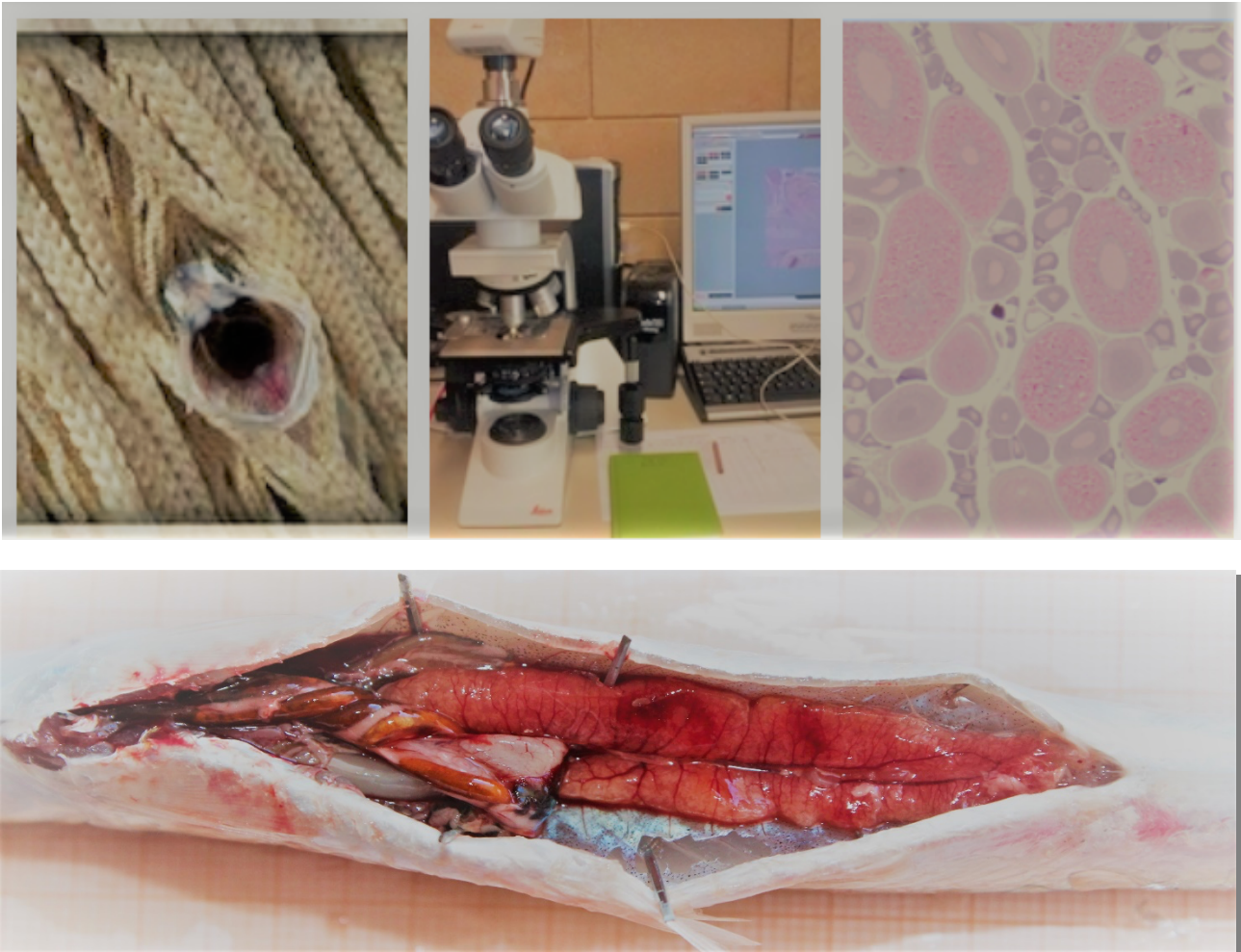


Tecniche di preparazione istologica di tessuti gonadici e analisi microscopica per la determinazione dello stato di maturità di *Engraulis encrasicolus*



IAS - CNR di Capo Granitola



A.Gargano, R. Ferreri, M. Pulizzi, S. Mangano, G. Giacalone, I. Fontana, S. Genovese, P. Rumolo, M. Barra, A. Di Maria, P. Calandrino, S. Aronica, A. Bonanno, G. Basilone.

INDICE

INTRODUZIONE	2
<i>ECOLOGIA RIPRODUTTIVA E SALVAGUARDIA DELLE RISORSE ITTICHE</i>	
L'ACCIUGA EUROPEA	4
<i>LA BIOLOGIA RIPRODUTTIVA DELL'ACCIUGA EUROPEA (ENGRAULIS ENCRASICOLUS)</i>	
<i>MATERIALI E METODI</i>	6
<i>RACCOLTA DEI CAMPIONI E ANALISI MACROSCOPICA DELLE GONADI</i>	
<i>ANALISI ISTOLOGICA DELLE GONADI FEMMINILI</i>	7
OSSERVAZIONE DEI PREPARATI ISTOLOGICI	12
<i>IMPORTANZA DELL'ANALISI MICROSCOPICA PER LA DETERMINAZIONE DELLA MATURITÀ SESSUALE NELLA VALUTAZIONE DELLO STOCK ASSESSMENT</i>	
	15
CONFRONTO TRA DUE METODI DI CLASSIFICAZIONE DELLA MATURITÀ GONADICA	
BIBLIOGRAFIA	19

INTRODUZIONE

Fin dall'antichità, il Mediterraneo e il Mar Nero (FAO principale zona di pesca 37) hanno sostenuto importanti attività di pesca. Oggi coesistono pesca industriale, semiindustriale e artigianale, utilizzando un'ampia varietà di attrezzi da pesca. A differenza di altre principali zone di pesca e, con poche eccezioni, la pesca in Mediterraneo e Mar Nero è generalmente multispecie, sfruttando la varietà di stock di pesci bentonici e pelagici, nonché di molluschi e crostacei, presenti in questi bacini. A causa della natura semichiusa del Mediterraneo e del Mar Nero, gli stock sono spesso condivisi tra flotte di diversi paesi, il che significa che il settore pesca svolge un importante ruolo di collegamento tra stati. Nonostante la produzione economica relativamente bassa della pesca a confronto ad altre attività economiche nella regione mediterranea (ad esempio turismo, petrolio e gas esplorazione), la produzione annua di circa 1,2 milioni di tonnellate offre opportunità di lavoro a diverse centinaia di migliaia persone, fornisce prodotti ittici per il consumo umano a locali, mercati regionali e internazionali, e ne crea molti altri indiretti benefici, mantenendo così il tessuto sociale di molte comunità. In quanto tale, la pesca è una parte intrinseca della cultura paesaggio dei paesi del Mediterraneo e del Mar Nero.

