

## ASPETTI DELLA BIOLOGIA ED ANALISI DEL CICLO RIPRODUTTIVO DI GOBIO BENACENSIS (POLLINI, 1816) NEL NORDEST ITALIA

## BIOLOGY ASPECTS OF *GOBIO BENACENSIS* (POLLINI, 1816) IN NORTHEAST ITALY

MARCO BERTOLI<sup>1</sup>, PIERO GIULIO GIULIANINI<sup>1</sup>, CARLOTTA BOSCHIAN<sup>1</sup>, FILIPPO FRANZ<sup>1</sup>, ALBERTO PALLAVICINI<sup>1</sup>, VALENTINA TORBOLI<sup>1</sup>, PAOLO PASTORINO<sup>1,2</sup>, MARINO PREARO<sup>2</sup>, MASSIMO AVIAN<sup>1</sup>, ELISABETTA PIZZUL<sup>1\*</sup>

1. Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Via Giorgieri 10, 34127 Trieste, Italia, \*corresponding author [pizzul@units.it](mailto:pizzul@units.it), 0405588830
2. Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Via Bologna 148, 10154 Torino, Italia

**Parole chiave:** *Gobio benacensis*, struttura di popolazione, accrescimento, ciclo riproduttivo

**Keywords:** *Gobio benacensis*, population structure, growth rate, reproductive cycle

### Riassunto

Il presente studio si propone di approfondire la biologia ed il ciclo riproduttivo del gobione italiano (*Gobio benacensis*), specie endemica a corologia cisalpina inclusa nella categoria “Endangered” (EN) della lista rossa IUCN, con l’intento di fornire informazioni utili a redigere corretti piani gestionali volti alla conservazione della specie. Le indagini sono state condotte in un corso d’acqua del Bacino del Fiume Isonzo (Torrente Recca, Nordest Italia) ed hanno riguardato 86 esemplari catturati nell’aprile 2016 al fine di definirne la consistenza e la struttura della popolazione e 77 esemplari, catturati mensilmente e bimestralmente tra aprile 2016 e febbraio 2017, per la definizione del ciclo riproduttivo. Le curve di regressione del peso sulla lunghezza totale per i maschi ( $W=0,1253TL^{2,8770}$ ) e per le femmine ( $W=0,1555TL^{2,7554}$ ), confrontate mediante ANCOVA, non hanno denunciato differenze significative. I valori medi  $\pm$  deviazione standard dell’indice gonadosomatico GSI per i maschi sono compresi tra  $0,61\pm 0,49$  e  $1,75\pm 0,58$ , mentre per le femmine tra  $1,02\pm 0,88$  e  $14,15\pm 2,80$ . L’indice epatosomatico HSI ha denunciato range compresi tra  $0,05\pm 0,02$  e  $2,68\pm 1,26$  e tra  $0,25\pm 0,19$  e  $1,75\pm 0,58$  rispettivamente per i maschi e per le femmine. Le analisi istologiche di ovari e testicoli, analizzati per la prima volta nella specie, hanno permesso di identificare gli stadi di maturazione, che unitamente all’analisi del GSI indicano che la specie depone le uova a più riprese durante il periodo riproduttivo compreso tra aprile e giugno. Nei maschi è stata, tuttavia, evidenziata una prolungata attività riproduttiva che si protrae fino al mese di agosto.

### Abstract

The aim of the present work is to study the biology and the reproductive cycle of the Italian gudgeon *Gobio benacensis*, which is included as “endangered” (EN) in the IUCN Redlist, due to the endangered status, information could be useful for the correct management of the species and for the scheduling of focused conservation plans. Analyses were carried out within a watercourse included in the Isonzo River Basin (Recca Stream, Northeast Italy) and regarded 86 specimen collected during April 2016 in order to assess population consistence and structure, and 77 specimens collected monthly and bimonthly between April 2016 and February 2017 to

investigate the reproductive cycle. Regression between total length (TL) and body weight (W) obtained for males ( $W=0,1253TL^{2,8770}$ ) and females ( $W=0,1555TL^{2,7554}$ ) were analyzed using the ANCOVA and did not show significant differences. Mean values of the gonadosomatic index (GSI) ranged from  $0,61\pm 0,49$  and  $1,75\pm 0,58$  for males and from  $1,02\pm 0,88$  and  $14,15\pm 2,80$  for females. Hepatosomatic index (HIS) showed ranges between  $0,05\pm 0,02$  and  $2,68\pm 1,26$  for males and between  $0,25\pm 0,19$  e  $1,75\pm 0,58$  for females. Analyses of ovaries and testicles, firstly performed for this species, allowed to identify maturation stages. The results show that *G. benacensis* females repeatedly spawn during the reproductive period between April and June and that males prolonged reproductive activity until August.

