2,9 %	1 2,4 %		
Uova con area opaca o biancastra almeno pari ad un quarto della superficie visibile	35 50,0 %	21 50,0 %	56 50,0 %	Uova fecondate abortite da 12-24 ore. Blocco dello sviluppo
Uova totalmente opaca in modo abbastanza uniforme, senza che si riesca ad individuare particolari conformazioni	27 38,6 %	17 40,5 %	44 39,3 %	Uova non fecondate
TOTALE	**70**	**42**	**112**	

Queste osservazione confermano quanto già evidenziato in V2 e mettono in luce, oltre ad un blocco ricorrente dello sviluppo embrionale, un ritardo dello stesso in numerose uova.

Somministrazione delle alghe

Il ciclo V1, come quello precedente e con le stesse modalità, è stato condotto con la tecnica detta delle "acque verdi". Le alghe del ceppo *Nannochloropsis sp.* sono state introdotto in vasca il giorno dopo la semina del lotto in modo da ottenere una concentrazione in vasca di circa 500.000 cellule algali per cc. Dall'accensione della luce e dall'inizio della somministrazione dei rotiferi , la concentrazione in vasca è stata portata a 1.000.000 cellule per cc.
Le concentrazioni finali sono riassunte nelle tabelle successive.

Tabella 25. :alghe somministrate in vasca V1

Data	Giorno	Alghe A.M.		Alghe P.M.		Osservazioni
		Aggiunta	Concentrazione (cellule/cc)	Aggiunta	Concentrazione (cellule/cc)	
26 luglio	-2	no	-	no	-	Semina in vasca de lotti 4 (ore 23.30)
27 luglio	-1	no	-	si	690.000	
28 luglio	0	no	" "	no	" "	Schiusa uova lotto 4
29 luglio	1	no	825.000	no	730.000	
30 luglio	2	no	525.000	no	" "	Inizio ricambio in vasca
31 luglio	3	si	1.000.000	no	1.200.000	Inizio somministrazione dei rotiferi
01 agosto	4	si	1.000.000	si	1.000.000	Vasca eliminata

Somministrazione dei rotiferi

Malgrado la scarsa densità di larve in vasca, la prima somministrazione di rotiferi è iniziata come da programma al terzo giorno dopo la schiusa del lotto 4, Nei giorni successivi la concentrazione in vasca è stata progressivamente aumentata da 2 a 7,5 rotiferi/cc.

Tabella 26. rotiferi somministrati in vasca V1

Data	Giorno	Rotiferi A.M.		Rotiferi P.M.		Osservazioni
		Aggiunta	Concentrazione (n°/cc)	Aggiunta	Concentrazione (cellule/cc)	
30 luglio	5/4/3	no	-	no	-	Inizio ricambio in vasca
31 luglio	6/5/4	si	1,9	si	4,0	Inizio somministrazione dei rotiferi A.M.
01 agosto	7/6/5	si	6,7	si	7,5	Vasca eliminata

Considerazioni

Le osservazioni effettuate sulle uova dei 4 lotti hanno confermato un tasso di fecondazione di circa il 50-60% in entrambe le popolazioni di uova seminate. Delle uova fecondate, il 10-15% a 24-36 h dalla fecondazione ha mostrato una lieve anomalia di galleggiamento ed un inizio di deposito indicanti l'inizio del blocco dello sviluppo embrionale. Il restante 70-90% raccolto al momento degli spurghi e delle pulizie del fondo vasca ha mostrato un arresto dello sviluppo prima della formazione della notocorda.
Dall'analisi dei risultati si evince un blocco dello sviluppo nel 70-90% delle uova fecondate esaminate in ogni lotto di uova. Quasi tutte le uova esaminate hanno abortito prima della formazione dell'embrione, nel 40% dei casi l'aborto è avvenuto allo stadio di morula mentre nel 30% è avvenuto ad uno stadio di sviluppo più tardivo.
Le possibili cause all'origine della segmentazione irregolare e del successivo blocco dell'embriogenesi sono:

- assenza di condizionamento termico stagionale;
- temperatura dell'acqua inferiore a quella stagionale;
- sfasamento dei tempi di spremitura e fecondazione;
- impatto dello stress acuto (manipolazioni) e cronico (cattività);

Inoltre si sono registrate bassissime percentuali di schiusa rilevate per le due popolazioni di uova fecondate seminate e pari al 7-7,5%. L'andamento delle mortalità è stato simile per i due cicli. Nei giorni successivi alla schiusa la popolazione larvale di entrambe le vasche si è dimezzata fino ad esaurirsi nei 5-6 giorni successivi. L'alta mortalità delle uova durante la fase di incubazione e delle larve durante la fase di allevamento può essere principalmente riconducibile alla scarsa qualità delle uova. Tra le possibili cause dell'elevata mortalità post-schiusa, oltre a quelle indicate per il blocco dello sviluppo embrionale e problemi di gestione riconducibili ai repentini sbalzi termici pari a 2°C a cui i lotti 2-3 e 4 sono stati sottoposti rispettivamente durante le operazioni di trasferimento in vasca e nel corso della fase di incubazione.
L'ipotesi più attendibile è il precoce impoverimento delle riserve vitelline prima dell'apertura funzionale della bocca come confermato dalle osservazioni effettuate sulle larve prelevate dagli spurghi che mostrano chiaramente scarse riserve vitelline e l'assenza del globulo lipidico prima dell'apertura della bocca.

2.4 LA POPOLAZIONE AUTOCTONA DI CERNIA BRUNA *Epinephelus marginatus*

Il monitoraggio condotto nel periodo compreso tra Aprile e Giugno 2006 nelle acque abruzzesi non ha permesso l'avvistamento di esemplari selvatici di *Epinephelus marginatus* (tabella 27).

Tabella 27. Monitoraggio cernia (*Epinephelus marginatus*) lungo la costa abruzzese

Immersioni sub professionista	Data	Località	Coordinate d'immersione	Esito avvistamenti e campionamenti
1	24 apr.2006	Fossacesia (CH)	Lat. 42° 15.590' N - Long. 14° 30.506' E	Negativo
		Punta cavalluccio, Fossacesia (CH)	Lat. 42° 16.923' N - Long. 14° 29.602' E	
2	26 apr.2006	Faro di Ortona (CH)	Lat. 42° 21.555' N - Long. 14° 24.553' E	Negativo
		Lido riccio di Ortona (CH)	Lat. 42° 22.703' N - Long. 14° 22.569' E	
3	5 mag.2006	Punta D'Erci, Vasto (CH)	Lat. 42° 10.72' N - Long. 14° 41.270' E	negativo
		Piattaforma S.S.M.4	Lat. 42° 12.442' N - Long. 14° 40.515'E	
4	9 maggio 2006	Piattaforma S.S.M.1	Lat. 42° 13.906' N - Long. 14° 35.590' E	negativo
		Piattaforma S.S.M.3-7	Lat. 42° 13.156' N - Long. 14° 36.974' E	
		Piattaforma S.S.M.8	Lat. 42° 13' N - Long. 14° 38.595' E	
5	11 giug.2006	Isole Tremiti	Lat. 42° 07' N - Long. 15° 30' E	negativo
6	26 giug.2006	Punta penna, Vasto (CH)	Lat. 42° 10.640' N - Long. 14° 42.670' E	negativo
		Villa Vignola, Vasto (CH)	Lat. 42° 08.910' N - Long. 14° 43.050' E	
7	28 giug.2006	Vallevò, Rocca san Giovanni (CH)	Lat. 42° 17.310' N - Long. 14° 28.725' E	negativo
		San Vito Chetino (CH)	Lat. 42° 17.815' N - Long. 14° 27.892' E	
8	30 giug.2006	Zona relitto del vaporetto, Fossacesia (CH)	Lat. 42° 15.610' N - Long. 14° 30.739' E	negativo

Lo stesso risultato è stato ottenuto dalla immersione effettuata nella zona C (riserva parziale) della riserva naturale marina delle Tremiti.

La collaborazione con i servizi veterinari dei mercati ittici ha permesso il reperimento, nelle date 12 e 17 Maggio 2006, presso mercato ittico di Giulianova (TE), di due esemplari del Genere *Epinephelus* prelevati nella zona antistante Roseto degli abruzzi (TE) rispettivamente nei seguenti punti Lat. 42° 49.42' N - Long. 014° 25.30' E e Lat. 42° 58.38' N - Long. 014° 26.30' E.
La identificazione della specie, effettuata per mezzo dello catalogo FAO specifico per la famiglia *Epinephelidae* (Heemstra *et al* 1993), ha determinato entrambi gli esemplari come *Epinephelus caninus* (Figura 37).

Il mancato avvistamento di esemplari selvatici di cernia *Epinephelus marginatus* può essere spiegata considerando la distribuzione della specie in Adriatico, diffusa soprattutto nella zona orientale, intorno alle isole del medio Adriatico e nelle acque meridionali, mentre risulta essere molto rara nella zona settentrionale e poco frequente nel medio Adriatico (Glamuzina &t al., 1999). Inoltre, dagli studi condotti da Glamuzina &t al.,1999 sullo stato della popolazione naturale di cernie presenti in Adriatico la specie *Epinephelus marginatus* risulta essere soggetta ad una forte pressione di pesca che ne ha determinato un declino della popolazione selvatica negli ultimi decenni. *Epinephelus marginatus* infatti è l'unico della famiglia Serranidae ad essere inserito nell'elenco delle specie delle specie minacciate (ECNC1998).

Figura 37. Esemplare di *Epinephelus caninus*

2.5 RISULTATO DELL'ANALISI DEI MICROSATELLLITI

I 10 esemplari di cernie esaminate sono candidate all'allevamento anche a scopo di successivo ripopolamento in natura. Considerando questa finalità, è stato stilato un profilo genetico individuale per verificare che la variabilità genetica del gruppo di riproduttori sia rappresentativa di quella della popolazione in natura. Il confronto è stato effettuato con i dati pubblicati in De Innocentis *et al.* (2001).

Tutti e sette i loci microsatelliti si sono mostrati polimorfi (Tabella 28). Sono stati evidenziati da 2 alleli (locus GAG007) a 9 (locus GAG038). I valori di eterozigosi attesa (He) per locus sono stati da 0.46 (GAG023) a 0.84 (GAG038), mentre i valori medi di Ho e He sono stati di 0.60 e 0.66, rispettivamente. Non è stato evidenziato uno scostamento statisticamente significativo tra eterozigosi osservata e attesa ($P < 0.001$).

Complessivamente, il livello di variabilità genetica del campione di cernie analizzate in questa sede non si discosta dai dati ottenuti precedentemente per la popolazione di cernie dello Jonio analizzate da De Innocentis et al. (2001). Si osserva che i valori medi di eterozigosi osservata e attesa sono quasi sovrapponibili, nonostante qualche differenza nei valori dei singoli loci, come per esempio nel locus GAG007, per il quale il nostro campione mostra una eterozigosi osservata quasi doppia rispetto ai dati di De Innocentis et al. (2001).

Anche per quanto riguarda l'indice di consanguineità Fis, i dati sono molto simili. In media, valori altamente positivi (Fis va da 0 a 1) indicano un deficit significativo di eterozigoti e, dunque, un livello significativamente alto di consanguineità.

In generale, quindi, la comparazione dei dati descrittivi riportati in Tabella 28 evidenzia che gli esemplari di cernia analizzati in questo progetto sono simili a quelli pescati nelle stesse zone e analizzati precedentemente da altri Autori. Un dato importante è rappresentato dal fatto che i nostri campioni sono portatori, ai sette loci microsatelliti analizzati, della maggior parte delle varianti alleliche, il che significa che questi individui verosimilmente contengono buona parte della variabilità genetica presente nella popolazione in natura.

Tabella 28. Variabilità genetica a 7 loci microsatelliti di 10 esemplari di Epinephelus marginatus

Locus	Dimensione del campione		Numero di alleli		Eterozigosi osservata		Eterozigosi attesa		Indice di consanguineità (Fis)	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
GAG007	10	14	2	2	0.60	0.36	0.50	0.50	-0.149	0.286
GAG010	10	14	7	8	0.70	0.64	0.80	0.80	0.182	0.204
GAG023	10	14	3	5	0.00	0.21	0.46	0.74	1.00	0.719
GAG038	10	14	9	12	1.00	0.71	0.84	0.91	-0.146	0.222
GAG045	10	14	6	11	0.70	1.00	0.71	0.87	0.067	-0.156
GAG049	10	14	5	6	0.40	0.57	0.57	0.73	0.345	0.227
EM10	9	14	5	10	0.78	0.93	0.73	0.88	0.026	-0.053
Valori medi	9.8	14	5.3	7.7	0.60	0.63	0.66	0.78		

A = questo studio, B = dati tratti da Innocentis et al. (2001).

Considerazioni

I risultati del presente studio, ottenuti analizzando 10 cernie selvatiche, ovvero pescate in natura e non prole nata in allevamento, indicano che questi esemplari possono essere utilizzati come fondatori di un gruppo di riproduttori. Le generazioni che da questi riproduttori avranno origine conterranno la maggior parte delle varianti alleliche presenti nella popolazione che vive attualmente nel Mare Jonio e saranno quindi rappresentative della popolazione selvatica. Le re-immissioni in natura della progenie di questi riproduttori contribuiranno alla salvaguardia e alla conservazione di questa importante e vulnerabile specie, ormai così poco frequente nei nostri mari. E' importante sottolineare infatti che non è stato possibile disporre di esemplari del Mar Adriatico.