L'ecologia riproduttiva dei pesci, in particolare il potenziale riproduttivo, è determinante per capire la dinamica di popolazione e ai fini dello *stock assessment*. La politica per la pesca dell'Unione Europea richiede di assicurare uno sfruttamento delle risorse acquatiche viventi realizzato in modo tale da garantire condizioni di sostenibilità dal punto di vista economico, sociale e ambientale. Il monitoraggio delle risorse marine (ex L.41/82, Regolamento 2008/199/CE, L.R. n.66/05) prosegue da più di 30 anni ed è di supporto alla formulazione dei piani gestionali della pesca e dell'acquacoltura, in un'ottica di riduzione degli impatti ambientali e di sostenibilità delle risorse. L'uso congiunto di informazioni provenienti da statistiche di cattura e da campagne scientifiche in mare permette di analizzare lo stato di sfruttamento, ovvero di stimare i tassi di sfruttamento, i livelli di biomassa dei riproduttori e la risposta delle popolazioni in funzione delle scelte gestionali alternative. L'analisi temporale del rapporto fra cattura e biomassa in mare consente, infatti, di quantificare tassi di sforzo sostenibili e di monitorare l'impatto della pesca per ciascuna specie. La somma di tutte queste attività, insieme al monitoraggio ambientale della fascia marino - costiera, ha permesso di acquisire una notevole mole di dati utili al monitoraggio e alla valutazione della biodiversità marina, attività che sempre più sta assumendo importanza nell'ambito della salvaguardia e valorizzazione della natura.

A causa del sovra-sfruttamento, numerose risorse ittiche europee si trovano al di sotto dei limiti di sicurezza necessari ad assicurare il mantenimento di quei livelli di biomassa che assicurano la sopravvivenza delle popolazioni. Uno degli scopi principali della biologia della pesca è il mantenimento di un potenziale riproduttivo degli stock sufficiente a garantire uno sfruttamento sostenibile delle risorse in maniera indefinita nel tempo. Come tutte le specie di piccoli pelagici, anche gli stock di acciuga europea (*Engraulis encrasicolus*) sono soggetti ad ampie fluttuazioni interannuali nei livelli di biomassa. Tali oscillazioni sono, però, maggiormente influenzate dall'elevata variabilità dell'ambiente in cui vivono, piuttosto che dal tasso di prelievo cui sono

sottoposte (Lasker, 1978; Belvéze e Erzini, 1983; Tanaka, 1984). La fecondità degli adulti e ancor di più la fase larvale risultano influenzate dalle variazioni dei parametri ambientali, primi fra tutti la temperatura e la disponibilità di cibo (Rice *et al.*, 1987; Fuiman; Ettahiri *et al.*, 2003; Murua e Motos, 2006; Zarrad *et al.*, 2008).

A differenza dell'acquacoltura, la pesca costituisce una delle ultime attività dell'uomo che utilizza, a fini economici, le capacità produttive degli stock selvatici, senza manipolarne i cicli biologici naturali. Un'attività di pesca è quindi sostenibile soltanto se la cattura del pescato è commisurata alla capacità naturale degli stock di riprodursi ed accrescersi. Ogni qualvolta la pesca preleva più del "surplus di produzione" di uno stock, cioè il prelievo da pesca non è commisurato ai tassi di natalità, accrescimento e mortalità di una popolazione, si ha sovra sfruttamento e l'abbondanza degli stock comincia a diminuire. Questa diminuzione può essere più o meno grave a seconda della struttura d'età e dello stato riproduttivo dello stock, nonché della variabilità nelle condizioni ambientali ed ecologiche. L'attività di pesca è, pertanto, un'attività economica che ha le fondamenta profondamente radicate nella biologia e nell'ecologia delle specie pescate e che, se vuole durare nel tempo, non deve considerare la cattura come una variabile indipendente dalla capacità di rinnovo degli stock. Sebbene siano stati apportati alcuni miglioramenti verso una pesca italiana più sostenibile (Sabatella *et al.*, 2017), c'è ancora molta strada da percorrere per spostare la pesca nel Mediterraneo verso l'obiettivo del MSY (rendimento massimo sostenibile) al 2020, con tutte le difficoltà legate alla caratteristica di multispecificità di molti sistemi di pesca nell'area. Nell'ambito del programma quadro di riorganizzazione (FWP-Framework Programme) del GFCM, sono in fase di preparazione alcuni piani pluriennali di gestione della pesca di stock condivisi tra più paesi per il Mediterraneo occidentale, centrale ed orientale (Rapporto Annuale sulla Pesca e sull'Acquacoltura in Sicilia, 2017).

L'acciuga europea (*Engraulis encrasicolus*) risulta essere tra le più importanti risorse alieutiche in molte regioni del Mar Mediterraneo e dai dati FAO del 2020, emerge che, la pesca delle acciughe ha rappresentato in media il 28,4% degli sbarchi annui totali per le principali specie commerciali, che rappresentano oltre l'1% di sbarchi totali nell'area di applicazione GFCM 2016-2018.

La strategia di medio termine del GFCM (2017-2020), verso la sostenibilità della pesca nel Mar Mediterraneo e nel Mar Nero, riconosce l'importanza di informazioni accurate, tempestive e di dati socioeconomici completi sulla pesca al fine di migliorare la consulenza fornita alla Commissione. Si chiede l'attuazione di un'indagine regionale globale sulle caratteristiche socioeconomiche della pesca nel Mediterraneo e nel Mar Nero, con particolare enfasi sulla raccolta di dati affidabili sugli impatti di piccola pesca (SSF) (Fao 2020)

L'obiettivo principale del piano di gestione è senza dubbio il recupero degli stock entro i limiti biologici di sicurezza. I diversi sistemi e metodi di cattura delle specie ittiche sono strettamente dipendenti dalle caratteristiche biologiche dei pesci. Pertanto secondo la PCP, se l'attività della pesca non è sottoposta a corrette regole di gestione, si rischia l'esaurimento dell'unità produttiva. Proprio per tale motivo, risulta di fondamentale importanza salvaguardare la riproduzione degli stock ittici.

L'acciuga europea (*Engraulis encrasicolus*)

L'acciuga è un pesce gregario e vive in grossi banchi che compiono importanti migrazioni avvicinandosi alla costa in primavera-estate (periodo riproduttivo), mentre trascorrono il restante periodo scendendo a maggiori profondità (100 –180 m nel Mediterraneo, 60 –70 m nel Mar Nero) (Dati FAO). Ha abitudini trofiche diurne e si nutre principalmente di fito- e zoo-plancton (essenzialmente copepodi e larve di molluschi), uova di pesce e larve filtrando l'acqua mediante una struttura anatomica posta sugli archi branchiali. La stagione riproduttiva per l'acciuga del Mediterraneo centrale va da aprile a ottobre, con picchi di deposizione durante i mesi più caldi (Basilone et al., 2006). Le femmine producono circa 4.000 uova alla volta, che vengono, generalmente, rilasciate negli strati superficiali (primi 100 m di profondità), a piccoli lotti (Varagnolo, 1965; Ghirardelli, 1967) e, generalmente, dopo il tramonto e nelle prime ore della sera (Basilone et al., 2015). Le uova emesse sono galleggianti, di forma ellissoidale, poco più lunghe di 1 millimetro (Varagnolo, 1967; Regner, 1996), vengono affidate alle correnti marine e schiudono nell'arco di 24-36 ore (Holden e Raitt, 1974). Le larve alla schiusa sono lunghe circa 2 mm e molte di esse sono destinate ad essere predate.