## Introduzione

*Gobio benacensis* (Pollini, 1816), comunemente noto con il nome di gobione italiano, è una specie endemica a corologia cisalpina, la cui originale distribuzione interessa esclusivamente l'areale padano-veneto dell'Italia, dal Fiume Isonzo a Nord fino al Fiume Marecchia verso Sud (Bianco & Ketmaier, 2005; Bianco, 2009; Bontardelli *et al.*, 2013). In Veneto la specie è segnalata nei fiumi Tartaro, Bacchiglione (Bianco & Taraborelli, 1984; Bontardelli *et al.*, 2013), Sile, Piave, Livenza e Tagliamento (Bianco & Taraborelli, 1984). È assente nel versante ligure-tirrenico e la sua eventuale presenza nei fiumi Arno, Ombrone e Tevere è da imputarsi ad introduzioni (Bianco & Taraborelli, 1984; Stoch *et al.*, 1992; Crivelli, 2006; Candiotta & Bo, 2016). In Friuli Venezia Giulia la distribuzione della specie è incerta e molto frammentata, prevalentemente limitata alle acque del bacino del Fiume Isonzo.

Nel suo areale di distribuzione *G. benacensis* è attualmente in gran parte estinto (Bianco & Taraborelli, 1984) pertanto, proprio a causa della progressiva frammentazione delle sue popolazioni e della riduzione numerica delle stesse, la specie è inclusa nella categoria "Endangered" (EN) della lista rossa IUCN (Crivelli, 2006; IUCN, 2011; Freyhof & Brooks, 2011; Bianco & Ketmaier, 2015).

Tra i principali fattori che incidono negativamente sulla specie, accanto alle alterazioni ambientali causate da inquinamento ed alle modificazioni morfologiche dei corsi d'acqua (Bianco, 1995; Candiotta & Bo, 2016), va sicuramente citata l'introduzione della specie cogenetica europea, *Gobio gobio* (Linnaeus, 1758). Quest'ultima presenta un ampio areale di distribuzione che si estende dalla Corea all'Europa occidentale, esclusa la penisola Iberica e l'Italia, ove tuttavia la specie è stata introdotta (Kottelat & Persat, 2005; Szlachciak & Zabkiewicz, 2008; Tang *et al.*, 2011; Takács, 2012).

La maggior parte degli studi condotti sulle popolazioni di gobione italiano riguardano la sua identificazione tassonomica che ha seguito un percorso piuttosto travagliato; la specie è stata infatti inizialmente identificata come *Gobio gobio* (Gandolfi & Zerunian, 1987; Zerunian, 2004), successivamente come *Gobio gobio benacensis* (Bianco & Taraborelli 1984), quindi come *Gobio benacensis* (Candiotta & Bo, 2016). Kottelat & Freyhof (2007) attribuiscono alla specie il nome *Romanogobio benacensis*, contrariamente a Bianco & Ketmaier (2005), Bianco (2009), Bianco & Delmastro (2011), Takács (2012) e Bianco (2014) che lo riassegnano al genere *Gobio*. Caratteri meristici, morfologici ed analisi genetiche portano, infatti, a distinguere i gobioni italiani da quelli europei e da quelli appartenenti al genere *Romanogobio* (Bianco & Ketmaier, 2005).

In relazione alla rarità e a causa dell'esigua numerosità delle popolazioni di gobione italiano, diversi aspetti della sua biologia sono tuttora poco conosciuti e tra questi il ciclo riproduttivo; che Bianco (2009), Bontardelli *et al.*, (2013) e Albano *et al.*, (2014) indicano concludersi in periodo primaverile dopo una breve migrazione che porta gli esemplari a raggiungere aree a substrato ghiaioso sabbioso, dove le femmine depongono circa 2000 uova a più riprese.