2.6 RISULTATO DEI PARAMETRI EMATICI

Analisi descrittiva di cellule ematiche di Cernia bruna (*Epinephelus marginatus*)

L'analisi di strisci ottenuti da sangue periferico di *Epinephelus marginatus* ha evidenziato la presenza dei diversi tipi di cellule: eritrociti, linfociti, granulociti neutrofili ed eosinofili, monociti e trombociti; non si è riscontrata la presenza di granulociti basofili.

Sono state riscontrate due tipologie di eritrociti: immaturi e maturi (figura 38A). Il primo tipo, meno frequente, si presenta come cellule tonde o ovali provviste di un grande nucleo ovale centrale; il secondo tipo ha forma più affusolata con un nucleo centrale, ovale, di dimensioni minori rispetto al precedente. Il citoplasma è eosinofilo ed assume una colorazione rossastra mentre il nucleo appare rosso-violetto.

I linfociti hanno dimensioni minori rispetto agli eritrociti, forma sferica e risultano spesso provvisti di processi citoplasmatici. Il nucleo, anch'esso sferico, occupa gran parte del citoplasma ed assume una colorazione blu-violetto; il citoplasma, spesso ridotto ad un sottile anello, si colora in blu (figura 38B).

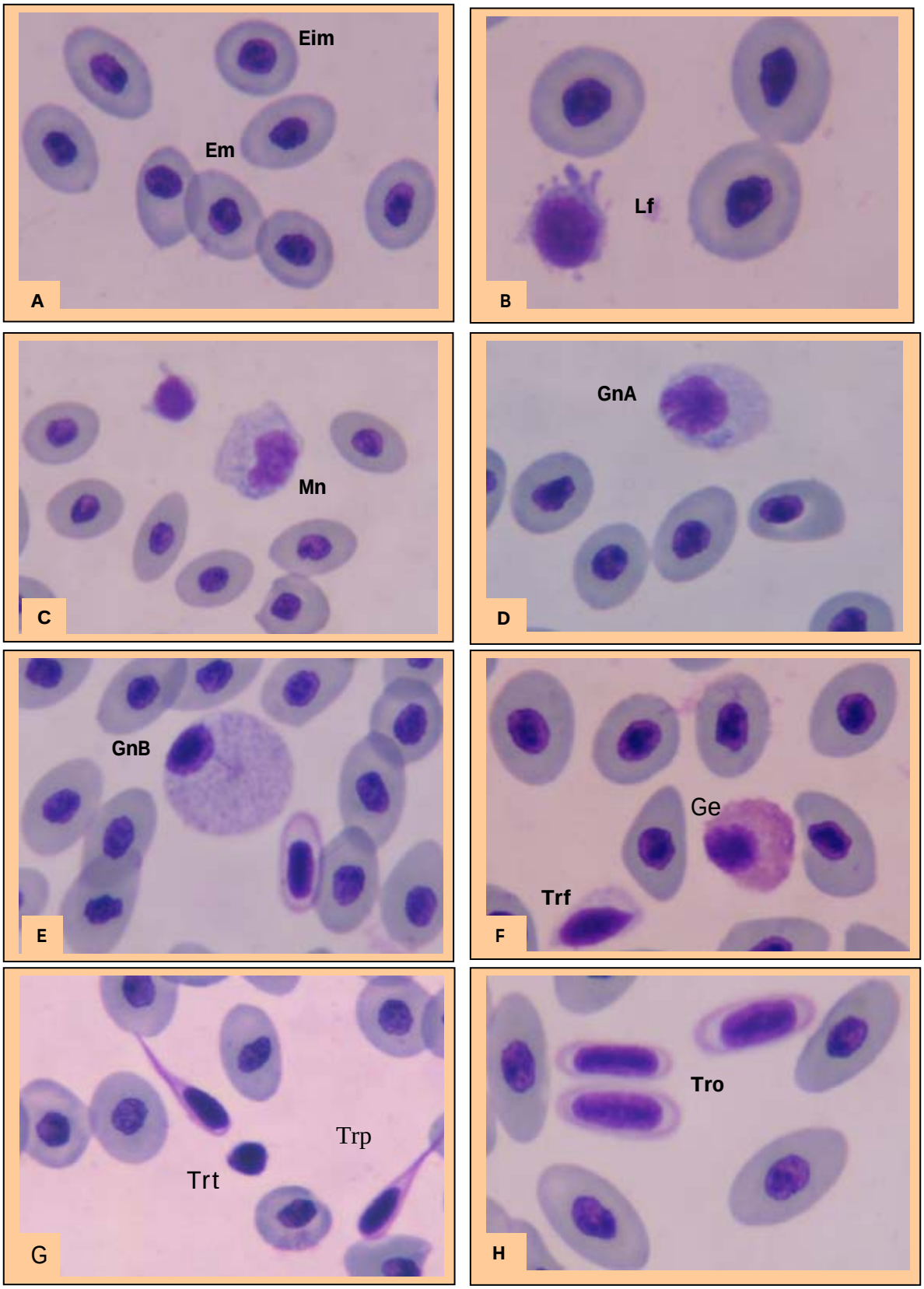
I monociti, cellule precursori dei macrofagi, sono grosse cellule di forma tondeggiante, caratterizzate da processi citoplasmatici e presenza di fagosomi nel citoplasma. Il nucleo, reniforme o a ferro di cavallo è spesso posizionato eccentricamente e occupa gran parte del citoplasma. La colorazione è simile a quella dei linfociti con nucleo blu-violetto e citoplasma blu (figura 38C).

Nell'ambito del presente studio, finalizzato all'analisi morfologica di cellule ematiche di cernia *(Epinephelus marginatus),* sono stati identificati due diversi tipi di neutrofili mentre non si è riscontrata la presenza di granulociti basofili.

Le due tipologie di neutrofili riscontrate si differenziano per la colorazione dei granuli citoplasmatici e per la morfologia del nucleo. Il tipo A presenta nucleo reniforme o bilobato con citoplasma blu-violetto (figura 38D), mentre il tipo B presenta nucleo di dimensioni minori, tondeggiante, e citoplasma viola chiaro (figura 38E).

I granulociti eosinofili hanno dimensioni minori rispetto ai precedenti e assumono una colorazione del citoplasma rosso mattone (figura38F).

La forma dei trombociti osservati è molto variabile: tonda(figura 38G), ovale(figura 38H), fusiforme(figura 38G), con una o due punte(figura38F/I). Possono presentarsi come cellule singole o in gruppo (figura 38M). Il nucleo, rosso-violetto è posizionato centralmente e occupa quasi tutto il citoplasma che, quando visibile assume colorazione rossastra.


Eim
Em
A
Lf
B
Mn
C
GnA
D
GnB
E
Ge
Trf
F
Trp
Trt
G
Tro
H

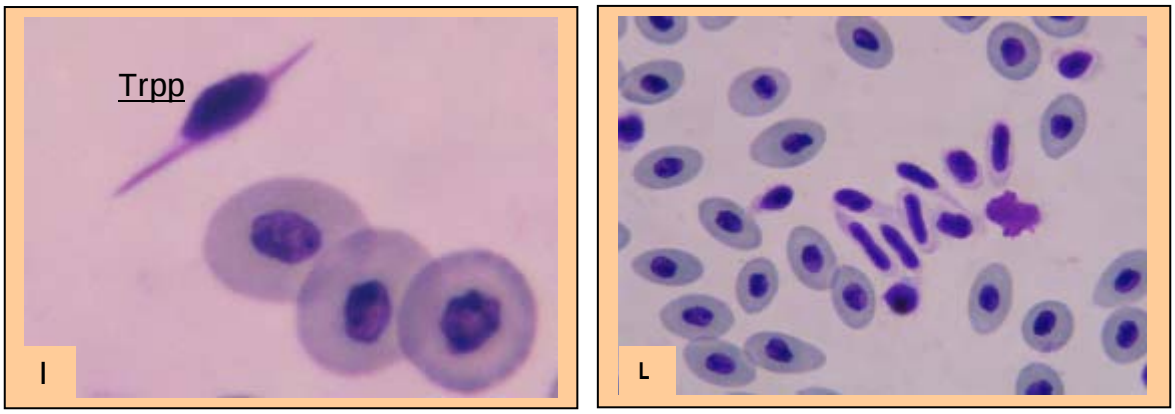


Figura 38. A: Eritrociti maturi (Em)e immaturi (Eim); B: linfocita (Lf); C: Monocita (Mn); D: Granulocita neutrofilo tipoA (GnA); E: Granulocita neutrofilo tipoB (GnB); F: Granulocita eosinofilo (Ge) e trombocita fusiforma (Trf); G: Trombocita tondo (Trt) e trombocita a punta (Trp); H: Trombocita ovale (Tro); I: Trombocita a due punte (Trpp); L: Gruppo di trombociti.

L'analisi morfologica di cellule del sangue di cernia bruna (*Epinephelus marginatus*) ha evidenziato come questa specie abbia un pattern simile a quello di altre specie ittiche; si nota la presenza di diverse forme dello stesso tipo di cellule, per quanto riguarda eritrociti, trombociti e linfociti, come osservato anche per altre specie: *Carassius aurata* (Weinreb, 1963), *Cyprinodon variegatus, Fundulus heteroclitus, Fundulus majalis* (Gardner & Yevich, 1969), e *Pleuronectes platessa* (Ellis, 1976). Queste forme corrispondono a stadi immaturi o a espressioni morfologiche differenti della stessa cellula.
Come negli altri vertebrati (Andrew, 1965), anche nella specie oggetto della presente sperimentazione, gli eritrociti sono le cellule predominanti nel sangue periferico; sono stati evidenziati eritrociti maturi e, in numero minore, eritrociti immaturi.
La morfologia dei trombociti, nonostante la loro vasta presenza nel sangue periferico, non è stata studiata approfonditamente come nel caso di eritrociti e linfociti. Nell'ambito della presente ricerca, sono state evidenziate ben cinque forme di trombociti: sferica, fusiforme, ovale, a una punta e a due punte; questa variabilità di forme è già stata descritta per altre specie (Doggett *et al*., 1987; Lopez-Ruiz *et al*., 1992).
L'analisi morfologica al microscopio ottico svolta durante la presente sperimentazione, ha rilevato, in *Epinephelus marginatus* tre tipi di granulociti: due tipologie di neutrofili (AeB) e una di eosinofili. Le due diverse tipologie di neutrofili sono già state riscontrate in *Oreochromis niloticus* (Bittencourt *et al.,* 2003) e Hrubec e Smith (Hrubec *et al.,* 2000) le indicano, come cellule distinte chiamandole rispettivamente granulociti eterofili e granulociti neutrofili e sottolineando come alcune specie ittiche abbiano solo uno dei due tipi di cellule, mentre altre entrambe. Non si è riscontrata la presenza di granulociti basofili, in accordo con i dati riportati in letteratura inerenti le specie *Dicentrarchus labrax* (Romestand and Trilles, 1984) e *Sparus aurata* (Lopez-Ruiz *et al*., 1992). Quando presenti, queste cellule sono molto rare: circa lo 0,1% dei leucociti (Orun I. *et al*, 2003).
I linfociti sono i leucociti più abbondanti e studiati (Rowley *et al*., 1988). Alcuni autori riportano, per queste cellule, un solo tipo di morfologia, mentre altri sottolineano la presenza di linfociti grandi e piccoli, corrispondenti a diversi stadi di maturazione (Cannon *et al*., 1980; Lopez-Ruiz *et al*., 1992). Nel nostro studio, l'analisi morfologica ha evidenziato la presenza di entrambi i diversi tipi di cellule, la cui individuazione è complessa a causa della forte somiglianza dei linfociti piccoli con i trombociti sferici.
I monociti osservati nel corso della presente ricerca, sono le cellule del sangue di dimensioni maggiori e rispecchiano le caratteristiche morfologiche già descritte per altre specie (Ellis, 1977; Rowley *et al*., 1988; Lopez-Riuz *et al*., 1992).
Come anticipato, oltre alla morfologia, sono state determinate le dimensioni di ciascun tipo cellulare. Per la messa a punto del protocollo di esecuzione di strisci di sangue e calcolo della formula leucocitaria sono state effettuate prove anche su trota iridea (*Onchorynchus mykiss*) e su spigola (*Dicentrarchus labrax*) consentendo un confronto tra quanto osservato in queste specie e quanto osservato nella cernia. In tabella 29 si riportano i valori medi con rispettiva deviazione standard per le tre specie analizzate.

Tabella 29. Dimensioni delle cellule ematiche in Epinephelus marginatus, Dicentrarchus labrax e Onchorynchus mykiss

	Cernia bruna (*Epinephelus marginatus*) (n=10)	**Spigola mediterranea (*Dicentrarchus labrax*) (n=10)**	**Trota iridea (*Onchoryncus mykiss*) (n=10)**
Eritrociti (µm)	12.65±1.12 x 8.45±0.90	10.73±0.63 x 5.79±0.39	19.31±1.04 x 12.97±0.73
Linfociti (µm)	6.69±0.46	6.00±1.24	8.64±0.94
Granulociti neutrofili(µm)	11.24±1.32	11.52±2.56	13.06±1.16
Granulociti eosinofili(µm)	9.23±1.62	-	-
Monociti (µm)	13.99±1.39	-	-

Le misurazioni effettuate hanno dimostrato la differenza di dimensione tra le cellule ematiche delle tre specie messe a confronto, differenza di cui si era avuto percezione già durante l'osservazione morfologica.
Il confronto evidenzia la somiglianza di dimensioni delle cellule di cernia e spigola, entrambi inferiori rispetto a quelle delle cellule della trota. Ciò è in accordo con il rapporto proporzionale esistente tra la superficie dei globuli rossi e la domanda di ossigeno; infatti le specie molto attive, come la trota, hanno un'alta richiesta di ossigeno e hanno eritrociti di dimensioni maggiori rispetto alla cernia ed alla spigola (Hrubec *et al.,* 2000).