LA BIOLOGIA RIPRODUTTIVA DELL'ACCIUGA EUROPEA

Le acciughe sono una specie ovipara a fecondazione esterna e iteropara cioè in grado di deporre più volte nell'arco della vita e all'interno di una stagione riproduttiva. Come la maggior parte dei pesci, le acciughe sono riproduttori ciclici e l'ovario cambia radicalmente di aspetto e dimensioni nelle distinte fasi del ciclo riproduttivo.

In generale però, bisogna distinguere due differenti modalità di deposizione e due differenti tipi di fecondità. Vi sono due tipologie di deposizione: totale o parziale.

Si definisce deposizione totale quella in cui si ha un singolo evento di rilascio di ovociti durante la stagione riproduttiva, invece nella deposizione parziale si hanno più eventi depositivi per ciascun individuo nell'arco di una stagione riproduttiva, quindi le uova vengono liberate in più gruppi successivi, come nel caso delle acciughe.

La fecondità, invece, si distingue in due categorie. Quella determinata, che è caratterizzata da un discontinuo reclutamento, nella quale vi è un "gap" temporale nella distribuzione di ovociti tra il primo e il secondo reclutamento di quest'ultimi. In questo caso il numero di ovociti è predeterminato all'inizio della stagione riproduttiva. Invece, nella fecondità indeterminata, a reclutamento continuo, gli ovociti sono continuamente reclutati durante la stagione riproduttiva. Quindi si possono trovare differenti stadi di maturità degli oociti/ovociti all'interno delle gonadi, perché la maturazione e la vitellogenesi sono processi continui durante tutta la fase di riproduzione. In questo caso il numero di ovociti che verranno depositi non è stimabile preventivamente, all'inizio del periodo riproduttivo. La vitellogenesi è un lungo processo durante il quale avvengono importanti e visibili cambiamenti degli ovociti: la taglia aumenta, il tuorlo si accumula progressivamente nel citoplasma e appaiono inclusioni citoplasmatiche. La vitellogenesi è divisa in tre stadi: primaria,

secondarie e terziaria. Nel primo stadio il tuorlo è ristretto alla periferia dell'ovocita del nucleo. Mentre nel secondo stadio si possono vedere granuli di tuorlo più grandi. Invece nell'ultimo stadio l'accumulo del tuorlo è completato e l'ovocita si presenta molto più grande.

Lo sviluppo degli ovociti è un fenomeno di tipo progressivo. Generalmente, gli ovari si classificano per lo stadio di sviluppo più avanzato riscontrato al suo interno indipendentemente dalla sua frequenza, perché l'apparizione di un tipo di ovocita indica con sicurezza l'inizio del successivo stadio di sviluppo. Una corretta identificazione dello stadio riproduttivo raggiunto dagli individui è fondamentale per un'accurata determinazione del potenziale riproduttivo, per un'attenta distinzione tra immaturi e maturi e quindi tra attivi e inattivi.

Le zone di deposizione dei pesci pelagici devono assicurare una produzione biologica adeguata per il sostentamento delle larve: Lasker (1978) associa la deposizione dell'acciuga e il conseguente successo del reclutamento con la stabilità delle condizioni ambientali. La posizione delle aree di riproduzione e di nursery è determinata dal sistema di correnti prevalente nell'area geografica in cui è distribuita la popolazione e tende a rimanere stabile nel tempo.

L'inizio della stagione riproduttiva dell'acciuga europea è temperatura-dipendente (Furnestin e Furnestin, 1959; Palomera, 1992; Giráldez e Abad, 1995; Motos *et al.*, 1996; Millán, 1999), sebbene non si ritenga che questa sincronia sia legata al raggiungimento di una soglia di temperatura sotto la quale la riproduzione delle acciughe non possa avvenire, infatti, questa specie si riproduce all'interno di un ampio range di temperatura, da 11,6° a 27,5°C (Regner, 1996). Le alici potrebbero, quindi, deporre tutto l'anno alle temperature del Canale di Sicilia. La sincronia tra ciclo riproduttivo e temperatura è probabilmente una strategia che si è evoluta per permettere la deposizione delle uova durante il periodo dell'anno in cui la stabilità delle masse d'acqua è più alta. Stabili condizioni della colonna d'acqua favoriscono l'aggregazione delle prede, ovvero una concentrazione maggiore di alimento che può garantire la sopravvivenza delle larve (Basilone *et al.*, 2006).

Il successo del reclutamento è funzione del numero di uova prodotte, della frequenza di deposizione e delle cure parentali, che dipendono dalla struttura di taglia ed età della popolazione e dalla disponibilità di energia per i riproduttori (Marshall *et al.*, 1998; Cardinale e Arrhenius, 2000; Lloret e Rätz, 2000; Yaragina e Marshall, 2000; Morgan e Bratney, 2005).

MATERIALI E METODI

Raccolta dei campioni ed analisi macroscopica delle gonadi

Nel corso delle campagne oceanografiche mirate al monitoraggio di specie ittiche nel Canale di Sicilia, sono stati effettuati vari campionamenti con rete pelagica, che hanno permesso di prelevare esemplari di femmine adulte di acciuga europea, durante il loro picco riproduttivo (da maggio ad agosto).

Per ogni cattura sono stati selezionati in modo random, 50 - 75 individui (fig. 1); successivamente sono stati registrati i corrispettivi dati biometrici - lunghezza totale (0,01 mm), peso totale e somatico (0.01 g) dopodiché si è proceduto alla determinazione del sesso e della maturità sessuale (fig. 2) mediante analisi macroscopica e facendo riferimento ad una specifica scala a 6 stadi (ICES 2008 - fig. 3). Gli ovari sono stati asportati integralmente dalla cavità addominale, conservati in apposite vials in vetro da 20 ml e fissati subito in formalina al 10% neutralizzata. In ogni vials viene indicato: *il numero progressivo del campione, la data di campionamento e il numero della cala per risalire alla posizione - area della cattura*. Questi ultimi sono dati indicativi per catalogare al meglio i campioni durante le fasi di processamento in laboratorio.