Ritenendo fondamentale conoscere in modo più approfondito la biologia della specie, anche al fine di redigere corretti piani gestionali volti alla sua conservazione, in questo studio vengono riportati i risultati relativi ad un anno di indagini riguardanti il ciclo riproduttivo della specie in un corso d'acqua del bacino del Fiume Isonzo in cui la sua densità è tuttora piuttosto elevata.

## Materiali e Metodi

### *Area di studio*

I campionamenti si sono svolti nel Torrente Reca, affluente del Torrente Judrio facente parte del Bacino del Fiume Isonzo (Figura 1). Il Torrente Reca è lungo complessivamente 9,7 Km, nasce in Slovenia a Quisca (269 m s.l.m.), ed entra in Italia nel distretto delle Alpi Orientali, dove confluisce nel Fiume Judrio in località Vencò (Gorizia) (Figura 1).

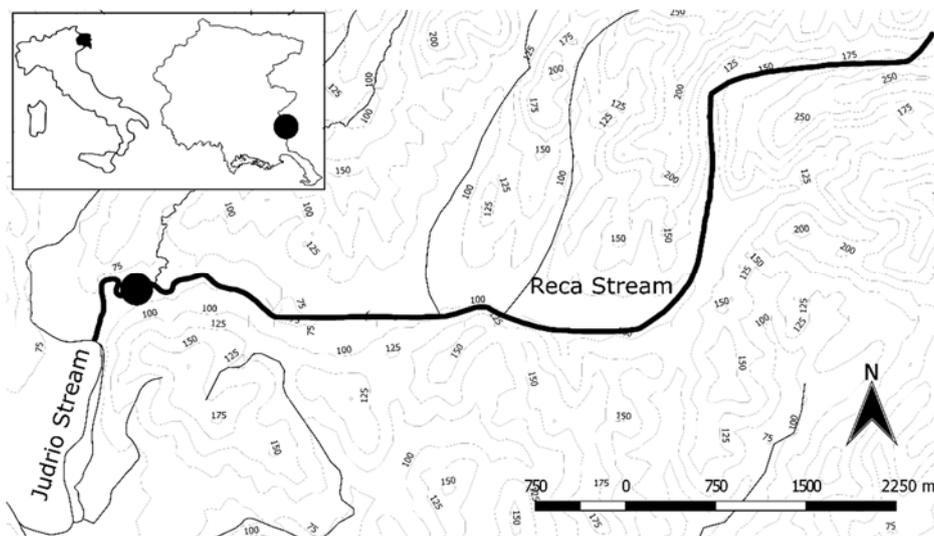


Figura 1. Collocazione della stazione di monitoraggio nel Torrente Reca

All'interno del territorio italiano il Torrente Reca scorre interamente nel comune di Dolegna del Collio. In quest'area il territorio è collinare, principalmente adibito ad agricoltura, in particolare alla coltivazione della vite. Sebbene abbia una larghezza dell'alveo bagnato di soli 5 m circa, il Reca presenta evidenti segni di erosione in entrambe le sponde, ad indicare che le portate di piena possono essere sporadicamente anche molto consistenti. La stazione di campionamento (Figura 1) si trova in territorio italiano e presenta vegetazione riparia costituita da piante arboree, arbustive ed erbacee che arrivano fino all'alveo bagnato e formano una fascia compatta lungo entrambe le sponde. La granulometria prevalente in alveo è composta da ciottoli e ghiaia. Nei pressi del punto di campionamento scelto per il presente studio è sita una stazione di monitoraggio dell'Agenzia Regionale Protezione Ambiente (ARPA) del Friuli Venezia Giulia, nella quale viene definito, mediante indagini biologiche e chimico-fisiche, lo stato del torrente ai sensi del D. Legs. 152/2006 e del D.M. 260/2010. Tali indagini hanno portato nel 2012 ad un giudizio "sufficiente" dello stato ecologico del torrente, mentre nel 2014 le medesime valutazioni hanno permesso di rilevare un miglioramento dello stato ecologico che è risultato "buono". Mensilmente da aprile a giugno 2016 e bimestralmente da giugno 2016 a febbraio 2017, nella stazione del Torrente Reca, contestualmente ai campionamenti ittici, sono stati rilevati i principali parametri chimico fisici nella colonna d'acqua, a supporto delle indagini biologiche. In particolare, sono stati effettuate misure di conduttività ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ ), pH, temperatura