Analisi quantitativa di cellule ematiche di Cernia bruna *(Epinephelus marginatus*)

Nella tabella 30 sono riportati i risultati inerenti l'analisi quantitativa, la formula leucocitaria, l'ematocrito (Hc), l'emoglobina (Hb) e le costanti eritrocitarie (MCV, MCH, MCHC) riferite ai 30 esemplari di *Epinephelus marginatus* oggetto di studio.

Tabella 30. Risultati dell'analisi quantitativa delle cellule ematiche di 30 esemplari di Epinephelus marginatus.

Campione	Eritrociti *10^6	Leucociti *10^4	Trombociti *10^4	Linfociti %	Granulociti Neutrofili%	Granulociti eosinofili%	Monociti %	Hc %	MCV	Hb g/dl	MCH pg	MCHC %
F67	2,46	5,5	0,97	92	5,6	1	1,4	51	207	12.7	52	25
D25	1,42	5,3	1,08	93.5	5.1	0	1.4	49	345	12.0	85	24
448	1.87	3.5	1.6	87.6	8	2.2	2.2	49	262	15.3	82	31
426	1.52	4.37	2.03	93.8	4.8	0.5	2.3	40	263	11.6	76	29
869	1.87	5.5	1.2	87.3	8.7	1.7	2.3	37	198	11.7	63	32
F38	1.79	4.1	2.24	90.9	6.4	1.8	0.9	34	190	11.7	65	34
C66	1.79	6.5	0.98	90.0	5.9	2.3	1.8	50	279	21.1	118	42
052	1.81	6.6	0.58	92.2	4.1	3.2	0.5	42	232	11.9	66	28
F53	1.56	4.6	2.5	90.9	6.8	2.3	0.0	48	308	28.1	180	59
57D	1.68	5.0	1.9	93.4	2.8	3.3	0.5	34	202	11.0	65	32
127	1.45	3.3	1.7	87.0	7.8	3.9	1.3	44	303	23.1	159	53
B33	2.20	4.1	1.7	84.7	8.9	5.1	1.3	41	186	11.2	51	27
978	1.64	4.5	1.9	91.2	5.6	2.4	0.8	47	287	12.0	73	26
C3F	1.41	2.6	1.5	82.6	7.2	0.9	1.3	39	277	9.3	66	24
56C	1.00	3.7	1.52	9.30	5.6	0.5	0.9	38	380	9.8	98	26
C35	1.45	4.14	2.65	89.4	9.8	0.4	0.4	38	262	n.p.	n.p.	n.p.
008	2.01	5.2	2.01	93.0	6.0	1.0	0.0	48	239	16.4	82	34
834	1.64	1.6	1.66	83.8	12.5	2.9	0.8	40	244	11.3	69	28
Campione	Eritrociti *10^6	Leucociti *10^4	Trombociti *10^4	Linfociti %	Granulociti Neutrofili%	Granulociti eosinofili%	Monociti %	Hc %	MCV	Hb g/dl	MCH pg	MCHC %
F7D	1.69	3.4	0.8	86.2	11.6	0.9	1.3	42	249	11.1	66	26
E5F	2.16	5.3	2.0	87.0	7.4	4.3	1.3	41	190	12.1	56	30
421	1.54	4.8	2.2	87.3	11.4	1.3	0	30	195	17.6	114	59
F71	1.88	3.3	1.2	80.6	17.7	1.2	0.4	n.p.	n.p.	17.9	95	n.p.
30F	1.80	4.8	1.8	85.8	9.0	3.9	1.3	47	261	13	72	28
F5F	1.33	4.7	0.8	91.0	7.7	0.9	0.4	33	248	n.p.	n.p.	n.p.
C6E	1.04	1.4	1.2	87.7	10.1	1.3	0.9	33	317	12.6	121	38
573	2.19	3.0	0.6	89.7	8.5	0.9	0.9	50	228	28.1	180	59
B60	1.24	4.3	0.72	95.7	2.9	0.9	0.5	33	266	11.4	92	35
E16	1.27	2.0	1.08	84.4	15.2	0.4	0	31	244	8.9	70	29
B5E	1.89	1.84	2.37	81.6	16.2	1.2	1.0	49	259	12.2	65	25
87C	1.25	2.2	2.7	85.5	11.8	2.1	0.4	33	264	9.3	74	28
MINIMO	1.00	1.40	0.58	1.62	2.8	0.0	0.0	30	186	8.9	51	24
MASSIMO	2.46	6.60	2.70	4.96	17.7	5.1	2.3	51	380	28.1	180	59
MEDIA	1.66	4.04	1.57	3.34	8.4	1.8	0.9	41	255	13.6	83	32

Si nota un valore alto di leucociti totali nei soggetti di sesso femminile. Ciò potrebbe essere dovuto, come già osservato per altre specie (Orun I. *et al.*, 2003), a meccanismi di difesa propri del sesso femminile che si amplificano, ancor di più, durante la stagione riproduttiva e offrono quindi lo spunto per ulteriori studi tesi a stabilire una corrispondenza tra numero di globuli bianchi e attività riproduttiva. Fanno eccezione i granulociti neutrofili che invece risultano più numerosi in soggetti di sesso maschile.

Non sembrano esserci differenze tra soggetti di età, e quindi di taglia, differente, contrariamente a ciò che è riportato in letteratura per altre specie come la trota iridea o la spigola (Garcia *et al.*, 1992).

Il numero degli eritrociti nelle specie ittiche, è più basso rispetto a quello dei mammiferi e oscilla tra 1 e 5*10^6cellule/mm^3. Tale valore varia a seconda della domanda di ossigeno e sarà quindi maggiore in specie pelagiche, molto attive, e più prossimo a 1*10^6cellule/mm^3 in specie sedentarie, come le specie bentoniche e le specie da tana. Di conseguenza, anche il valore dell'ematocrito e dell'emoglobina saranno più alti per pesci grandi nuotatori; il range di normalità per questi parametri è pari, rispettivamente al 20-45% e a 5-10 g/dl. Al contrario, il valore dell'MCV (Mean Cellular Volume) è inversamente proporzionale alla richiesta di ossigeno, per cui specie molto attive, con una grossa richiesta di ossigeno, avranno basso MCV; il range di normalità per questo valore è: 150-350 fL (Hrubec *et al.,* 2000). L'MCH (Mean Corpuscolar Hemoglobin) varia a seconda della dimensione dei globuli rossi e il suo valore oscilla tra i 30 e i 100 pg mentre il rapporto tra emoglobina ed ematocrito espresso dall'MCHC (Mean Corpuscolar Hemoglobin Concentration) varia dal 18 al 30% ed è più basso rispetto a quello dei mammiferi a causa della presenza, nei globuli rossi di specie ittiche, del nucleo.

Il numero dei leucociti è molto variabile, ma generalmente compreso tra i 0.8-1.5*10^4 cellule/ mm^3. Tale valore può diminuire (leucopenia) in caso di stress o aumentare in caso di infezione parassitaria o batterica.
La letteratura inerente il numero dei trombociti nelle specie ittiche è discordante (Rowley *et al.*, 1988) probabilmente perchè la loro identificazione al microscopio è resa difficile dalle molteplici forme di questo tipo di cellule. Alcuni autori suggeriscono che esse possano rappresentare il 70% dei leucociti mentre altri solo il 3-13% (Esteban M.A., 2000).
In tabella 31 sono riportati i range dei valori ematici riscontrati, nell'arco della presente sperimentazione, per la specie *Epinephelus marginatus*, confrontati con quelli di altre due specie importantissime per l'acquacoltura: la spigola mediterranea (*Dicentrarchus labrax*) (Alvarez-Pellitero, 1987) e la trota iridea (*Onchoryncus mykiss*) (Hrubec *et al.,* 2000).

Tabella 31. Confronto tra i range dei valori ematici di : *Epinephelus marginatus* (risultati sperimentali), *Dicentrarchus labrax* (Alvarez-Pellitero, 1987) e *Onchorynchus mykiss* (Hrubec *et al.*, 2000)

	Cernia bruna (*Epinephelus marginatus*) n=30	**Spigola mediterranea (*Dicentrarchus labrax*) n=20**	**Trota iridea (*Onchoryncus mykiss*) n=24**
Eritrociti (*10^6/mm^3)	1.00-2.46	2.31-4.01	0.77-1.67
Leucociti (*10^4/mm^3)	1.4-6.6	0.67-3.17	0.78-2.09
Trombociti (*10^4/mm^3)	0.58-2.70	2.22-4.54	0.01-0.09
	Cernia bruna (*Epinephelus marginatus*) n=30	**Spigola mediterranea (*Dicentrarchus labrax*) n=20**	**Trota iridea (*Onchoryncus mykiss*) n=24**
Leucoc+Tromb/ Tot cellule (%)	1.60-4.96	3.5	3.5
Ematocrito (%)	30-51	35-49	21-44
MCV (fL)	186-380	89-197	192-420
Emoglobina (g/dl)	8.9-28.1	6.96-8.96	1.5-7.7
MCH (pg)	51-180	19.0-34.0	14-70
MCHC (%)	24-59	1.6-2.1	5.6-24.4

I risultati riportati in tabella 31 rientrano nei range sopra menzionati per ciascun rispettivo parametro. Fanno eccezione i range inerenti il parametro emoglobina e le costanti eritrocitarie ad essa connesse (MCH, MCHC), riscontrati nella specie cernia. Tuttavia, se si osservano le medie di questi parametri, pari a 13.6 per l'emoglobina, 83 per l'MCH e 32 per l'MCHC si può notare come rientrino nei limiti superiori ed inferiori menzionati in letteratura (Hrubec *et al*, 2000). I dati evidenziano la differenza del numero di trombociti tra le tre specie: bassissimo nella trota (1-6%) e molto alto nella spigola (70-80%). La variabilità è notevole anche nell'ambito della stessa specie; ciò è confermato dai nostri dati inerenti la cernia, in cui la percentuale dei trombociti oscilla tra l'8 e il 52%.
Il numero dei leucociti riscontrati nella cernia sembra essere molto più alto rispetto a quello di altre specie e risulta simile al valore riportato in letteratura per spigole infettate da batteri e/o virus (Alvarez-Pellitero, 1987). Tuttavia, la mancanza di dati bibliografici di riferimento per la *Epinephelus marginatus*, non permette di trarre conclusioni su quale sia lo stato di benessere di questi animali, ma può costituire la base della conoscenza che appunto manca su questa specie.
La determinazione della formula leucocitaria in *Epinephelus marginatus* ha evidenziato come, nella suddetta specie, i linfociti siano la popolazione di cellule più numerosa dopo gli eritrociti, ci sia un'alta percentuale di granulociti neutrofili e sia stata invece riscontrata totale assenza di granulociti basofili. I dati, espressi in percentuale, osservati in *Epinephelus marginatus* sono riportati in tabella 32, confrontati con quelli della spigola mediterranea (*Dicentrarchus labrax*) e della trota iridea (*Onchorynchus mykiss*) (www.aqualex.org/elearning).

Tabella 32. Formula leucocitaria di: *Epinephelus marginatus* (risultati sperimentali), *Dicentrarchus labrax* e *Onchorynchus mykiss* (www.aqualex.org/elearning)

	Cernia bruna (*Epinephelus marginatus*) n=30	Spigola mediterranea (*Dicentrarchus labrax*)	Trota iridea (*Onchoryncus mykiss*)
Linfociti (%)	81-96	90	89-98
Granulociti Neutrofili (%)	3-18	8	1-9
Granulociti eosinofili (%)	0-5.1	-	-
Monociti (%)	0-2.3	2	0-1

I valori di riferimento per le specie ittiche relativi alle diverse popolazioni leucocitarie sono: 85-98% per i linfociti, 4-60% per i granulociti, 0.1-8% per i monociti (www.aqualex.org/elearning). Come si può notare, tutti i dati rientrano in questi range.
I dati osservati in questo studio costituiscono la base conoscitiva sulla specie *Epinephelus marginatus*, per la quali nemmeno relativamente alla formula leucocitaria esistono dati in bibliografia. Potrà essere quindi interessante notare, con una popolazione di dati maggiore, in termine di numero di animali o di osservazioni ripetute, la variazione di questi parametri in funzioni delle condizioni fisiologiche (sesso, età, stagione, periodo riproduttivo) o delle condizioni patologiche (errate condizioni ambientali, male ambientali, stress, infezioni).