Figura 1. Classificazione della specie *Engraulis encrasicolus* e selezione random degli individui



Figura 2. Determinazione gonadica macroscopica sottoposte in vials da 20ml con fissativo via perfusione (formalina neutralizzata)

Stadio	Attività	Nome	Femmine	Maschi
1	Inattivo	Immaturato (o a riposo)	Ovari invisibili o molto piccoli, filiformi, trasparenti o lievemente colorati (se a riposo).	Ovari molto piccoli e trasparenti, difficili da identificare. Quando a riposo, di colore arancio-rossastro.
2		In maturazione	Gli ovari occupano da ¼ a 1/3 della cavità addominale; di colore rosato o giallastro. Non ci sono ovociti visibili.	I testicoli occupano circa 1/3 della cavità addominale. Di colore bianco-grigiastro.
3	Attivo	Deposizione imminente	Gli ovari occupano dai ¼ a quasi tutta la cavità addominale; opachi di colore giallo o arancio. Sono visibili ovociti opachi.	Testicoli biancastri lunghi fino a 2/3 della cavità addominale. A seguito di una leggera pressione, non espellono sperma.
4		Deposizione	Ovari grandi che occupano per intero la cavità addominale. Dall'aspetto gelatinoso, parzialmente o totalmente traslucidi. Sono visibili oociti ialini.	Testicoli rigonfi e dall'aspetto lattiginoso occupano l'intera cavità addominale. Espellono immediatamente lo sperma, a seguito di una leggera pressione.
5		Post-deposizione parziale	Ovari grandi da ½ a ¾ della cavità addominale, non turgidi e con zone emorragiche, che conferiscono colorazione rosso scuro.	Testicoli defilate occupano fino a 2/3 della cavità addominale. Di colore marrone/rossastro.
6	Inattivo	Esausto	Ovari rossastri e raggrinziti e flaccidi, di dimensioni inferiori a 2/3 della cavità addominale. Può essere ancora visibile qualche piccolo ovocita opaco.	Testicoli flaccidi e sottili, dall'aspetto emorragico.

Figura 3 Caratteristiche macroscopiche delle gonadi nei sei stadi di sviluppo tabella ICES - 2008

ANALISI ISTOLOGICA DELLE GONADI FEMMINILI

I tessuti sono stati analizzati e processati presso il laboratorio di istologia dell'Istituto per lo studio degli impatti Antropici e Sostenibilità in ambiente marino S.S. di Capo Granitola.

Una volta in laboratorio, dopo un periodo di assestamento dei tessuti in formalina di almeno tre mesi, gli ovari sono stati pesati (± 0.001 g) e sono state apportate le opportune correzioni dovute all'aumento di peso a causa della formalina (Bonanno *et al.*, 2001) e dell'idratazione quando si trattava di femmine deponenti (Hunter e Macewicz, 1985).

Sebbene numerosi studi hanno mostrato che non vi siano differenze significative tra le porzioni laterali e centrali, né tra i due lobi destro e sinistro degli ovari (Sanz e Uriarte, 1989; Mazzola *et al.*, 2000), si è scelto di prelevare da ciascun lobo di ogni gonade una o due porzioni di tessuto (dello spessore di circa 2 mm) per la preparazione delle sezioni sottili (*fig. 4*).

Questa operazione consta di una fase preliminare durante la quale i tessuti vengono opportunamente predisposti, tramite immersioni per tempi prestabiliti e differenziati in ciascun cestello del processore automatico di tessuti (Leica TP 1020) (*fig. 5*). I cestelli contengono ognuno circa 1,5 l di soluzioni con diverse funzioni nel processo di preparazione del tessuto per le successive fasi di lavorazione. Terminata la fase di processamento i campioni hanno subito i seguenti processi:

- 1) **DISIDRATAZIONE:** avviene mediante una scala ascendente di alcoli (70%, 96%, e assoluto) per eliminare la componente acquosa che non permetterebbe l'entrata della paraffina nel tessuto;
- 2) **DIAFANIZZAZIONE:** si utilizza toluene per rendere il campione diafano cioè trasparente e penetrabile da parte della paraffina;

- 3) **INFILTRAZIONE:** avviene in paraffina fusa a 60° per permettere alla paraffina di sostituirsi gradualmente al toluene all'interno del campione.

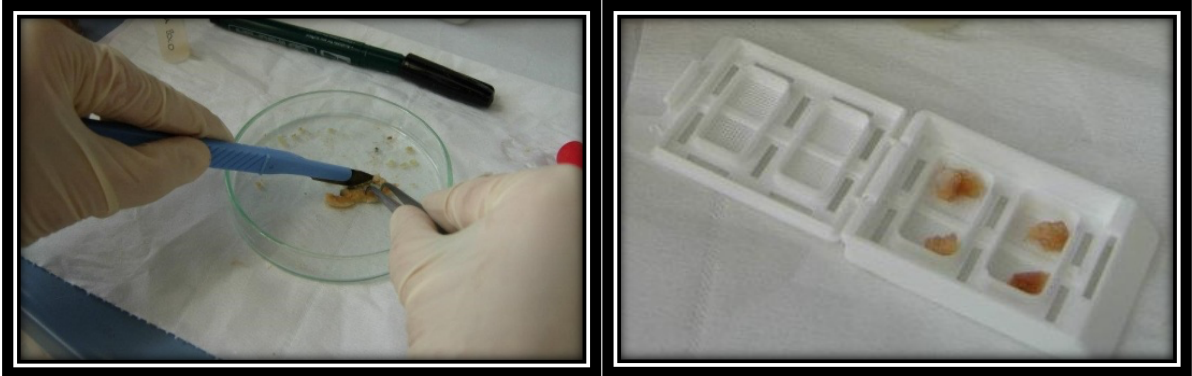


Figura 4 Porzioni di gonadi di acciuga dopo la fissazione, poste in apposite cassettoni da biopsia.



Figura5 Processatore automatico Leica TP 1020

Il secondo passo è l'inclusione in paraffina: è stato utilizzato un dispensatore automatico (Leica EG1150H - fig. 6) di paraffina liquida a 65 - 70°C; i campioni di tessuto sono stati inclusi in blocchetti di paraffina tramite supporto specifico; la conclusione della formazione del blocchetto viene rappresentata dal "rabocco"; consiste nel versare per la seconda volta la paraffina liquida, prima che si solidifichi definitivamente il blocchetto e serve principalmente per espellere possibili bolle d'aria formati durante la fase della prima paraffina versata (Fig. 7)

Successivamente la cassettoni è posta su una piastra raffreddante che ne accelera la solidificazione (fig.8)

Una volta avvenuta la solidificazione, che in termini di tempo avviene entro 3 o 4 ore, i blocchetti vanno separati dal supporto di acciaio (*fig. 9*). Prima di procedere all'operazione di taglio è fondamentale mettere in un normale freezer, per almeno 6/8 ore, i blocchetti ottenuti.