(°C) ed ossigeno disciolto (% di saturazione) mediante uso di sonde da campo (Hanna Instruments Inc., Woonsocket, Rhode Island, U.S.A.: conduttivimetro HI 9033; pH-metro e termometro HI 9125; ossimetro HI 9147). I valori sono stati rilevati approssimativamente a metà della colonna d'acqua lungo una sezione rappresentativa del torrente, considerando diversi microhabitat. I valori medi e le relative deviazioni standard per il periodo di studio sono riportati in Tabella I.

Tabella I. Valori medi  $\pm$  deviazione standard dei parametri chimico fisici monitorati mensilmente (aprile-giugno) e bimestralmente (giugno – aprile) nel Torrente Reca

Mese	Temperatura (°C)	Ossigeno disciolto (%)	pH	Conduttività ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )
Aprile	12,20 $\pm$ 0,14	90,50 $\pm$ 2,12	7,45 $\pm$ 0,64	388,50 $\pm$ 12,02
Maggio	18,55 $\pm$ 1,06	91,50 $\pm$ 2,12	7,30 $\pm$ 0,28	395,00 $\pm$ 7,07
Giugno	18,15 $\pm$ 0,07	102,00 $\pm$ 1,41	7,94 $\pm$ 0,04	448,50 $\pm$ 24,75
Agosto	15,33 $\pm$ 3,75	90,00 $\pm$ 2,00	7,28 $\pm$ 0,02	487,00 $\pm$ 88,33
Ottobre	11,45 $\pm$ 0,07	91,25 $\pm$ 0,49	8,14 $\pm$ 0,14	589,00 $\pm$ 1,41
Dicembre	3,25 $\pm$ 0,07	95,40 $\pm$ 0,28	8,71 $\pm$ 0,02	557,50 $\pm$ 0,71
Febbraio	6,38 $\pm$ 0,10	81,50 $\pm$ 2,62	9,82 $\pm$ 0,55	534,25 $\pm$ 4,79

Mese	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (mg l <sup>-1</sup> )
Aprile	0,10 $\pm$ 0,01	14,80 $\pm$ 0,42	0,37 $\pm$ 0,09
Maggio	0,11 $\pm$ 0,00	16,30 $\pm$ 0,57	0,58 $\pm$ 0,07
Giugno	0,20 $\pm$ 0,06	14,00 $\pm$ 0,42	0,48 $\pm$ 0,02
Agosto	0,25 $\pm$ 0,01	10,87 $\pm$ 4,92	0,19 $\pm$ 0,03
Ottobre	0,40 $\pm$ 0,06	40,75 $\pm$ 1,91	0,12 $\pm$ 0,06
Dicembre	0,40 $\pm$ 0,08	43,90 $\pm$ 1,84	0,70 $\pm$ 0,86
Febbraio	0,32 $\pm$ 0,09	33,50 $\pm$ 5,80	1,44 $\pm$ 0,86

#### Campionamento ittico

Nel mese di aprile 2016 nel Torrente Reca è stato condotto un campionamento ittico, mediante elettrostorditore spallabile a batteria (IG200-2: 15-25 A, 150-200 V prodotto da Hans-Grassl GmbH, Schönau am Königssee, Germania) allo scopo di analizzare la struttura della comunità e più in particolare la densità e la struttura della popolazione di *Gobio benacensis*. I campionamenti sono stati eseguiti in un tratto di circa 200 m, all'interno del quale è stata applicato il metodo dei passaggi ripetuti (Seber & Le Cren, 1967; Seber, 1973). Tutti gli esemplari sono stati catturati e identificati a livello di specie, mentre sugli esemplari di *G. benacensis*, complessivamente 86, sono stati rilevati la lunghezza totale (TL) in cm ed il peso totale (W) in g e sono state estratte nella regione del tronco circa 5 scaglie per la determinazione dell'età. 11 gobioni di diversa taglia sono stati sacrificati, mediante overdose di anestetico tricaina metansolfonato MS-222 (Topic Popovic *et al.*, 2012), per l'analisi del ciclo riproduttivo; sugli stessi esemplari sono state anche condotte indagini genetiche per l'identificazione sistematica della specie. Gli altri esemplari sono invece stati liberati nel sito di prelievo senza che le operazioni ne avessero compromesso la vitalità.