Analisi ematochimiche

I risultati delle analisi ematochimiche riferite ai 23 campioni di cernia bruna (*Epinephelus marginatus*) analizzati sono riportati nella tabella 33:

Tabella 33. Analisi ematochimiche sui 23 campioni di *Epinephelus marginatus*

Campione	Urea mg/dl	Glucosio mg/dl	Colesterolo mg/dl	Proteine totali g/dl	Albumina g/dl	AST (GOT) U/L	ALT (GPT) U/L
F67	5	22	554	4.9	1.0	42	3
D25+052+448	6	18	382	5.6	1.3	111	23
426	6	24	475	5.2	1.0	120	12
869	5	19	432	4.7	0.9	17	3
F38	6	25	491	5.1	1.0	11	2
C66+57D	5	31	399	4.8	1.0	71	6
B33	6	25	504	5.0	1.0	10	3
F53+127	6	30	481	4.7	1.0	10	2
978	3	53	318	5.1	11	42	8
C3F	3	22	831	4.9	0.9	15	2
C35	3	11	227	5.2	1.0	2	8
008	4	18	553	5.0	1.1	56	7
834	3	11	225	5.2	1.0	3	8
F7D	4	16	489	4.6	1.0	4	1
E5F	4	21	570	5.0	1.0	13	9
421	4	14	631	4.8	1.0	14	9
F71	5	15	500	4.8	1.1	11	6
56C	4	21	451	5.5	1.2	6	4
30F+573	6	15	482	5.3	1.2	149	16
F5F+C6E+B60	4	15	463	4.5	0.9	29	2
E16	8	12	151	4.4	0.7	14	3
87C	3	25	334	5.0	1.0	8	2
B5E	3	25	337	4.9	1.0	9	4

Dai risultati si evince, per femmine trattate con LHRH e GnRH, un valore più alto relativamente ai parametri AST e ALT.
Si osservano, in tutte le specie, valori molto alti di colesterolo dovuti alle tecnologie di allevamento che tendono a somministrare quantità di cibo superiori a quelle richieste dai soggetti. Gli alti valori

di colesterolo possono essere anche indice di stress cronico dovuto alle condizioni di allevamento in vasche con alta densità.
Si nota inoltre, come il valore del colesterolo rilevato in soggetti di sesso femminile trattati sia più alto rispetto a quello ottenuto per soggetti maschili. Per quanto riguarda gli altri parametri, non si osservano differenze significative tra i 4 gruppi.
I risultati ottenuti sull'intero stock di riproduttori di cernia bruna (*Epinephelus marginatus*) oggetto di questa sperimentazione, stabulati presso la Cispa, sono stati confrontati con quelli presenti in letteratura inerenti la stessa specie, suddivisi in "sani" e "malati" (Di Marco *et al.* , 1998)a causa di stress acuto da cattura (Di Marco, 1999).
Inoltre, la messa a punto del metodo di analisi ematochimiche su specie ittiche effettuata nell'arco di questa sperimentazione, ha permesso la valutazione dei parametri di cui sopra anche nella spigola (*Dicentrarchus labrax*) consentendo un ulteriore confronto, anche tra specie differenti. I valori riportati si riferiscono a spigole allevate presso l'impianto SGM di Civitavecchia (Roma).
In tabella 36 sono riportati i valori medi, deviazione standard e range per ciascun parametro riferito alle suddette specie; i valori inerenti cernia e spigola sono stati analizzati con strumentazione Ilab 650 mentre i dati riportati da Di Marco (1999) con un analizzatore a secco (SPOTCHEM ISE Menarini).

Tabella 34. Confronto tra analisi ematochimiche su campioni di sangue di *Epinephelus marginatus*, *Dicentrarchus labrax* (risultati di questo progetto) e soggetti di *Epinephelus marginatus* suddivisi in specie "sane" e "malate" (Di Marco, 1999).

	Cernia (Coispa) n=23		Cernia (individui sani) n=10		Cernia (individui malati) n=10		Spigola n=19	
	Media	Range	Media	Range	Media	Range	Media	Range
UREA (mg/dl)	4.6±0.6	3-8	2.5±1.9	1-6	2.6±1.7	1-6	5.8±1.1	4-8
GLUCOSIO (mg/dl)	21.2±9.0	11-53	109.6±80.4	16-209	63.7±34.2	15-140	107.9±73.8	27-245
COLESTEROLO (mg/dl)	447.0±145.5	151-831	90.3±24.6	63-150	104.1±25.3	51-158	208.5±45.4	156-347
PROTEINE TOTALI (g/dl)	5.0±0.3	4.4-5.6	3.7±0.9	2.5-5.1	4.3±0.6	3.3-5.7	4.6±0.8	2.9-6.1
	Cernia (Coispa) n=23		Cernia (individui sani) n=10		Cernia (individui malati) n=10		Spigola n=19	
	Media	Range	Media	Range	Media	Range	Media	Range
ALBUMINA (g/dl)	1.0±0.1	0.7-1.3	1.1±0.7	0.5-2.4	1.5±0.8	0.8-3.1	1.3±0.3	0.9-1.7
AST (GOT) (U/L)	33.3±41.4	2-149	115.8±149.1	8-384	47.0±69.8	5-245	88.4±67.2	22-266
ALT (GPT) (U/L)	6.2±5.2	1-23	55.0±57.4	14-209	32.6±22.7	14-98	3.4±1.9	1-8

Confrontando i risultati ottenuti si osservano valori alti relativamente al parametro del colesterolo ; come si può notare, la differenza già presente con altre specie di allevamento come la spigola, aumenta confrontando i valori con quelli di soggetti appena pescati. L'entità di questi valori è quindi sicuramente attribuibile ad un'alimentazione ricca in grassi, tipica di specie di allevamento e probabilmente sovrabbondante per soggetti tenuti in cattività.
Stessa differenza si osserva relativamente al parametro dell' urea, molto più alta rispetto a quella di specie "sane", ma simile a quella di spigole di allevamento. Il suddetto parametro è indice della funzionalità del rene e un valore alto può far presupporre, come già detto in precedenza, un'alimentazione eccedente rispetto al fabbisogno che può causare affaticamento renale.
Questo affaticamento, non viene invece riscontrato a livello epatico, dove valori bassi di AST e ALT lasciano presupporre una buona funzionalità del fegato. Probabilmente, per quanto riguarda l'ALT, la discrepanza tra i valori riscontrati nel nostro caso in cernia e spigola e quelli riportati in letteratura, è probabilmente da attribuire alle diverse strumentazioni utilizzate. Valori così bassi come quelli da noi ottenuti possono considerarsi non attendibili. Ciò è probabilmente attribuibile al meccanismo enzimatico di rilevazione dell' urea utilizzato dalla Ilab 650, strumento normalmente usato per mammiferi; si può presupporre che l'enzima presente in specie ittiche abbia una conformazione differente e non riesca a legarsi in maniera esatta con il substrato utilizzato dalla macchina.

I valori relativi al parametro del glucosio risultano molto più bassi rispetto a quelli riportati in letteratura e a quelli della specie spigola. In letteratura (Di Marco, 1999), valori così bassi di glucosio (inferiori a 20 mg/dl) sono riferite a specie fortemente stressate o in fase pre-cronica; probabilmente, uno stress cronico come quello della stabulazione in vasche di capienza ridotta per lunghi periodi può causare abbassamenti del livello del parametro glicemia la cui determinazione risulta comunque molto delicata e andrebbe effettuata in situ immediatamente dopo il prelievo.
L'alta concentrazione delle proteine totali riscontrata nelle nostre analisi e in letteratura nei soggetti "malati" (Di Marco, 1999) è indice di concentrazione ematica causata appunto da stress acuto ed è stata già descritta anche per altre specie (Poluhowich and Parks, 1972).

Dosaggio dell'estradiolo

I risultati del dosaggio dell'estradiolo sono riportati in tabella 35. Per i campioni B60 ed F5F prima e dopo il trattamento e femmine trattate sono state effettuate diluizioni di 1:20 mentre i valori inerenti gli altri campioni corrispondono ad una lettura del siero tal quale.

Tabella 35. Dosaggio dell'estradiolo

	B60 prima del trattamento	F5F prima del trattamento	B60 dopo il trattamento	F5F dopo il trattamento	Femmine trattate	Maschi	Femmine grandi non trattate	Femmine piccole non trattate
Estradiolo (ng/ml)	41.4	40.6	29.4	43.6	43.1	5.84	>5.5	>5.5

I risultati ottenuti mostrano valori alti riferiti non solo ai soggetti sottoposti a trattamento ormonale ma anche a soggetti di sesso maschile. I dati riportati in letteratura per la specie *Epinephelus septemfasciatus* (Shein *et al.,* 2004) e per la specie *Epinephelus morio* (Jhonson *et al.,* 1998) mostrano valori di estradiolo pari a 0.2±0.1 ng/ml in periodi invernali e, rispettivamente, a 5,2 ±1.1ng/ml e 3.2±0.1ng/ml durante il periodo riproduttivo. I valori ottenuti nella presente sperimentazione, troppo elevati, sono dovuti presumibilmente ad interferenza con altri steroidi; ipotesi che sarà oggetto di successive indagini.

Dosaggio del cortisolo

I risultati inerenti il parametro cortisolo rilevato nel siero dei 30 esemplari di cernia sono riportati in tabella 36:

Tabella 36. Dosaggio del cortisolo

Campione	Cortisolo (ng/ml)	Campione	Cortisolo (ng/ml)
F67	40.0	**C35**	0.7
D25	34.0	**008**	2.8
448	14.0	**834**	0.1
426	0.1	**F7D**	0.1
869	25.0	**E5F**	0.6
F38	43.0	**421**	0.1
C66	2.9	**F71**	0.4
052	13.0	**30F**	27.0
F53	1.0	**F5F**	5.0
57D	114.0	**C6E**	1.6
127	13.0	**573**	1.8
B33	5.0	**B60**	0.1
978	5.0	**E16**	67.0
C3F	0.8	**B5E**	1.6
56C	53.0	**87C**	0.7
MEDIA: 15.8 ng/ml		**Valore minimo: 0.1 ng/ml**	**Valore Massimo: 114.0 ng/ml**

I risultati riportati in tabella 36 non mostrano differenze rilevanti tra i gruppi di *Epinephelus marginatus* trattati e non trattati o tra gli esemplari stressati da alta densità in vasca e/o ripetute manipolazioni, come ad esempio il 573, e quelli stressati meno, come il 421; infatti i valori registrati sono simili, rispettivamente 1.8 ng/ml 0.1 ng/ml; questo perché è trascorso molto tempo dal momento in cui questi animali sono stati sottoposti a stress acuto a quello in cui sono state effettuate le analisi (3 mesi).
La media ottenuta per il parametro cortisolo, riferito ai 30 esemplari di cernia, pari a 15,8 ng/ml è un valido riferimento per ulteriori studi finalizzati alla valutazione della variazione dei valori in condizioni di stress indotto sperimentalmente negli stessi esemplari.
Il valore medio riscontrato, risulta maggiore rispetto ai valori di base riportati in letteratura per altre specie ittiche: *Pagrus pagrus* (Rotland *et al.,* 1997), *Onchorynchuss mykiss* (Pickering *et al.,* 1987), *Gadus morhua* (Morgan *et al.,* 1999) in condizioni di normalità, mostrano rispettivamente a 0-10 ng/ml, 0-2 ng/ml e 0-5 ng/ml . Rotland (1997) riporta, per la specie *Pagrus pagrus* in condizioni di stress cronico da alta densità in vasca, valori di cortisolo pari a 25ng/ml.

Elaborazione statistica

Per l'analisi statistica dei risultati, i 30 campioni sono stati accorpati in gruppi in base alle caratteristiche dei soggetti analizzati. Sono stati individuati 4 gruppi differenti:

Gruppo 1 - Femmine piccole non trattate: F38, 426, 869, B33, D25, 052, 448, 57D, C66, 978, F53, 127, F67.
Gruppo 2 - Femmine grandi non trattate: 56C, F71, C3F, F7D, E5F, 834, C35, 421, 008;
Gruppo 3 - Femmine trattate (stimolazione ormonale): C6E, B60, F5F, 30F, 573;
Gruppo 4 - Maschi : B5E, E16, 87C;

Sono stati applicati test non parametrici per k campioni indipendenti (Kruskal-Wallis) per verificare l'esistenza di differenza statisticamente significative tra le medie dei 4 gruppi messi a confronto:

Dove è risultato significativo il test di Kruskal-Wallis, si è andati a vedere quali fossero i gruppi significativamenti diverse tra loro attraverso il test non parametrico per 2 campioni indipendenti (Mann-Whitney).

Test di Kruskal-Wallis

Parametro	p	significatività
ERITR*10^6	0,456	NO
LEUC*10^4	0,023	SI
TROMB*10^4	0,124	NO
%LEUC+TROMB	0,431	NO
EMAT%	0,376	NO
MCV	0,975	NO
EMOGL	0,261	NO
MCH	0,578	NO
MCHC	0,577	NO
CORTISOLO	0,042	SI

Test di Mann-Whitney

LEUC*10^4

	1	2	3	4
1				
2	NO			
3	NO	NO		
4	SI*	NO	NO	

*p=0,009

CORTISOLO

	1	2	3	4
1				
2	SI*			
3	NO	NO		
4	NO	NO	NO	

*p=0,008

Parametro	p	Significatività
UREA	0,136	NO
GLUCOSIO	0,024	SI
COLESTEROLO	0,134	NO
PROT TOT	0,473	NO
ALBUMINA	0,341	NO
AST	0,13	NO
ALT	0,43	NO

Test di Mann-Whitney

GLUCOSIO

	1	2	3
1			
2	SI*		
3	NO	NO	

*p=0,005

Si sono pertanto evidenziate differenze statisticamente significative

- per i leucociti, tra femmine piccole non trattate e maschi
- per il cortisolo, tra femmine tra femmine piccole non trattate e femmine grandi non trattate
- per il glucosio, tra femmine tra femmine piccole non trattate e femmine grandi non trattate

3. CONCLUSIONI

CONCLUSIONI

Il progetto è uno studio sulla cernia *Epinephelus marginatus* svolto in quattro ambiti tematici: la riproduzione artificiale, l'allevamento larvale, la genotipizzazione dei riproduttori e lo studio del loro benessere.
Lo studio della riproduzione della cernia *Epinephelus marginatus* in cattività ha valutato l'efficacia dei trattamenti di stimolazione ormonale. Entrambi i prodotti utilizzati, LHRHa in formulazione iniettabile e GnRHa a lento rilascio mediante impianto EVAc, hanno mostrato un effetto positivo sulla maturazione dei gameti; il GnRHa in EVAc ha mostrato un effetto più graduale e prolungato.
Solo una quantità esigua di oociti è arrivata alla maturazione finale e conseguentemente è stata ottenuta una scarsa quantità di uova. Le indagini istologiche hanno evidenziato come molti oociti, durante il processo maturativo, andassero incontro ad atresia cioè a degenerazione.