Figura 6 Piastra raffreddante (sinistra) e dispensatore di paraffina (a destra)

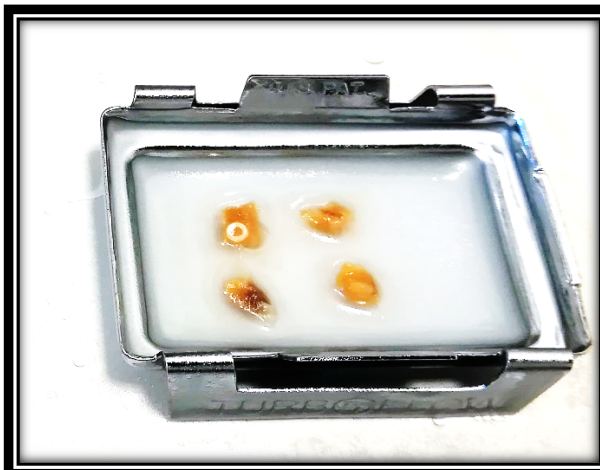


Figura 7 Supporto in acciaio con prima colatura in paraffina e porzioni di tessuto

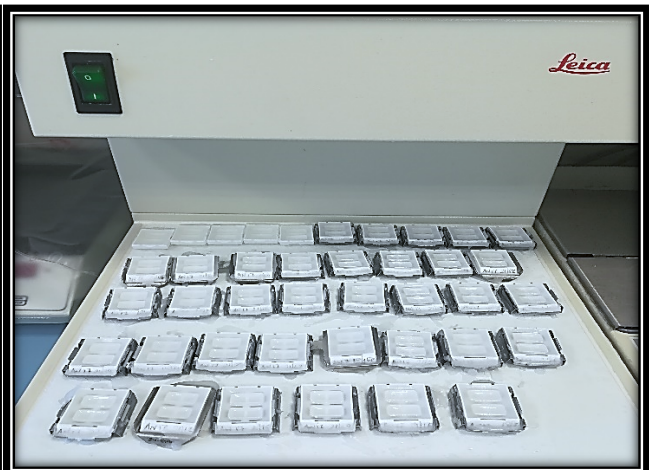


Figura 8 Cassettine poste su piastra raffreddante per la solidificazione

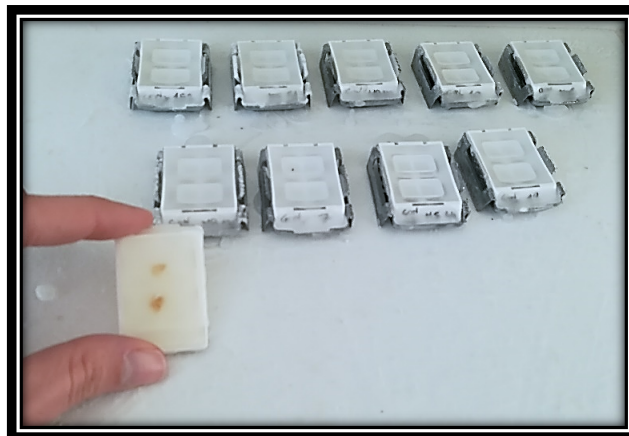


Figura 9. Blocchetti in paraffina solidificati

A questo punto, vengono tagliate le sezioni sottili, utilizzando un microtomo rotativo automatico. Il taglio richiede particolare attenzione, può essere definita la fase più delicata per produrre una buona sezione. Il blocchetto di paraffina viene posizionato su un supporto per poi essere tagliato mediante l'uso del microtomo rotativo (Leica RM2255 fig. 10). In un primo momento è stata effettuata un'operazione di "sgrossatura", per rimuovere l'eccesso di paraffina sopra il campione (attraverso tagli ripetuti di spessore di 14 μm); in un secondo momento, sono state ricavate delle sezioni sottili, generalmente di 4 μm di spessore (fig. 11).



Figura 10. Microtomo rotativo semiautomatizzato

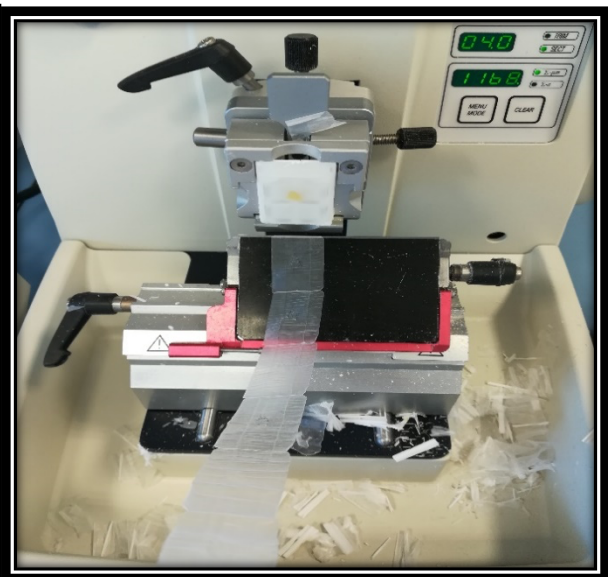


Figura 11. Sezioni sottili di 4 micron

Ogni sezione, subito dopo il taglio, è stata immersa in un bagno termostato (Leica HI1210) con acqua ad una temperatura variabile tra i 36° e 38°C per facilitare la distensione e il posizionamento su un vetrino porta-oggetto (fig. 12 e 13).



Figura 12 Bagno termostato (Leica HI1210)



Figura. 13 Distensione delle sezioni



Figura14 Supporto per i vetrini



Figura.15 Stufa ventilata

Solo dopo aver finito un set di 30 vetrini attraverso un supporto plastico (fig.14), vengono poste in stufa ventilata per eliminare l'acqua in eccesso a 48°C per 48 ore (fig.15).

Infine, le sezioni vengono colorate con ematossilina-eosina utilizzando il metodo di Harris (Luna, 1968) per evidenziare le varie strutture cellulari che determineranno lo stadio di maturità microscopico attraverso le letture al microscopio. Il procedimento è attuato utilizzando un coloratore di vetrini automatizzato (Leica AutoStainer XL - fig.16), ove è stato memorizzato un protocollo specifico per gli ovari di acciuga europea che dura circa un'ora. Come nel caso del protocollo effettuato dal processatore automatico di tessuti, il protocollo di colorazione dipende dal tessuto che si sta analizzando. Il protocollo usato prevede come primo step la rimozione della paraffina e la reidratazione delle sezioni sottili, altrimenti è impossibile che il colorante si fissi sul tessuto. Successivamente si ha la colorazione effettiva, proprio a seguito di immersioni in ematossilina, che tinge di blu il nucleo e le altre strutture acide (RNA, reticolo endoplasmatico, ecc.), e in una soluzione di eosina, che colora da rosa a rosso le proteine citoplasmatiche.

Dopo la colorazione i vetrini seguono il passaggio finale che è il montaggio in balsamo: consiste nell'interporre uno strato di resina sintetica tra vetrino porta- e copri-oggetto (Fig. 17).

Di seguito un collage che sintetizza le varie fasi di processamento di un preparato istologico (Fig. 18).