I campionamenti sono stati quindi condotti mensilmente da aprile a giugno 2016, periodo in cui secondo diversi Autori (Bianco, 2009; Bontarelli *et al.*, 2013; Albano *et al.*, 2014) ha luogo la riproduzione della specie, e bimestralmente da giugno 2016 a febbraio 2017, per limitare al

minimo necessario la soppressione degli esemplari. Le catture sono sempre state eseguite con le modalità sopra descritte e ogni campionamento ha implicato il sacrificio di un numero variabile tra 8 e 14 esemplari, per un totale di 77, di taglia superiore a 4 cm, lunghezza totale in cui gli individui hanno 1 anno d'età e si apprestano al raggiungimento della maturità sessuale (Bontarelli *et al.*, 2013; Albano *et al.*, 2014); anche in questo caso la soppressione è avvenuta mediante overdose di anestetico.

Tutte le attività descritte nel presente lavoro sono state condotte su autorizzazione dell'Ente Tutela Pesca (ora Ente Tutela Patrimonio Ittico) del Friuli Venezia Giulia. Le procedure sperimentali sono state effettuate in accordo con le linee guida della Direttiva Europea 2010/63/EU circa la protezione degli animali utilizzati per scopi scientifici, applicando il principio 3Rs. La legislatura italiana (D. Lgs. 26/2014) che recepisce la direttiva europea non richiede autorizzazioni preventive (art. 2, d).

#### *Indagini genetiche*

Su 11 esemplari catturati nel corso del primo campionamento nell'aprile 2016 è stata effettuata un'indagine genetica mediante estrazione, amplificazione e sequenziamento del DNA. L'estrazione è stata eseguita utilizzando il kit E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit, mentre l'amplificazione della regione barcode mediante la tecnica DNA-barcoding. È stato quindi utilizzato il sistema di primer FishF2/FishR2 (Ward *et al.*, 2005) per amplificare il marcatore COI. Il profilo termico touch-down per l'amplificazione in PCR della regione, ha previsto uno step iniziale di attivazione della polimerasi a 95 °C per 1 minuto, seguita da 10 cicli comprendenti una fase di denaturazione a 95 °C per 30 secondi, una fase di annealing dei primer a 57 °C ed una fase di estensione a 72 °C per 45 secondi, cui sono seguiti altri 35 cicli con temperatura di annealing pari a 47 °C. Gli amplificati sono stati controllati successivamente su gel di agarosio 2,5% in TBE. La sequenza di COI per la specie è stata ottenuta mediante sequenziamento Sanger e allineata con BLASTn contro tutto il database nucleotidico disponibile in Genbank.

#### *Rilevazione dei caratteri meristici e delle variabili biometriche*

Sui 77 esemplari catturati mensilmente e bimestralmente sono stati rilevati i seguenti caratteri meristici: numero di scaglie della linea laterale (LLS); numero di scaglie tra la linea laterale e la pinna dorsale (SLLD); numero di scaglie tra la linea laterale e la pinna anale (SLLA); numero di scaglie circum-peduncolari (CS); numero di scaglie fra la pinna anale e quella ventrale (SVAF); numero di raggi della pinna dorsale (DFR); numero di raggi della pinna anale (AFR); numero di black spots laterali (LBS).

Sugli stessi esemplari sono state assunte, mediante calibro digitale (programma ImageJ. V.k 1.45) (Collins, 2007; Schneider *et al.*, 2012) 22 variabili biometriche, indicate in Figura 2.