Le uova prodotte hanno registrato un basso tasso di fecondazione, alto indice di anomalie della segmentazione, blocco dello sviluppo embrionale e basse percentuali di schiusa. Inoltre nelgiorno successivo alla schiusa la popolazione larvale si è dimezzata fino ad esaurirsi nei 5 - 6 giorni successivi. La segmentazione irregolare, il successivo blocco dell'embriogenesi e la mortalità larvale possono essere ricondotte alla scarsa qualità delle uova (precoce impoverimento delle riserve vitelline ed esaurimento del globulo lipidico prima dell'apertura funzionale della bocca).

Le cause della scarsa produzione di uova e della loro scarsa qualità possono essere individuate principalmente nella temperatura dell'acqua nelle vasche dei riproduttori e nell'impatto dello stress, sia di tipo acuto (manipolazioni legate alle operazioni di monitoraggio, somministrazione del trattamento ormonale, prelievo biopsie e spremitura) sia di tipo cronico (condizioni di cattività).

La temperatura dell'acqua nelle vasche dei riproduttori è stata tenuta al di sotto di quella stagionale per contenere il rischio di una patologia virale, la VER (Viral Encephalopathy and Retinopathy) causata da Betanodavirus, patologia che non si manifesta al di sotto dei 20°C (Aranguren *et al*, 2002); la cernia è molto sensibile a questa malattia, contro la quale non esiste un vaccino registrato.

Lo stress ed il benessere animale sono argomenti di grande attualità. La World Organisation for Animal Welfare (OIE) ha designato un gruppo di lavoro sul benessere degli animali in acquacoltura, inoltre la Comunità Europea, Direttorato Generale per la Pesca e l'Acquacoltura, ha pubblicato un rapporto sul benessere dei pesci allevati (Wolffrom *et al*.,2004). In questo rapporto è sottolineato come, anche nei pesci, alla risposta primaria allo stress, caratterizzata dal rilascio di corticosteroidi e catecolamine, segue la risposta negativa dello stress sulla riproduzione, sull'accrescimento e sul sistema immunitario.
L'effetto negativo dello stress sulla riproduzione è testimoniato da numerosi lavori; è stato dimostrato che in pesci sottoposti a stress il livello di 17βestradiolo diminuisce in maniera significativa entro 24 ore (Pottinger *et al.*1997) e che lo stress indotto sulle madri influenza negativamente la costituzione del sacco vitellino, riducendo la sopravvivenza e la qualità della progenie (Mc Cormick, 1998)
L'importanza del benessere può essere estesa a tutto l'ambito zootecnico, come sottolineato dal lavoro di Teng S.K. *et al.* (2003) relativo a cernie *Epinephelus salmoides,* allevate in gabbie galleggianti: la presenza di nascondigli (artificialmente creati con pneumatici) ha aumentato la produzione da 8,5 kg/m^3 a 19.5 kg/m^3

Le indagine ematiche effettuate non permettono di trarre conclusioni sullo stato di benessere degli animali osservati a causa della mancanza di valori di riferimento per *Epinephelus marginatus*; i dati di questo studio costituiscono infatti la base delle conoscenze mancanti in quest'ambito per questa specie. Potrà essere interessante valutare, disponendo di una popolazione di dati maggiore, in termine di numero di animali o di osservazioni ripetute, la variazione dei parametri ematici in funzione delle condizioni fisiologiche (sesso, età, stagione, periodo riproduttivo) o delle condizioni patologiche (stress, infezioni, contaminanti ambientali).

E' auspicabile infatti che l'allevamento di specie innovanti sia preceduto ed accompagnato dallo studio approfondito di tutti gli aspetti metabolici ed etologici della specie candidata. A

questo il progetto ha contribuito fornendo informazioni circa la risposta ai trattamenti ormonali effettuati e fornendo dati sui parametri ematici della specie *Epinephelus marginatus*

Le indagine genetiche hanno verificato che i riproduttori esaminati sono portatori, ai sette loci microsatelliti analizzati, della maggior parte delle varianti alleliche, il che significa che questi individui verosimilmente contengono buona parte della variabilità genetica presente nella popolazione in natura.

I risultati contribuiscono alle conoscenze necessarie all'allevamento ed al ripopolamento della specie *Epinephelus marginatus.*

4. BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abou-Seedo F., Dadzie S., Al Kanaan A., 2003. Histology of ovarian development and maturity stages in the yellowfin seabream, *Acanthopagrus latus* (Teleostei: Sparidae) (Hottuyn, 1782) reared in cages. Kuwait J. Sci. Eng. 30 (1), 121-136.
- Alvarez-Pellitero P., Pinto R.M., 1987. Some blood parameters in sea bass, *Dicentrarchus labrax*, infected by bacteria, virus and parasites. *J. Fish. Biol.* 31:259-261.
- Andrade A.B., Machado L. F., Hostim Silva M., Barreiros J., P., 2003. Reproductive biology of the dusky grouper Epinephelus marginatus (Lowe, 1834). *Braz. arch. Biol. Technol.* 46 (3), 373-382.
- Andrew W, 1965. Comparative haematology. New York. Grune & Stratton editors.
- Aqualex Multimedia Consortium. Basic Tecniques of Fish Haematology. http: //www.aqualex.org/elearning/, AMC Ltd, Dublin, Ireland.
- Aranguren R, Tafalla C., Novoa B, & Figueras A. 2002 Experimental transmission of encephalopathy induced by nodavirus to sea-bream, *Sparus aurata* L., using different infection models. Journal of Fish Diseases, 25,6: 317-324
- Belkir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F (1996) Genetix, Version 4.0 logiciel sous Window TM pour la genetique des populations. Laboratoire Genome e Populations, CNRS UPR 9060, Université Montpellier 2, France. http :// www.univ-mont2.fr/~ genetix/genetix.htm
- Bittencourt N. de L. R., Molinari L.M., Oliveira Scoaris D., Bocchi-Pedroso R., Nakamura C.V., Ueda-Nakamura T., Abreu Filho B. A., Dias Filho B.P., 2003. Haematological and biochemical values for Nile tilapia *Oreochromis niloticus* cultured in semi-intensive system. *Acta Scien. Biol. Scien*. v. 25, no 2, p. 385-389.
- Blaxhall, P.C. and Daisley., 1973. Routine haematological methods for use with fish blood. *J. Fish Biol*. 5: 771-781.
- Cannon MS., Mollenhauer HH., Eurell TE., Lewis DH., Cannon AM., Tompkins CH., 1980. Au ultrastructural study of the leucocytes of the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *J. Morphol* 164:1-23.
- Carasson M., Bau M., 2003. Reproduction and gonadal histology of *Aidablennius sphinx* (pisces: blennidae) of the Catalan sea (northwestern Mediterranean). Sci. Mar.67 (4), 461-469.
- Chapman RW, Sedberry GR, Koenig CC, Eleby Bm, 1999. Stock identification of gag, *Mycteroperca microlapis*, along the south-east coast of the United States. *Marine Biotechnology*, 1:137-146.
- Chelappa S., Camara M., Verani J.R., 2005. Ovarian development in the amazonian red discus, *Symphysodon discus* Heckel (Osteichthyes: Cichlidae). Braz. J. Biol. 65 (4), 609-616.
- Da Silva Brandao C.A., Moraes Valentin M., Pellegrini caramaschi E., 2003. Ovary maturation stages and oocyte features in three species of the neotropical fish *Hemiodus* (Muller, 1842). Braz. Arch. of Biol. and Tech. 46 (3), 433-411.
- De Innocentis S., Sola L., Cataudella S., Bentzen P., 2001. Allozyme and microsatellite loci provide discordant estimates of population differentiation in the endangered dusky grouper (*Epinephelus marginatus*) within the Mediterranean sea. Mol. Ecol. 10, 2163-2175.
- Di Marco P., Mechelli L., Finora M.G., Marino G., 1998. Difficulties and progress in the collection of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* from the wild. *XXXIII International symposium: New Species for Mediterranean Aquaculture. Alghero, 23-24 aprile* 1998.
- Di Marco P., Marino G., 1999. Effetti dello stress da cattura su alcuni componenti ematici in *Epinephelus marginatus* (Pisces, serranidae). *Biol Mar. Medit.* 6:695-699.
- Doggett TA., Wrathmall A.B., Harris J.E., 1987. A cytochemical and light microscopical study of the peripheral blood leucocytes of *Oreochromis mossambicu,* Cichlidae. *J. Fish Biol.* 33:747-766.
- Duray M. N., Estudillo C.B., Alpasan L.G., 1997. Larval rearing of the grouper *Epinephelus suillus* under laboratory conditions. Aquac. 150, 63-76.
- ECNC, 1998. convention on the conservation of European wild-life and natural habitats. *European Treaty series*, 104.
- Ellis A.E., 1976. Leucocytes and related cells in the place, *Pleuronectes platessa*. *J.Fish. Biol*. 8:143-156.
- Ellis A.E., 1977. The leucocytes of fish: A review. *J.Fish. Biol.* 31:147-151.
- Esteban M.A., Munoz J., Meseguer J. ,2000. Blood Cells of Sea Bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Flow Citometric and Microscopic Studies. *The Anatomical Record* 258:80-89.
- FAO 1997. Aquacolure development. FAO Technical Guidelines 5, Rome, pp. 40
- Garcia Alonso J., Viziano D., 2004. Induction of oocyte maturation in the White Croacker *Micropogonias furnieri* (pisces: Scianidae) by human chorionic gonadotropin. Braz. J. Biol. 64 (1), 73-80.
- Garcia M.P., Echevarria F.J., Martinez and Zamora S., 1992. Influence of blood sample collections on the haematocrit value of two teleost: rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Comp. Biochem. Physiol*., 101:733-736.
- Garcia-Rubies A., Zabala M. & Hereu B. 2003. Seguiment de la Poblaciò de meros

(Epinephelus *marginatus*)i d'altres especies vulnerables del les illes Medes i la costa Veina parcialment protegida (1991-2003)- Generalitat de Catalunya, Departament de Medi Ambient, Seguiment temporal de l'area marina protegida de les illes Medes. Informe anual. any 2003

- Gardner GR., Yevich PP:, 1969. Studies on the blood morphology of three estuarine cyprinodontiform fishes. *J. Fish Res Bd* Canada 26:433-437.
- Glamuzina B., Skaramuca B., Kozul V., 2000. Female reproductive cycle of the dusky grouper, Epinephelus marginatus (Lowe, 1834) in captivity. Acta adriat. 41 (2), 79-88.
- Glamuzina B., 1998 Preliminary studies of reproduction and early laral stages in rearing trials of dusky grouper *Epinephelus marginatus*. Aquac. Res. 29, 769-771.
- Glamuzina B., Skaramuca B., Glavic N., Kozul V., Dulcic J., Kraljevic M., 1998. Egg and early larval development of laboratory reared dusky grouper, Epinephelus marginatus (Lowe, 1834) (Picies, Serranidae). Sci. Mar. 62 (4) 373-378.
- Glamuzina B., Glavic N., Tutman P., Kozul V., Skaramuca B 2000 a. Notes on first attempt at artificial spawning and rearing of early stages with goldblotch grouper, *Epinephelus costae* (Steindachner,1875). Aqu. Intern., 8, 551-555.
- Glamuzina B., Glavic N., Tutman P., Kozul V., Skaramuca B 2000 b. Egg and early larval development of laboratory reared goldblotch grouper, *Epinephelus costae* (Steindachner, 1878) (Picies, Serranidae). Sci. Mar. 64 (3) 341-345.
- Glamuzina B., Kozul V., Tutman P., Skaramuca B., 1999. Hybrization of mediterranean groupers : Epinephelus marginatus x E. aeneus and early development. Aqu. Res., 30, 625-628.
- Glamuzina B., Skaramuca B., 1999.A review: Adriatic groupers- Status of natural populations and breeding perspectives. Acta adriat. 40, 79-90.
- Heemstra P.C., Randall J.E., 1993. FAO species catalogue, vol. 16. Groupers of the world. *FAO Fisheries Synopsis* No. 125, vol. 16.
- Hrubec T.C., Smith S.A. , 2000. Hematology of Fish. In: Feldman B.F., Zinkl J.G., Jain N.C. Shalm's Veterinary Hematology. Baltimore. Lippincott Williams and Wilkins. Chapter 174, p. 1120-1125.
- Johnson A.K., Thomas P., Wilson R.R., 1998. Seasonal cycles of gonadal development and plasma sex steroid levels in *Epinephelus morio*, a protogynous grouper in the eastern Gulf of Mexico. J. of Fish Biol. 52, 502-518.
- Lopez-Ruiz A., Esteban MA, Meseguer J., 1992. Blood cells of the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.): light and electron microscopic studies. *Anat. Rec*. 234:161-171.
- Macias D., Gomez-Vives M.J., De la Serna J.M., 2005. Some reproductive aspects of Bullet Tuna (Auxis Rochei) from the south western Spanish Mediterranean. Col. Vol. Sci. Pap. 58 (2), 484-495.
- Mayer I., Shackeley S.E., Ryland J.S., 1988. Aspects of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchuis labrax L.l* . An histological and histochemical study of oocyte development. J.Fish Biol. 33, 609-622.
- Mc Cormick 1998 Behaviorally induced maternal stress in fish influence progeny quality by hormonal mechanism. Ecology, 79, 6: 1873-1883
- Marino G., Azzurro E., Massari A., Finoia M.G., Mandich A., 2001. Reproduction in the dusky grouper from the southern Mediterranean. J. of Fish Biol. 58, 909-927.
- Marino G., Azzurro E., Messina M.T.,Finoia M.G., Mandich A., 2001. Recent advances in induced breeding of the dusky grouper Epinephelus marginatus (Lowe, 1834). Cah. Option Mediterr., 215-225.
- Marino G., Panini E., Longobardi A., Mandich A., Finoia M. G., Zohar Y., Mylonas C.C., 2003. Induction of ovulation in captive-reared dusky grouper, *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834), with a sustained-release GnRha implant. *Aquaculture* 219, 841-858.
- Morgan M.J., Wilson C.E., Crim L.W., 1999. The effects of stress on reproduction in atlantic cod. *Journal of Fish Biology* 54, 477-488.
- Mylonas C., Zohar Y., 2001 a. Use of GnRHa-delivery systems for control of reproduction in fish. *Rev. Biol. Fish*. 10, 463-491.
- Mylonas C., Woods III L.C., Zohar Y., 1997. Cyto-histological examination of post-vitellogenesis and final oocyte maturation in captive-reared striped bass. J. of Fish Biol. 50, 34-49.
- Orun I., Dorucu M., Yazlak H., 2003. Haematological Parameters of Three Cyprinid Fish Species from Karakaya Dam Lake, Turkey. *Online Journal of Biological Sciences* 3 (3): 320-328.
- Pickering A.D., Pottinger T.G., 1987. Poor water quality suppresses the cortisol response of salmonid fish to handling and confinement. *J. Fish Biol.* 30, 363-374.
- Pina T., Esteves E., Andrade J.P., 2003. Gross and histological observation of ovarian development in twaite shad, *Alosa fallax fallax,* from the Rivers Mira and Gaudiana (Portugal). Sci. Mar.67 (3), 313-322.
- Poluhowich J.J., Parks R.P., 1972. A comparative study of blood chemistry and respiration in marin and freshwater eels. 34 :33-38.
- Pottinger T.G. Yeomans W.E. & Carrick T.R. 1997 Plasma cortisol and 17β estradiol levels in roach exposed to acute and chronic stress. Journal of Fish Biology 51, 1: 21-25
- Rainis S., Ballestrazzi R., 2005. The control of reproduction in finfish species through GrRH treatments Ital. J Anim.Sci. 4, 345-353.
- Romestand B., Trilles JP., 1984. Nomenclature and cytologie descriptive des elements figures du sang et des organes hemopoietiques du