Figura 16. Coloratore automatico Leica AutoStainer XL

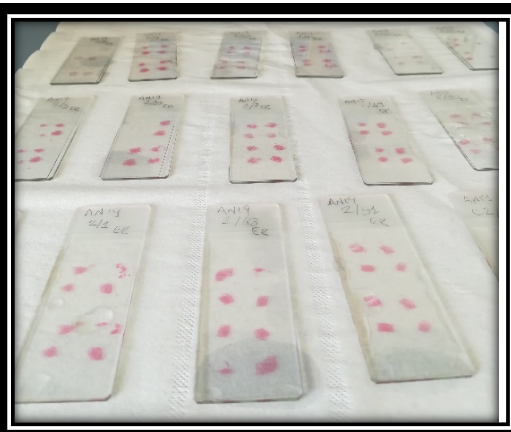


Figura 17. Montaggio dei vetrini

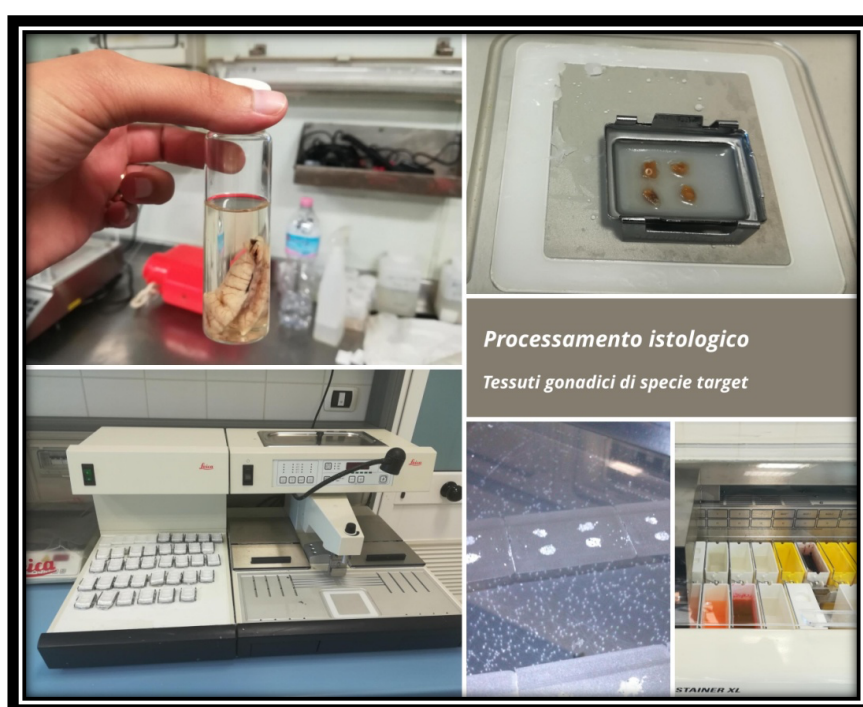


Figura 18 Sintesi delle varie fasi di preparazione delle sezioni istologiche.

OSSERVAZIONE DEI PREPARATI ISTOLOGICI

Il progresso tecnologico ha portato nel corso del tempo alla nascita di diversi tipi di microscopio: accanto al tradizionale microscopio ottico, che si basa sull'uso di lenti per focalizzare ed indirizzare la luce visibile, vi sono anche strumenti che sfruttano invece fasci di elettroni quali sorgente di luce. È il caso ad esempio del microscopio elettronico a scansione (SEM) e del microscopio elettronico a trasmissione (TEM). Nonostante questi ultimi siano tanto potenti da permettere di osservare

componenti persino più piccoli di una cellula o dei suoi organelli, avendo una risoluzione che può scendere a livello molecolare, il microscopio ottico resta tutt'ora lo strumento principale tanto nella diagnostica clinica quanto negli studi classici d'individuazione, di tassonomia, di classificazione dei microrganismi e in istologia. L'osservazione al microscopio ottico o elettronico dei campioni biologici richiede che i preparati siano sufficientemente sottili da risultare trasparenti al fascio di luce o di elettroni e che sia preservata la morfologia delle cellule e degli organelli in esse contenuti. Generalmente quando si osserva un preparato istologico e quindi un tessuto, si fa uso del microscopio ottico. Il microscopio ottico utilizza un sistema di lenti capaci di raccogliere, indirizzare e focalizzare i raggi di luce emessi da una sorgente così da produrre un'immagine ingrandita di oggetti molto piccoli. La luce utilizzata è dello spettro del visibile e comprende pertanto le lunghezze d'onda percepibili all'occhio umano (dai 390 ai 700 nm circa). I microscopi moderni sono tutti strumenti composti: l'immagine ingrandita che si forma attraverso le lenti dell'obiettivo viene cioè ulteriormente amplificata per mezzo di una o più lenti aggiuntive (Fig. 19).

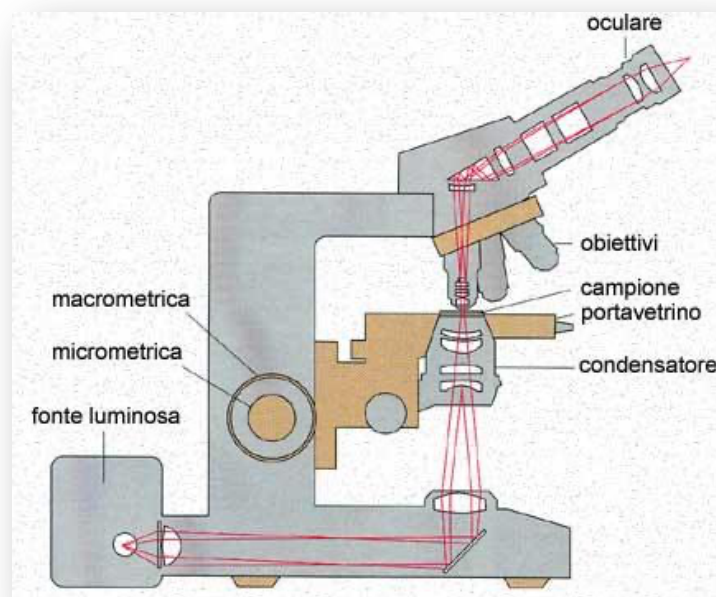


Figura 19 Il sistema d'illuminazione è costituito da una sorgente luminosa, che illumina il campione posizionato sul vetrino e da un condensatore che fa convergere la luce su quest'ultimo. L'apparato ottico è rappresentato invece da due sistemi di lenti (lenti dell'obiettivo e lenti dell'oculare). L'immagine viene quindi ingrandita dapprima dalle lenti dell'obiettivo, quindi da quelle dell'oculare: l'ingrandimento totale è pertanto il prodotto dei due diversi ingrandimenti (<https://www.microbiologiaitalia.it/microscopia>).

Su oculari e obiettivi sono riportati degli indici che informano sulle caratteristiche delle lenti e il loro potere di ingrandimento. Esistono oculari con diverso potere d'ingrandimento; di solito si utilizza il 10x (che significa