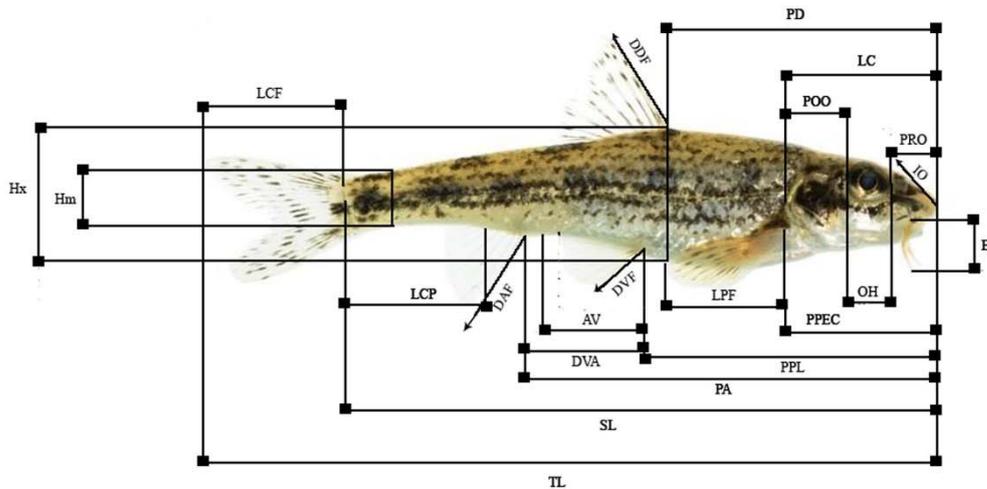


Figura 2. *Gobio benacensis* con indicati i parametri biometrici assunti (Foto di F. Bortolon)

#### Analisi del ciclo riproduttivo

Sugli esemplari catturati, in numero variabile tra 8 e 14, ad ogni campionamento mensile (aprile – giugno 2016) e bimestrale (giugno 2016 – febbraio 2017), sono state estratte le gonadi e il fegato, che sono state immediatamente pesate con bilancia analitica di precisione ( $x \pm 0,0001g$ ) per la determinazione degli indici gonadosomatico (GSI) ed epatosomatico (HSI).

Le gonadi sono state quindi fissate per 24 ore a temperatura ambiente in una soluzione SPAFG-modificata (Ermak & Eakin, 1976) e successivamente conservate in frigo fino alla loro inclusione in resina. I campioni sono stati lavati in una soluzione di PBS per 6 volte e poi fissati in una soluzione di tetrossido di osmio all'1% per 2 ore a temperatura ambiente. Quindi lavati per 3 volte, prima in acqua MilliQ e poi disidratati in alcool etilico al 70%, 96% e 100%; in seguito l'alcool è stato sostituito da ulteriori tre lavaggi con ossido di propilene. L'inclusione in resina si è svolta in due fasi: nella prima i campioni sono stati immersi in una soluzione di ossido di propilene e resina in rapporto 1:1 per 1 ora, poi immersi in una seconda soluzione di ossido di propilene e resina in rapporto 1:2 e lasciati nuovamente riposare tutta la notte a temperatura ambiente con i contenitori aperti; nella seconda fase la resina è stata sostituita con resina pura, lasciata riposare a temperatura ambiente per 2 ore e infine messa a polimerizzare in stufa a 60 °C per tutta la notte. Dopo la polimerizzazione i campioni sono stati conservati a temperatura ambiente (Electron Microscopy Sciences, USA; Peruzza *et al.*, 2015). I campioni inclusi in resina sono stati tagliati in sezioni semi-fini dello spessore di 1  $\mu m$ , utilizzando un ultramicrotomo Pabisch TOP Ultra 150 (Pabisch, Germany) e colorati utilizzando il blu di toluidine (0,5% toluidine blue, 0,1% sodium carbonate a pH 11,1). Ciascun campione è stato sezionato in tre diverse aree: apicale, mediana e distale. Per le gonadi femminili sono stati misurati i seguenti parametri: diametro degli oociti ( $\varnothing OO$ ,  $\mu m$ ), diametro dei globuli vitellini ( $\varnothing Gv$ ,  $\mu m$ ), diametro dei granuli vitellini ( $\varnothing gv$ ,  $\mu m$ ), diametro delle vescicole vitelline ( $\varnothing Vv$ ,  $\mu m$ ), diametro delle gocce lipidiche ( $\varnothing L$ ,  $\mu m$ ), diametro del nucleo ( $\varnothing N$ ,  $\mu m$ ), diametro dei nucleoli ( $\varnothing n$ ,  $\mu m$ ) e spessore della zona radiata ( $Zr$ ,  $\mu m$ ). Per quanto attiene alle gonadi maschili è stata misurata l'area contenente spermatozoi liberi ( $A Sz$ ,  $\mu m^2$ ) e l'area totale ( $A tot$ ,  $\mu m^2$ ). I vetrini sono stati fotografati e le misure istologiche sono state effettuate usando il programma ImageJ (ver. k 1.45) (Collins, 2007; Schneider *et al.*, 2012).