Bar (*Dicentrarchus labrax*). *Rec. Med. Vet.* 160:833-840.

- Rotlland J., Tort L., 1997. Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjiected to crowding stress. *Journal of Fish Biology* 51, 21-28.
- Rowley AF., Hunt TC., Page M, Mainwaring G., 1988. Fish in: Rowley AF., Ratcliffe NA:, editors. Vertebrate blood cells. Cambridge: Cambridge University Press. p. 19-27.
- Santos R.N., Andrade C.C, Santos A.F. G. N., Santos L.N., Araujo F.G., 2005. Histological analysis of ovarian development of the characiform *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) in a brazilian reservoir. Braz. J. Biol. 65 (1), 169-177.
- Sarasquete C., Cardenas S., Gonzales M.L., Pascual E., 2002. Oogenesis in the bluefin tuna, *Thunnus thynnus L.*: a histological and histochemical study. Histol. Histopathol. 17, 775-788.
- Shein N.L., Chuda H., Arakawa T., Mizuno K., Soyano K., 2004. Ovarian development and final oocyte maturation in cultured sevenband grouper *Epinephelus septemfasciatus*. Fish. Sc. 70, 360-365.
- Skaramuca B., Musin D., Onofri V., Caric M.,1989. A contribution to the knowledge on the spawing time of the dusky grouper (epinephelus guaza L.). Ichth. 21 (1), 79-85.
- Spedicato M.T., Contegiacomo M., Carbonara P., Lembo G., Boglione C., 1998 Riproduzione artificiale di Epinephelus marginatus orientata allo sviluppo delle tecniche di restocking Biol. Mar Med. 5, 1248-1257.
- Spedicato M.T., Contegiacomo M., Selmo C., Boglione C., 1998. First observation on the development and morphology of *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) larvae obtained by induced spawning. XXXIII International Symposium on new species for Mediterranean Aquaculture, Alghero 22-24 April 1998.
- Spedicato M.T., Contegiacomo M., Carbonara P.,Lembo G., 1998 a. Induced sex-inversion in the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834). XXXIII International Symposium on new species for Mediterranean Aquaculture, Alghero 22-24 April 1998.
- Spedicato M.T., Contegiacomo M., Carbonara P., Lembo G., 1998 b. Ovarian maturation and spawning in *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) induced by hormone treatments. XXXIII International Symposium on new species for Mediterranean Aquaculture, Alghero 22-24 April 1998.
- Spedicato M.T., Lembo G., 1996. Formazione di uno stock di riproduttori di *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) Biol. Mar. Mediterr. 3, 430-431.
- Spedicato M.T., Lembo G., Di Marco P., Marino G., 1995. Preliminary results in the breeding of dusky grouper, epinephelus marginatus (Lowe, 1834). Cah. Option Mediterr. 16, 131-148.
- Teixera Ferreira S., Padovani Ferreira B., Pereira Padovan I., 2004. Aspects of fishing and reproduction of the black grouper *Mycteroperca bonaci* (Poey, 1860) (Serranidae: Epinephelinae) in the Northeastern Brazil. Neo. Ichth., 2 (1), 19-30.
- Teng S.K., Chua T.E., 2003. Use of artificial hides to increase the stocking density and production of estuary grouper, *Epinephelus salmoides* Maxwell, reared in floating net cages. *Aquacolture vol.* 16, 3 p.219-232.
- Tseng W.J., Chan K.F.,1985. On the larval rearing of the white-spotted green grouper, *Epinephelus amblicephalus* (Bleeker), whit a description of larval development. J. world Maricult. Soc. 16, 114-126.
- Tyler C.R., Sumpter J.P., 1996. Oocyte growth and development in teleosts. Rew. in Fish Biol. and Fish. 6, 287-318.
- Tucker J.W., 1994 Spawning by captive serranids fish: a review J. World Aquac. Soc. 25, 345-359
- Watanabe W.O., Lee C.S., Ellis S.C., Ellis E. P., 1995. Hatchery study of the effects of temperature on eggs and yolksac larvae of the Nassau grouper *Epinephelus striatus*. Aquac. 136, 141-147.
- Weinreb EL., 1963. Studies on the structure of teleosts blood cells. I. Peripheral blood. *Anat Rec* 147:219-223.
- Weir BS, Cockrham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370
- West G., 1990. Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. Aus. J. of M. and freshwater Res. 41, 199-222.
- Wolffrom T., Lopes dos Santos M., 2004. Farmed fish and welfare. European Commission. Directorate- General for Fisheries, Research and Scientific Analysis Unit (A4).
- Zabala M. et al.1997 Spawning behaviour of Mediterranen dusky grouper Epinephelus marginatus (Lowe, 1834) (Pisces, Serranidae) in the Medes Islandss Marine Reserve (NW Spain) Sci. Mar. 61, 65-77.
- Zohar Y., Mylonas C.C., 2001 b. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. *Aquaculture* 197, 99-136.

ALLEGATI

Allegato 1. Monitoraggio preliminare dello stadio di maturazione ovarica, effettuato il 10 luglio 2006

Codice identificativo	Taglia		Papilla genitale	Introduzione del catetere	Fase maturazione oociti	Oociti osservati		Note
						µm	numero	
Vasca A								
Femmina 410000356C	L.T.(cm)	78,5	Non ipertrofica	Difficile	-	-	-	
	L.St.(cm)	66,00						
	Peso(Kg)	9,8						
Femmina 407F7C6F71	L.T.(cm)	57,00	-	Impossibile	-	-	-	
	L.St.(cm)	47,50						
	Peso(Kg)	3,44						
Femmina 41000D7C3F	L.T.(cm)	66,50	Lievemente ipertrofica	Facile	Vitellogenesi	230	n°1 oocito	
	L.St.(cm)	56,50						
	Peso(Kg)	5,50						
Femmina 41000E0F5	L.T.(cm)	65,00	Ipertrofica	Facile	Vitellogenesi	media 247	n°12 oociti	Oociti 160 - 345 µm
	L.St.(cm)	55,50						
	Peso(Kg)	5,64						
Femmina 407F6E3F7D	L.T.(cm)	58,50	Non ipertrofica	Facile	Pre-vitellogenesi	-	-	
	L.St.(cm)	49,50						
	Peso(Kg)	3,88						
Femmina 407F7F4573	L.T.(cm)	52,50	Non ipertrofica	Difficile	Inizio vitellogenesi	media 212	n°13 oociti	Oociti 140 - 275 µm
	L.St.(cm)	49,50						
	Peso(Kg)	3,80						
Femmina 4100144B60	L.T.(cm)	62,50	Non ipertrofica	Facile	Vitellogenesi	media 292	n°25 oociti	Oociti 205 - 415 µm
	L.St.(cm)	52,50						
	Peso(Kg)	5,08						
Femmina 4100055E5F	L.T.(cm)	67,50	Non ipertrofica	Facile	Vitellogenesi Matrice sierosa	230 345	n°2 oociti	
	L.St.(cm)	57,50						
	Peso(Kg)	6,04						
Femmina 42653B1834	L.T.(cm)	72,50	Non ipertrofica	Facile	Pre-vitellogenesi scarsa	-	-	Pancia morbida
	L.St.(cm)	61						
	Peso(Kg)	7,74						
Femmina 41000E3C35	L.T.(cm)	85,50	Lievemente ipertrofica	Facile	Vitellogenesi Matrice sierosa	230 275 345	n°3 oociti	
	L.St.(cm)	74,00						
	Peso(Kg)	12,50						
Maschio 4265491B5E	L.T.(cm)	74,00	Fluente	Stadio III-IV mobilità 70-80%	Molto concentrato			
	L.St.(cm)	62,50						
	Peso(Kg)	7,60						
Maschio 41000F1E16	L.T.(cm)	104,50	Lievemente fluente	Stadio I Mobilità < 30%	Molto concentrato			
	L.St.(cm)	89,00						
	Peso(Kg)	21,30						

Vasca B								
Femmina 407F7B7421	L.T.(cm)	55,50	Lievemente ipertrofica	Difficile	-	-	-	
	L.St.(cm)	48,00						
	Peso(Kg)	3,42						
Femmina 41000B7008	L.T.(cm)	57,50	Ipertrofica	Difficile	-	-	-	
	L.St.(cm)	48,50						
	Peso(Kg)	3,98						
Femmina 407F6E4C6E	L.T.(cm)	73,50	Ipertrofica	Difficile	Vitellogenesi avanzata	media 418	n°32 oociti	Oociti 185 - 645 µm
	L.St.(cm)	63,00						
	Peso(Kg)	8,24						
Maschio 4426403187C	L.T.(cm)	91,50	Non fluente	-	-			
	L.St.(cm)	76,50						
	Peso(Kg)	13,52						

Allegato 2. Monitoraggio preliminare dello stadio di maturazione ovarica effettuato il 18 luglio 2006

Codice identificativo	Taglia		Papilla genitale	Introduzione del catetere	Fase maturazione oociti	Oociti osservati		Note
						µm	numero	
Vasca C								
Femmina 4264095F38	L.T.(cm)	45,50	-	Impossibile	-	-	-	
	Peso(Kg)	1,46						
Femmina 2031454426	L.T.(cm)	51,00	Non ipertrofica	Difficile	Pre-vitellogenesi	-	-	
	Peso(Kg)	2,60						
Femmina 42636C6869	L.T.(cm)	53,50	Lievemente ipertrofica	Difficile	Pre-vitellogenesi			
	Peso(Kg)	2,62						
Femmina 20340E6B33	L.T.(cm)	52,50	-	Impossibile				
	Peso(Kg)	2,26						
Femmina 4265341D25	L.T.(cm)	48,50	-	Impossibile	-	-	-	
	Peso(Kg)	1,80						
Femmina 4265114052	L.T.(cm)	45,50	Non ipertrofica	Facile	Pre-vitellogenesi			
	Peso(Kg)	1,72						
Femmina 4100006448	L.T.(cm)	50,50	-	Impossibile	-			
	Peso(Kg)	2,28						
Femmina 203569330F	L.T.(cm)	49,50	Non ipertrofica	Facile	Vitellogenesi	media 286	n°50 oociti	Oociti 205 - 435 µm
	Peso(Kg)	2,20						
Femmina 203579357D	L.T.(cm)	52,50	Lievemente ipertrofica	Difficile	-	-	-	
	Peso(Kg)	2,77						
Femmina 4100064C66	L.T.(cm)	50,50	Non ipertrofica	Difficile	-	-	-	
	Peso(Kg)	2,50						
Femmina 41000D6978	L.T.(cm)	47,50	Lievemente ipertrofica	Facile	Pre-vitellogenesi	-	-	
	Peso(Kg)	1,92						
Femmina 4262453F53	L.T.(cm)	53,50	-	Impossibile	-	-	-	
	Peso(Kg)	2,44						
Femmina 2035632127	L.T.(cm)	49,50	-	Impossibile	-	-	-	
	Peso(Kg)	2,38						
Femmina 407F7A5F67	L.T.(cm)	48,50	Non ipertrofica	Difficile	Inizio vitellogenesi	media 170	n°54 oociti	Oociti 115 - 255 µm
	Peso(Kg)	2,20						

Allegato 3. Procedura operativa standard per l'esame istologico di biopsie ovariche di specie ittiche