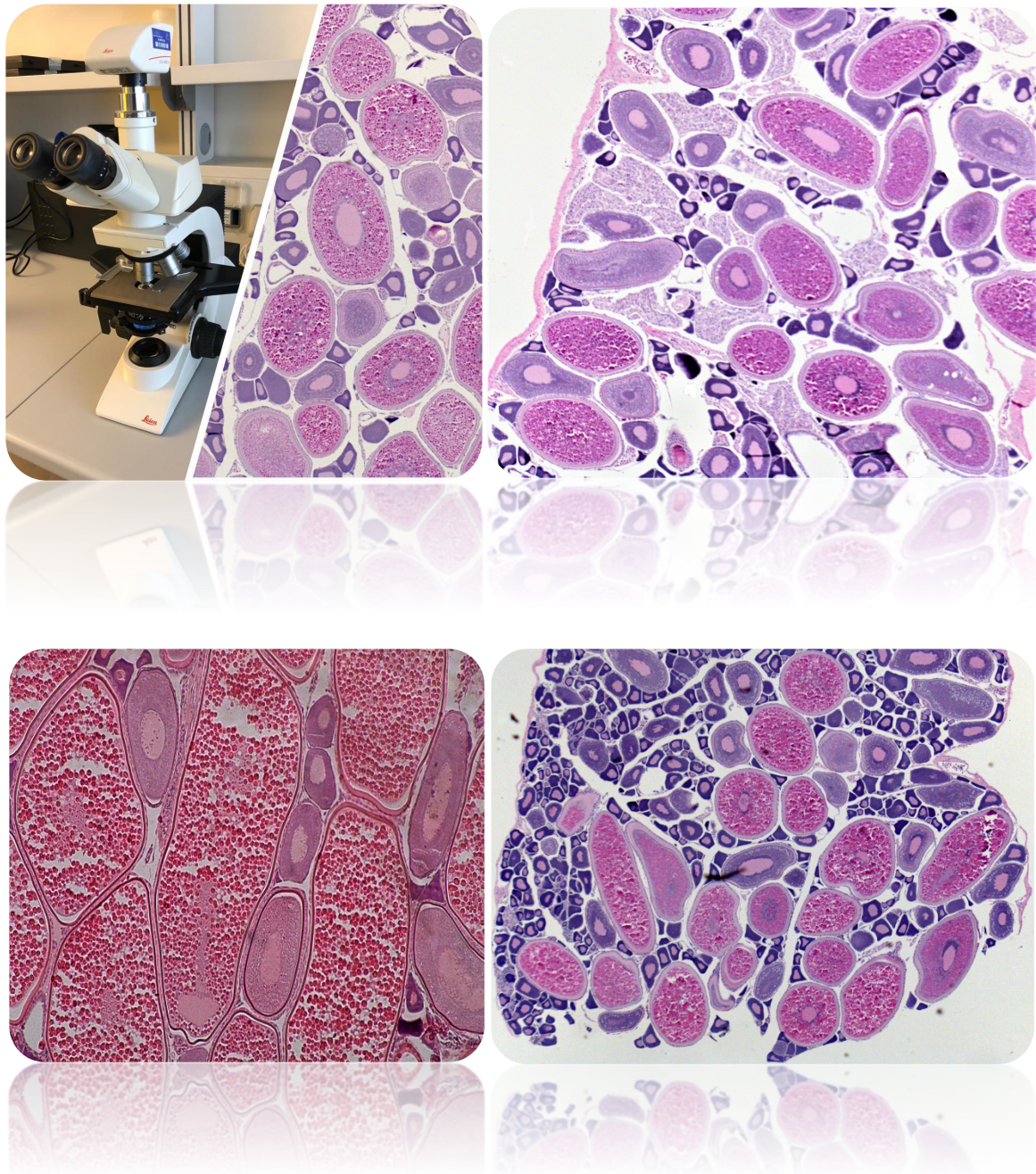


Fig. 21 Foto di alcune acquisizioni di tessuto gonadico femminile della specie *E.e.*

IMPORTANZA DELL'ANALISI MICROSCOPICA PER LA DETERMINAZIONE DELLA MATURITÀ SESSUALE NELLA VALUTAZIONE DELLO STOCK ASSESSMENT

Confronto tra due metodi di classificazione della maturità gonadica

L'approfondimento delle conoscenze sulla crescita e lo sviluppo degli ovociti (Yanamoto e Yoshoka, 1964; Wallace e Selman, 1981) e sulla biologia riproduttiva (Begenal, 1973; Hunter e Goldberg,

1980) delle specie ittiche ha permesso una più precisa definizione e determinazione della fecondità nei pesci, nonché della biomassa deponente e del potenziale riproduttivo dello stock. A tal fine, sono necessarie un'accurata distinzione tra individui immaturi e maturi e un'attenta valutazione dello stadio di maturità sessuale degli esemplari. Le suddette valutazioni possono essere effettuate attraverso due tipi di osservazioni del campione: macroscopica o microscopica.

Seppur più comunemente usata, la classificazione macroscopica risulta essere fortemente soggettiva e meno accurata rispetto alla classificazione microscopica. Nonostante i criteri prestabiliti dalle tabelle ICES 2008, la prima risulta essere approssimativa, anche a causa della elevata soggettività dell'operatore legata ad una non univocità delle caratteristiche descrittive ed identificative della classificazione macroscopica; l'uso di questo tipo di analisi deve essere affiancato dall'osservazione microscopica soprattutto nell'applicazione di metodi di stima della biomassa o nella determinazione della taglia di prima maturità sessuale, importanti fattori per fornire indicazioni gestionali necessarie alla sfruttamento sostenibile delle specie monitorate.

L'osservazione di determinate strutture cellulari determinano lo stadio di maturità in maniera più appropriata e con un livello di accuratezza più elevato. A confermare questa tesi sono anche alcune pubblicazioni (es., Ferreri et al 2009; Costa 2009), in cui l'analisi delle corrispondenze tra classificazioni macroscopiche e microscopiche hanno sottolineato la debolezza di quella macroscopica, anche se condotta da un operatore con esperienza, nelle migliori condizioni di campionamento e seguendo chiari criteri di valutazione ampiamente accettati dalla comunità scientifica.

(Ferreri, Rosalia, et al. "Validation of macroscopic maturity stages according to microscopic histological examination for European anchovy." *Marine ecology* 30 (2009): 181-187).

La classificazione macroscopica (tab. I) si effettua assegnando agli individui caratteristiche che si possono differenziare a occhio nudo. Tra le principali caratteristiche osservate ci sono: la dimensione delle gonadi rispetto alla cavità addominale, il colore, la presenza di vasi sanguigni visibili a occhio nudo e la turgidità. Il metodo macroscopico è il più semplice, economico e rapido, però può essere soggettivo e la sua precisione è sempre incerta: la maturazione è un processo continuo e la sua divisione in stadi discreti di sviluppo è difficile, soprattutto negli stadi di transizione.

La classificazione microscopica (tab. II), invece, si basa sull'analisi delle sezioni istologiche delle gonadi e fornisce un'informazione molto più dettagliata sullo stato di sviluppo degli oociti. I principali parametri osservati sono la presenza di ovociti immaturi e/o vitellati, la presenza di follicoli post-ovulatori e di atresia.

Esistono diverse scale di classificazione macroscopica, alcune proposte per una specie in particolare e altre nate semplicemente dal lavoro dei singoli laboratori ed istituti di ricerca, nonostante a livello microscopico esista scarsa differenza nella variazione del modello di sviluppo gonadico nei teleostei e quindi non è giustificata la proliferazione di schemi di maturazione per singole specie. La scelta della scala più appropriata da adottare risulta uno step fondamentale negli studi sul potenziale riproduttivo. Per i piccoli pelagici, un punto di riferimento è rappresentato dalla scala a cinque stadi proposta da Holden e Raitt (1974) e successivamente modificata dall'International Council for the Exploration of the Sea (ICES, 2004). Un ulteriore sforzo è stato prodotto dall'ICES, per ottenere una scala ancora più precisa per le acciughe e le sardine con caratteristiche più chiare e definite per ciascuno stadio; lavoro svolto durante un workshop mirato a cui hanno partecipato ricercatori di tutta Europa (ICES, 2008).