### Analisi statistica

I dati relativi alla lunghezza totale ed al peso degli individui sono stati utilizzati per ottenere due curve di regressione, separatamente per i due sessi, che sono state confrontate statisticamente tramite uso dell'ANCOVA, previa linearizzazione mediante trasformazione logaritmica. I risultati sono stati interpretati considerando un livello di significatività pari allo 0,05%. Le analisi sono state condotte utilizzando il software STATISTICA 7.1.

### Risultati

Nel Torrente Reca *Gobio benacensis* è presente con densità considerabili discrete e condivide l'areale prevalentemente con Ciprinidi (Figura 3).

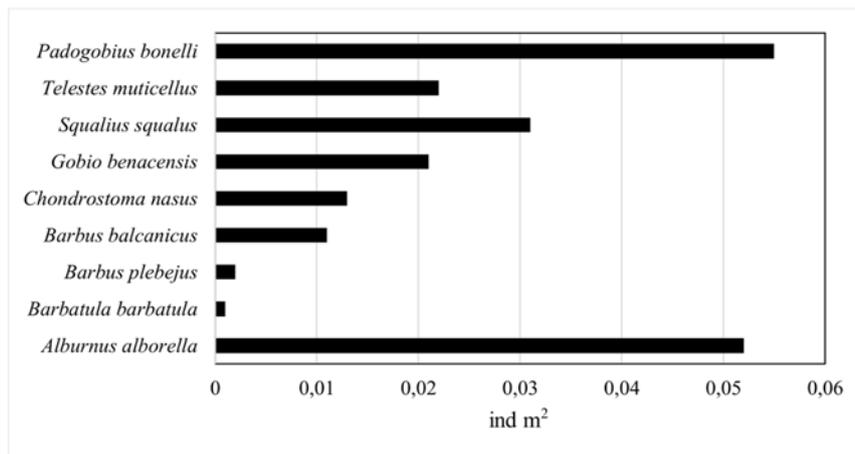


Figura 3. Densità (ind m<sup>2</sup>) delle specie costituenti la comunità ittica nel Torrente Reca

Nel corso del campionamento esplorativo, condotto nell'aprile 2016, la popolazione di gobione, complessivamente composta da 86 esemplari, è risultata costituita da 6 classi di età (0-5 anni), i cui range relativi alla lunghezza totale (TL) hanno denunciato ampie sovrapposizioni per quanto attiene alle classi centrali (2-4 anni) (Figura 4).

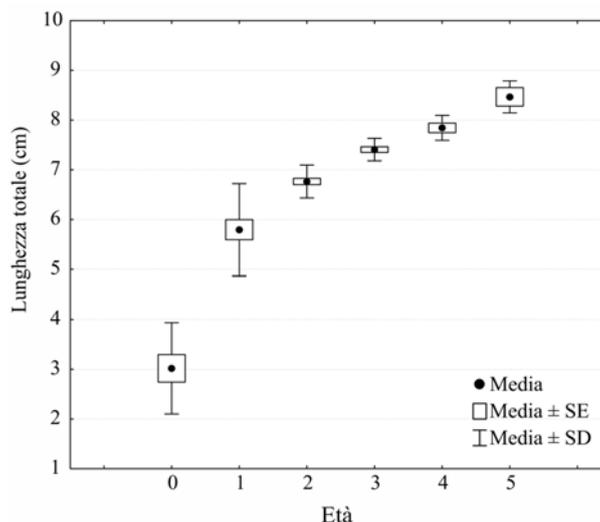
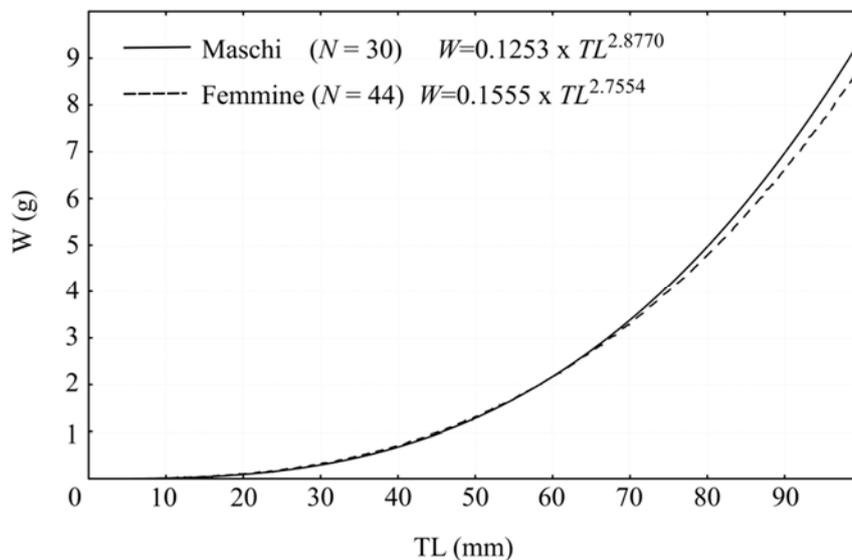