La seguente procedura si applica a campioni di biopsie ovariche di specie ittiche

Materiali / Apparecchiature

Apparecchiature

- Cappa aspirante
- Piastra fredda
- Microtomo rotativo
- Termostato a 37°C ± 2°C
- Microscopio ottico con obiettivi 2,5x, 10x, 20x, 40x e 100x
- Dispensatore di paraffina
- Criostato a – 20°C
- Bagno stendi-fettine

Materiali

- Pinze a punta piatta
- Carta assorbente
- Cellette porta-campioni istologici
- Stampini in acciaio
- Lame monouso per microtomo
- Vetrini copri-oggetto
- Vassoi porta-vetrini
- Vasca di vetro pirex
- Guanti monouso
- Contenitori di plastica con tappo a vite o ermetico
- Matita o pennarello
- Bisturi con lama monouso
- Vetrini porta-oggetto
- Vaschette di colorazione per vetrini
- Pennelli
- Cestelli porta-vetrini

Reagenti

- Fissativo di Bouin
- Alcool Etilico 95%, 90%, 85%, 80%, 70% e 50%
- Bio Clear (Bio Optica)
- Cryo-spray (Bio Optica)
- Ematossilina di Mayer (Bio Optica)
- Soluzione di Acido periodico di Schiff allo 0,5%
- Alcool Etilico assoluto
- Acqua distillata
- Paraffina 56-58°C
- Eukitt (Bio Optica)
- Soluzione di Eosina alcolica
- Reattivo di Schiff

Composizione del fissativo di Bouin

Acido picrico saturato	3000 ml
Formaldeide	1000 ml
Acido acetico glaciale	200 ml

Modalità operative

Fissazione

Procedere sotto cappa aspirante nel modo seguente:

- inserire il campione di biopsia direttamente nelle cellette porta-campioni istologici con la superficie da esaminare rivolta verso il basso e chiudere il coperchio;
- scrivere con una matita sulle cellette porta campioni il numero identificativo del campione e l'anno in corso;
- porre le cellette con i prelievi istologici a fissare nella soluzione di Bouin in un contenitore di plastica per 24 - 48 ore e a temperatura ambiente.
- lavare le cellette dopo il periodo di fissazione sotto acqua corrente per 15 - 30 minuti;
- conservare le cellette porta-campioni in un contenitore di plastica contenente alcool etilico al 70 % per 24-48 ore e a temperatura ambiente nel caso in cui non si possa procedere immediatamente con la fase successiva di disidratazione.

Processazione

Disidratazione

Effettuare manualmente i seguenti bagni a temperatura ambiente:

Alcool Etilico 70%	15 minuti
Alcool Etilico 70%	15 minuti
Alcool Etilico 70%	15 minuti
Alcool Etilico 80%	15 minuti
Alcool Etilico 95%	15 minuti
Alcool Etilico assoluto	15 minuti
Alcool Etilico assoluto	15 minuti
Alcool Etilico assoluto	15 minuti

Diafanizzazione
Effettuare manualmente i seguenti bagni a temperatura ambiente:

Bio Clear	15 minuti
Bio Clear	15 minuti

Impregnazione
Effettuare manualmente i seguenti bagni a 60°C

Paraffina I	15 minuti
Paraffina II	15 minuti
Paraffina III	15 minuti

Inclusione in paraffina
Questa fase viene effettuata con il dispensatore di paraffina.

- Immergere le cellette porta-campioni nel bagno di paraffina, posto nella vasca a destra del dispensatore di paraffina, in attesa della fase successiva;
- aprire le cellette, buttare il coperchio e prelevare con una pinza il campione poggiandolo sugli appositi stampini d'acciaio pieni di paraffina liquida sempre con la superficie da esaminare rivolta verso il basso;
- porre lo stampino d'acciaio sulla piastra fredda del dispensatore di paraffina per non più di 3 secondi in ed orientare il campione per la successiva fase di taglio;
- ricoprire il campione di nuovo di paraffina liquida a 56-58°C usando il rubinetto erogatore del dispensatore;
- appoggiare le cellette sullo stampino d'acciaio in modo che la superficie esterna sia immersa nella paraffina e riempire di nuovo con paraffina a 56-58°C la camera che conteneva all'origine il campione;
- porre a raffreddare le cellette con lo stampino sulla piastra fredda fino a completo consolidamento della paraffina;
- a solidificazione avvenuta, togliere lo stampino di acciaio e rimuovere con un bisturi la paraffina in eccesso dalla celletta porta-campione.

Taglio delle sezioni
Questa fase viene effettuata con il microtomo rotativo motorizzato.

- Lasciar raffreddare i blocchetti di paraffina ponendoli in criostato a -20° C
- anche al momento del taglio il campione va mantenuto congelato utilizzando il cryo-spray;
- inserire il blocchetto nell'apposita pinza del microtomo, avvicinare, con le apposite leve, il gruppo porta-lame con la lama inserita e procedere alla sgrossatura del blocchetto con un avanzamento automatico di circa 40 µm per taglio;
- posizionare la lama in un punto in cui il filo è perfettamente integro ed iniziare a tagliare sezioni di spessore di 3 µm;
- preparare un vetrino per ogni blocchetto da esaminare;
- raccogliere le sezioni di paraffina con l'aiuto di un pennello e depositarle su un velo di acqua riscaldata ad una temperatura tra i 40°C e i 50 °C che permetta la distensione delle sezioni;
- raccogliere le sezioni dall'acqua immergendo un vetrino pulito e lasciando aderire la sezione ben distesa;
- lasciar asciugare i vetrini all'aria;
- numerare i vetrini con le sezioni con il numero di identificazione e porli in termostato a 37 ± 2°C per almeno 3 ore.

Sparaffinazione e idratazione delle sezioni
Posizionare i vetrini negli appositi cestelli porta-vetrini ed immergerli nei seguenti bagni a temperatura ambiente.

Bio clear (cambiare il Bio Clear 3 volte)	3 x 5 minuti
Alcool etilico assoluto	5 minuti
Alcool Etilico 95-96%	5 minuti
Alcool Etilico 80%	5 minuti
Alcool Etilico 70%	5 minuti
Acqua distillata	3 minuti

Colorazione delle sezioni
Questa fase della procedura si effettua sotto cappa aspirante da chimica dopo sparaffinazione ed idratazione delle sezioni.

Colorazione di Ematossilina -Eosina
La colorazione di Ematossilina - Eosina si effettua di routine su tutti i campioni eseguendo i seguenti bagni, a temperatura ambiente in progressione:

Emallume di Mayer	1 minuti
Acqua corrente di fonte	5 minuti
Soluzione d'uso di eosina alcolica	2 minuti
Alcool etilico assoluto	1 minuti
Alcool etilico assoluto	1 minuti
Bio clear	2 minuti
Bio clear	2 minuti

Montaggio con vetrini copri-oggetto in resina Eukitt

Lettura
La lettura morfologica delle sezioni di biopsie ovariche viene effettuata al microscopio ottico in campo chiaro. Le componenti strutturali degli oociti assumono diverse affinità tintoriali a secondo dello stadio di maturità.

Lettura delle sezioni colorate con Ematossilina-Eosina
Con la colorazione di Ematossilina - Eosina si evidenziano:
- nuclei cellulari in blu-violaceo di intensità sempre minore in oociti sempre più maturi
- nucleoli in blu-violaceo intenso
- citoplasma in blu-violaceo di intensità sempre minore in oociti sempre più maturi.
- zona radiata interna in rosa poco intenso
- zona radiata esterna in rosa intenso
- cellule follicolari con nuclei in blu-violaceo e con citoplasma in rosa
- fibre del tessuto connettivo in rosa

Dopo la formazione di inclusioni citoplasmatiche (gocce lipidiche, granuli di vitello, alveoli corticali):
- citoplasma in rosa di intensità sempre minore in oociti sempre più maturi
- gocce lipidiche otticamente vuote quindi non colorate
- granuli di vitello in rosa di intensità sempre minore in oociti sempre più maturi
- alveoli corticali in rosa poco intenso (scarsamente rilevabili con questa colorazione)

Archiviazione
Dopo la lettura, qualora ritenuto necessario, i blocchetti di paraffina ed vetrini sono identificati ed archiviati a temperatura ambiente.

Note: questa tecnica di processazione manuale del campione può essere utilizzata anche per l'esame istologico degli stadi larvale di specie ittiche marine

Allegato 4. Procedura operativa standard per la conta su emocitometro di cellule ematiche di specie ittiche

CAMPO DI APPLICAZIONE

La seguente procedura si applica a campioni di sangue di pesce con anticoagulante.

SCOPO

Questa procedura ha lo scopo di descrivere le modalità operative per l'esecuzione della conta di cellule ematiche di specie ittiche su emocitometro.

RIFERIMENTI

Aqualex Multimedia Consortium. Basic Tecniques of Fish Haematology. http: //www.aqualex.org/elearning/, AMC Ltd, Dublin, Ireland,
Allegato 8: Preparazione della soluzione Dacies Fluid.

MATERIALI/APPARECCHIATURE

Apparecchiature

- Cappa aspirante da chimica con filtri a carbone attivo per la formalina
- Microscopio ottico con obiettivo 40X

Materiali

- Campione di sangue in provetta con EDTA;
- Micropipetta;
- Puntali;
- Provette falcon da 15 ml;
- Pipette sterili in plastica da 5 ml;
- Pipette sterili in plastica da 10 ml;
- Pipet-aid;
- Carta bibula;
- Cilindro in vetro di idoneo volume;
- Imbuto in vetro;
- Emocitometro (Camera di Burker);
- Pipette pasteur ;
- Cilindro in vetro graduato da 1l;
- Bilancia tecnica;
- Vetrini coprioggetto;
- Forbici.

Reagenti

- soluzione Dacies Fluid (Allegato 8).

MODALITÀ OPERATIVE

Diluizione 1:200 del campione di sangue in Dacies Fluid

- filtrare la quantità necessaria di soluzione Dacies Fluid per evitare che si formino depositi di colorante che potrebbero causare errori nella conta su emocitometro;
- effettuare una diluizione 1:200 del campione di sangue nella soluzione Dacies Fluid filtrata;
- mischiare il sangue diluito inclinando gentilmente la provetta in modo da evitare la rottura delle cellule.

E' possibile che durante il passaggio attraverso il puntale della micropipetta provochi una variazione morfologica delle cellule che, viste al microscopio assumeranno una forma più allungata del normale. Ciò tuttavia non influisce sulla conta.

Preparazione del campione su emocitometro

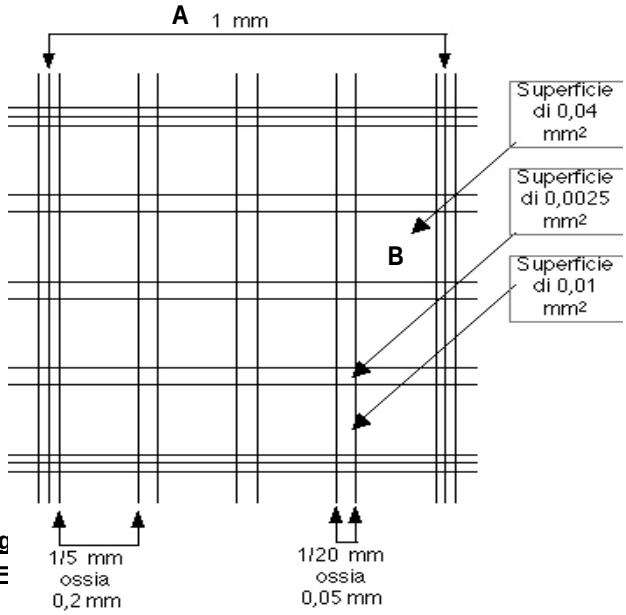
- preparare l'emocitometro posizionando il vetrino coprioggetto sotto i morsetti;
- prelevare, con una pipetta Pasteur, una piccola quantità di sangue diluito;
- avvicinare la pipetta all'emocitometro e, toccando il bordo del coprioggetto, lasciar fluire il sangue all'interno dei due canali dell'emocitometro in modo da formare un sottile strato;

Conta degli eritrociti

- utilizzare il microscopio ottico ad un ingrandimento di 40x e avvicinare il vetrino coprioggetto all'obiettivo fino a focalizzare un reticolo con quadrati grandi e piccoli come quello mostrato nella figura 1;
- contare gli eritrociti presenti all'interno e su due lati di 10 quadrati secondari (B) aventi lato 0,2 mm
- calcolare la media del valore ottenuto (corrispondente a un volume totale contato di 0,004 mm3 = 1/250 di 1 mm3);
- togliere il vetrino coprioggetto e pulire l'emocitometro con alcool denaturato.

Conta dei leucociti e trombociti

- utilizzare il microscopio ottico ad un ingrandimento di 40x e avvicinare il vetrino coprioggetto all'obiettivo fino a focalizzare un reticolo con quadrati grandi e piccoli come quello mostrato nella figura sottostante;
- contare i leucociti e i trombociti presenti all'interno e su due lati di 5 quadrati primari (A) aventi lato 1 mm;
- calcolare la media del valore ottenuto (corrispondente a un volume totale contato di 0,1 mm3 = 1/10 di 1 mm3);
- togliere il vetrino coprioggetto e pulire l'emocitometro con alcool denaturato.



Espressione dei risultati

Eritrociti

Il risultato viene espresso calcolando il numero di eritrociti/ mm^3:
Numero di eritrociti/ mm^3 = media del numero di cellule contate nei 10 quadrati di volume 0,004 mm^3 x 250 x 200 (diluizione).