Stadio	Attività	Nome	Femmine	Maschi
1	<i>Inattivo</i>	Immaturato (o a riposo)	Ovari invisibili o molto piccoli, filiformi, trasparenti o lievemente colorati (se a riposo).	Ovari molto piccoli e trasparenti, difficili da identificare. Quando a riposo, di colore arancio-rossastro.
2		In maturazione	Gli ovari occupano da ¼ a 1/3 della cavità addominale; di colore rosato o giallastro. Non ci sono ovociti visibili. Gli ovari occupano dai ¼ a quasi tutta la cavità addominale; opachi di colore giallo o arancio. Sono visibili ovociti opachi.	I testicoli occupano circa 1/3 della cavità addominale. Di colore bianco-grigiastro.
3	<i>Attivo</i>	Deposizione imminente	Ovari grandi che occupano per intero la cavità addominale. Dall'aspetto gelatinoso, parzialmente o totalmente traslucidi. Sono visibili oociti ialini.	Testicoli biancastri lunghi fino a 2/3 della cavità addominale. A seguito di una leggera pressione, non espellono sperma.
4		Deposizione	Ovari grandi da ½ a ¾ della cavità addominale, non turgidi e con zone emorragiche, che conferiscono colorazione rosso scuro.	Testicoli rigonfi e dall'aspetto lattiginoso occupano l'intera cavità addominale. Espellono immediatamente lo sperma, a seguito di una leggera pressione.
5		Post-deposizione parziale	Ovari rossastri e raggrinziti e flaccidi, di dimensioni inferiori a 2/3 della cavità addominale. Può essere ancora visibile qualche piccolo ovocita opaco.	Testicoli defilate occupano fino a 2/3 della cavità addominale. Di colore marrone/rossastro.
6	<i>Inattivo</i>	Esausto		Testicoli flaccidi e sottili, dall'aspetto emorragico.

Tab. I Caratteristiche macroscopiche delle gonadi nei sei stadi di sviluppo (ICES 2008).

Maturità	Attività	Stadio	Stadio degli ovociti più maturi	POF			Atresia		
				Prevalenza	Stadio	Incidenza	Prevalenza	Stadio	Incidenza
Immaturato	Inattivo	1	Ovociti primari	No	-	-	No	-	-
		2	Alveoli corticali	No	-	-	Sì	β, γ, δ	Varia
	3	Vitellogenici (primari, secondari, terziari)	Sì	Varia	Varia	Sì	Tutti	Varia	
Maturo	Attivo	4	Iidratati	Sì	Molto vecchi	Molto bassa	Sì	Tutti	Varia
	Inattivo	5	Vitellogenesi primaria	Sì	Molto recenti	100%	Sì	Tutti	Varia
		6	Ovociti primari o con alveoli corticali	Sì	Vari	Bassa	sì	β, γ, δ	Varia

Tab. II Caratteristiche microscopiche gonadi nei sei stadi di sviluppo (ICES 2008).

Infine bisogna sottolineare che, dal momento che lo sviluppo degli oociti è di tipo progressivo, è necessario determinare un criterio da adottare per fare una classificazione in stadi. La classificazione può essere basata sulla percentuale di abbondanza di ciascun grado di sviluppo degli oociti nell'ovario, ma più correttamente, gli ovari si classificano per lo stadio di sviluppo più avanzato riscontrato nell'analisi indipendentemente dalla sua frequenza, perché l'apparizione di un tipo di oocita nell'ovario indica inequivocabilmente l'entrata nel successivo stadio di sviluppo.

Quindi l'importanza delle analisi istologiche diventa fondamentale rispetto alla sola indagine macroscopica, quando si conducono studi sulla fecondità, per la valutazione del potenziale riproduttivo e per le stime di biomassa deponente di uno stock.

BIBLIOGRAFIA

Gismondi, R., et al. Statistiche sulla pesca in Italia, uso integrato di indagini campionarie e dati amministrativi. Vol. 4. ISTAT working paper, 2020.

Fazio, Giocchino. "LE PRIORITÀ DEL FEAMP IN SICILIA E LA SUA ATTUAZIONE A METÀ "GIRO".
RAPPORTO ANNUALE SULLA PESCA E SULL'ACQUACOLTURA IN SICILIA-2017. Osservatorio Mediterraneo, 2018. 90-103.

FERRERI, Rosalia, et al. Validation of macroscopic maturity stages according to microscopic histological examination for European anchovy. Marine ecology, 2009, 30: 181-187.

MELO, Y. C. Multiple spawning of the anchovy *Engraulis capensis*. South African Journal of Marine Science, 1994, 14.1: 313-319.

MILLÁN, M. Reproductive characteristics and condition status of anchovy *Engraulis encrasicolus* L. from the Bay of Cadiz (SW Spain). Fisheries Research, 1999, 41.1: 73-86.

Ambroselli, Simone. "Istat working papers." ISTAT 24 (2019): 47-49.

FAO, GFCM. "The state of Mediterranean and Black Sea fisheries." Rome: FAO (2020).

IRBIM-PIANI-GESTIONE-ITALIANI-RAGONESE-NTR-ITPP-90-2018

Ferreri_955677_tesi.pdf - Ferreri_955677_tesi

Nicola Carlone, Raffaello Pompei. Microbiologia Farmaceutica. Napoli: edizioni Edises, 2013

Lansing M. Prescott John (ed altri) Microbiologia. Bologna: edizioni Zanichelli, 2005

SITOGRAFIA

[https://www.microbiologiaitalia.it/microscopia/il-microscopio-ottico-che-cose-e-come-funziona-
prima-parte/](https://www.microbiologiaitalia.it/microscopia/il-microscopio-ottico-che-cose-e-come-funziona-prima-parte/)

<https://www.microbiologiaitalia.it/microscopia>

[https://www.istitutomedici.edu.it/utenti/studenti/materiale-didattico/dispense-on-
line/materiale-prof-giovanni-nalin/botanica/313-il-microscopio-ottico/file](https://www.istitutomedici.edu.it/utenti/studenti/materiale-didattico/dispense-online/materiale-prof-giovanni-nalin/botanica/313-il-microscopio-ottico/file)

[https://www.isprambiente.gov.it/files2020/pubblicazioni/stato-ambiente/annuario
2020/2_Pesca_Finale_2019.pdf](https://www.isprambiente.gov.it/files2020/pubblicazioni/stato-ambiente/annuario-2020/2_Pesca_Finale_2019.pdf)

[https://www.researchgate.net/publication/347022058_The_State_of_Mediterranean_and_Black_
Sea_Fisheries_2020](https://www.researchgate.net/publication/347022058_The_State_of_Mediterranean_and_Black_Sea_Fisheries_2020)

<https://www.coispa.it/cms/archivio/download/doc-pesca-2011.pdf>