Leucociti e trombociti

Il risultato viene espresso calcolando il numero di leucociti e trombociti/ mm^3:
Numero di leucociti e trombociti/ mm^3 = media del numero di cellule contate nei 5 quadrati di volume 0,1 mm^3 x 10 x 200 (diluizione).

Questo metodo fornisce una conta totale di leucociti e trombociti. La conta differenziale può essere effettuata mediante colorazione di uno striscio di sangue e successiva osservazione al microscopio ottico (Allegato 7).

CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

Il campione di sangue può essere conservato 72 ore mantenendolo, dal momento del prelievo, in provette con anticoagulante a T 4 ±2°C.

Allegato 5. Procedura operativa standard per l'analisi qualitativa delle cellule ematiche e il calcolo della formula leucocitaria in specie ittiche

CAMPO DI APPLICAZIONE

La seguente procedura si applica a campioni di sangue di pesce con anticoagulante.

SCOPO

Questa procedura ha lo scopo di descrivere le modalità operative per l'esecuzione del calcolo della formula leucocitaria in specie ittiche.

RIFERIMENTI

Aqualex Multimedia Consortium. Basic Tecniques of Fish Haematology. http: //www.aqualex.org/elearning/, AMC Ltd, Dublin, Ireland.

MATERIALI/APPARECCHIATURE

Apparecchiature

- Cappa aspirante da chimica con filtri a carbone attivo per la formalina;
- Microscopio ottico con obiettivi 100x.

Materiali

- Campione di sangue in provetta con anticoagulante;
- Vetrini portaoggetto smerigliati;
- Vetrini coprioggetto;
- Contenitori per colorazione di vetrini;
- Vassoi portavetrini;
- Cestelli portavetrini;
- Olio da immersione;
- Acqua distillata;

Reagenti

- Hemacolor soluzione 1, soluzione di fissaggio (Merck);
- Hemacolor soluzione 2, reattivo colorante rosso (Merck);
- Hemacolor soluzione 3, reattivo colorante blu (Merck);
- Compresse tampone pH 7,2 (Merck);
- Bio Clear (Bio Optica);
- Eukitt (Bio Optica);
- Alcool denaturato.

MODALITÀ OPERATIVE

Esecuzione di uno striscio di sangue

L' esecuzione degli strisci è stata fatta immediatamente dopo il prelievo di sangue, in modo da evitare la lisi cellulare dovuta a una possibile interferenza dell'anestetico, utilizzato per anestetizzare i pesci prima del prelievo, con EDTA.

- scrivere l'NRG del campione sulla parte smerigliata del vetrino;
- porre una piccola goccia di sangue vicino all'estremità smerigliata del vetrino;
- avvicinarsi, con un secondo vetrino, alla goccia, in modo che quest'ultima aderisca e si disponga per capillarità lungo tutto lo spigolo, l'angolo fra i due vetrini deve essere di 30-40 gradi;
- muovere il vetrino inclinato verso sinistra con un movimento costante e rapido.

E' importante che la quantità di sangue non sia eccessiva, altrimenti i globuli rossi possono nascondere i leucociti.

Colorazione degli strisci

Questa procedura si effettua sotto cappa aspirante da chimica. La colorazione dei vetrini viene effettuata con il kit di colorazione Hemacolor per campioni ematologici (Merck).

- posizionare i vetrini all'interno degli appositi cestelli;
- immergere i vetrini per 5 secondi nella soluzione 1 per fissaggio (metanolo);
- eliminare l'eccesso di liquido tenendo per qualche secondo i vetrini in posizione verticale;
- immergere i vetrini per 3 secondi nella soluzione 2 reattivo colorante rosso;
- eliminare l'eccesso di liquido tenendo per qualche secondo i vetrini in posizione verticale;
- immergere i vetrini per 6 secondi nella soluzione 3 reattivo colorante bleu;
- eliminare l'eccesso di liquido tenendo per qualche secondo i vetrini in posizione verticale;
- immergere i vetrini per 45 secondi nella soluzione tampone pH 7,2;
- eliminare l'eccesso di liquido tenendo per qualche secondo i vetrini in posizione verticale;
- lasciar asciugare i vetrini all'aria;
- eliminare i vetrini ritenuti non buoni e immergere i rimanenti per 2 minuti in Bio Clear;
- montare con vetrino coprioggetto in resina Eukitt;
- procedere alla lettura al microscopio ottico a 100x;
- pulire il vetrino coprioggetto con alcool denaturato.

Lettura dei risultati

La lettura morfologica degli strisci viene effettuata al microscopio ottico ad un ingrandimento di 100x.

- Con la colorazione Hemacolor si evidenziano:
- nuclei cellulari in rosso-violetto;
- citoplasma dei linfociti in blu;
- citoplasma dei monociti in blu;
- granuli dei granulociti eterofili in violetto chiaro;
- granuli dei granulociti eosinofili in rosso mattone-rosso bruno,
- granuli dei granulociti basofili in viola scuro-nero;
- nucleo dei trombociti in violetto;
- citoplasma degli eritrociti in rossastro.

Riconoscimento delle cellule:

- Eritrociti maturi: cellule ovali, a volte tonde, con nucleo centrale ovale. Il nucleo si colora in rosso-violetto mentre il citoplasma appare rossastro.
- Eritrociti immaturi: cellule tonde, con nucleo centrale ovale di dimensioni maggiori rispetto al precedente. Il nucleo si colora in rosso-violetto mentre il citoplasma appare rossastro.
- Linfociti: cellule di dimensioni minori rispetto agli eritrociti, forma sferica e citoplasma provvisto di prolungamenti. Il nucleo, anch'esso sferico, occupa gran parte del citoplasma ed assume una colorazione blu-violetto; il citoplasma, spesso ridotto ad un sottile anello, si colora in blu.
- Monociti: cellule di grosse dimensioni e forma tondeggiante, spesso provviste di processi e vacuoli citoplasmatici. Il nucleo, reniforme o a ferro di cavallo è eccentrico e occupa gran parte del citoplasma. La colorazione è simile a quella dei linfociti con nucleo blu-violetto e citoplasma blu.
- Granulociti neutrofili: cellule di grosse dimensioni e forma tondeggiante con nucleo eccentrico reniforme, a volte bilobato di colore rosso-violetto. Granuli citoplasmatici che non mostrano affinità per coloranti acidi o basici e assumono una colorazione blu- violetto o viola chiaro.
- Granulociti eosinofili: cellule di dimensioni minori rispetto ai granulociti neutrofili. Forma tondeggiante con nucleo eccentrico reniforme, a volte bilobato di colore rosso-violetto. Granuli citoplasmatici che mostrano affinità per coloranti acidi come l'eosina e assumono una colorazione rosso-mattone.
- Granulociti basofili: cellule di dimensioni minori rispetto ai granulociti neutrofili. Forma tondeggiante con nucleo sferico, eccentrico , di colore blu-violetto. Il nucleo risulta spesso coperto dai granuli citoplasmatici che mostrano affinità per coloranti basici e assumono una colorazione blu scuro-nero. Questo tipo di cellule si incontra raramente nei pesci.
- Trombociti: Cellule di piccole dimensioni e forma molto variabile: sferica, ovale, fusiforme, a punta, a due punte. Il nucleo, rosso-violetto è posizionato centralmente e spesso occupa gran parte del citoplasma che, se visibile, assume una colorazione rossastra. Queste cellule possono presentarsi isolate o riunite in gruppo.

Calcolo della formula leucocitaria

La determinazione della formula leucocitaria viene effettuata al microscopio ottico ad un ingrandimento di 100x.

- contare sullo striscio i diversi tipi cellulari (ad eccezione degli eritrociti) fino ad enumerare 200 linfociti;
- calcolare, in base ai risultati ottenuti, le percentuali dei diversi leucociti e la percentuale dei trombociti sulla totalità di leucociti+trombociti.

CONSERVAZIONE DEL CAMPIONE

I vetrini, una volta fissati con resina Eukitt possono essere conservati per 2 anni.

ESPRESSIONE DEI RISULTATI

I risultati vanno espressi come percentuale dei diversi tipi cellulari sulla totalità dei leucociti.

VALORI DI RIFERIMENTO

Si riportano alcuni valori di riferimento riferiti a specie ittiche in generale. La variabilità di alcuni valori è da attribuire alla sensibilità dei parametri ematici verso condizioni fisiche, ambientali, legate al sesso, all'età del soggetto e al tipo di specie studiata.
Formula leucocitaria:

- Linfociti: 85-98%;
- Granulociti: 4-60%;
- Monociti: 0.1-8%;
- Trombociti: 1-70%.

Allegato 6. Preparazione della soluzione dacies fluid (per 100 ml)

Reagenti e materiali

- formaldeide 40%;
- citrato trisodico;
- blu brillante di cresile;
- acqua distillata;
- cilindro graduato di idoneo volume;
- bottiglia scura di idoneo volume;
- bilancia tecnica;
- pipetta in plastica sterile da 1 ml,
- pipet aid.

Modalità operative

- pesare 3,13 g di citrato trisodico;
- mettere in un cilindro graduato;
- pesare 0,1 g di blu brillante di cresile,
- mettere in un cilindro graduato;
- aggiungere 1 ml di formaldeide 40%;
- portare a volume (100 ml) con acqua distillata;
- agitare bene,
- conservare in bottiglia scura;
- filtrare prima dell'uso.

Conservazione

- Temperatura ambiente e riparo dalla luce.

Validità

- 12 mesi dalla data di preparazione.

Precauzioni durante la preparazione

- Preparare la soluzione sotto cappa aspirante.

Alienazione

Alienare la soluzione come residuo tossico e nocivo.

Allegato 7. Preparazione della soluzione dacies fluid (per 100 ml)

Reagenti e materiali

- formaldeide 40%;
- citrato trisodico;
- blu brillante di cresile;
- acqua distillata;
- cilindro graduato di idoneo volume;
- bottiglia scura di idoneo volume;
- bilancia tecnica;
- pipetta in plastica sterile da 1 ml,
- pipet aid.

Modalità operative

- pesare 3,13 g di citrato trisodico;
- mettere in un cilindro graduato;
- pesare 0,1 g di blu brillante di cresile,
- mettere in un cilindro graduato;
- aggiungere 1 ml di formaldeide 40%;
- portare a volume (100 ml) con acqua distillata;
- agitare bene,
- conservare in bottiglia scura;
- filtrare prima dell'uso.

Conservazione

- Temperatura ambiente e riparo dalla luce.

Validità

- 12 mesi dalla data di preparazione.

Precauzioni durante la preparazione

- Preparare la soluzione sotto cappa aspirante.

Alienazione

- Alienare la soluzione come residuo tossico e nocivo.

Allegato 7. Condizioni in vasca ciclo V2

Data	Giorno	Temperatura (mg O2/l.)		Ossigeno (mg O2/l.)		Nitriti (mg NO2-/ l))		Luce (descrizione)	Osservazioni
		A.M.	P.M./S	A.M.	P.M./S	A.M.	P.M./S		
23 luglio	-2	-	21,0	-	-	-	-	no	Contenitore trasporto (arrivo lotto 1)
24 luglio	-1	21,2	21,3	7,0	8,0	-	-	no	Secchi incubazione (lotto 1)
	-1	-	21,6	-	8,0	-	-	no	V2 (semina lotto 1 alle 17.00)
25 luglio	0	21,9	22,0	8,1	-	0,02	-	no	V2 (schiusa lotto 1)
	-1/-2	-	21,5	-	-	-	-	no	Arrivo lotto 2-3 (contenitore trasporto)
26 luglio	0/-1	21,4	21,9	5,7	7,7			no	Secchi incubazione (lotto 2-3)
	1	23,2	23,9	7,1	8,3	0,01	0,00	no	V2 (semina lotto 2-3 23.30)
27 luglio	2/1/0	23,8	23,9	8,5	8,5	0,02	0,04	no	V2 (schiusa lotto 3)
28 luglio	3/2/1	24,8	24,6	8,3	8,3	0,06	0,06	Dalle 17.00	V2 (inizio alimentazione)
29 luglio	4/3/2	24,8	24,8	8,1	7,8	0,07	0,07	Accesa	V2
30 luglio	5/4/3	24,8	24,8	7,5	7,6	0,09	0,08	Accesa	V2 (alle 17.00 ricambio 1,1 litro/min.)
31 luglio	6/5/4	24,9	24,9	7,8	7,7	-	-	Accesa	V2
01 agosto	7/6/5	24,9	24,9	7,5	7,5	-	-	Accesa	V2 (vasca eliminata)

Allegato 8. Condizioni in vasca ciclo V1

Data	Giorno	Temperatura (mg O2/l.)		Ossigeno (mg O2/l.)		Nitriti (mg NO2-/ l))		Luce (descrizione)	Osservazioni
		A.M.	P.M./S	A.M.	P.M./S	A.M.	P.M./S		
26 luglio	-2	-	22,1	-	-	-	-	no	Contenitore trasporto (arrivo lotto 4)
	-2	-	21,5	-	-	-	-	no	V1 (semina lotto 1 alle 23.30)
27 luglio	-1	22,3	22,8	8,9	8,9	0,00	0,04	no	V1
28 luglio	0	24,0	24,3	8,8	8,7	0,05	0,06	no	V1 (schiusa lotto 4)
29 luglio	1	24,5	24,6	8,6	8,5	0,06	0,06	no	V1
30 luglio	2	24,5	24,5	8,0	8,4	0,08	0,07	no	V1 (alle 17.00 ricambio 0,9 litro/min.)
31 luglio	3	24,8	24,7	7,9	7,9	-	-	Dalle 10.00	V1 (inizio alimentazione)
01 agosto	4	24,7	24,6	7,8	7,9	-	-	si	V1 (vasca eliminata)