Figura 4. Box plot della lunghezza totale nelle 6 classi d'età riscontrate nella popolazione di *Gobio benacensis* nel Torrente Reca

*Tabella II. Valori dei caratteri meristici analizzati sugli esemplari campionati nel corso del presente studio. LLS = Scaglie sulla linea laterale; SLLD = numero di scaglie tra la linea laterale e la pinna dorsale; SLLA = numero di scaglie tra la linea laterale e la pinna anale; CS = numero di scaglie circum - peduncolari; SVAF = numero di scaglie tra le pinne ventrali e anali; DFR = numero di raggi molli della pinna dorsale; AFR = numero di raggi molli della pinna anale; LBS = numero di macchie nere laterali*

	N	Media	DS	Min	Max
LLS	77	38,1	1,15	37	42
SLLD	77	6,7	0,59	6	8
SLLA	77	4,2	0,67	3	6
CS	77	12,7	0,98	11	15
SVAF	77	2,6	0,49	2	3
DFR	77	7,2	0,79	5	9
AFR	77	5,3	0,51	4	6
LBS	77	8,1	1,21	6	11

Sugli stessi esemplari è stata calcolata, distintamente per i due sessi, la regressione del peso totale (W) sulla lunghezza totale (TL) (Figura 5); le curve ottenute sono risultate significative ( $p\text{-level} < 0,01$ ). L'applicazione dell'ANCOVA non ha permesso di evidenziare differenze significative tra i coefficienti delle due curve ( $F_{72,1} = 0,670$ ,  $p\text{-level} = 0,416$ ), pertanto le principali statistiche delle 22 variabili biometriche assunte sono state calcolate sul totale degli esemplari senza distinzione di sesso (Tabella III).



*Figura 5. Regressione del peso totale (W) sulla lunghezza totale (TL) distintamente per gli esemplari di sesso maschile e femminile di Gobio benacensis*

Tabella III. Statistiche generali delle 22 variabili biometriche assunte

	N	Mean	SD	Min	Max	CV%
<i>TL</i>	69	7,27	1,22	4,67	9,56	16,83
<i>SL</i>	74	5,96	1,02	3,83	7,76	17,09
<i>PRO</i>	74	0,42	0,09	0,22	0,62	21,15
<i>OH</i>	74	0,40	0,08	0,23	0,56	21,05
<i>POO</i>	74	0,67	0,14	0,39	0,99	21,00
<i>B</i>	19	0,62	0,14	0,37	0,90	22,39
<i>LC</i>	74	1,42	0,27	0,94	1,94	19,09
<i>PPEC</i>	73	1,60	0,31	1,10	2,28	19,14
<i>PPL</i>	54	3,06	0,56	2,08	4,40	18,20
<i>PA</i>	69	4,24	0,73	2,71	5,70	17,23
<i>LPF</i>	65	1,30	0,27	0,76	1,74	21,08
<i>AV</i>	10	0,63	0,14	0,44	0,99	22,26
<i>DVA</i>	51	1,19	0,25	0,71	1,82	20,71
<i>LPC</i>	63	1,23	0,27	0,70	1,71	21,81
<i>LCF</i>	70	1,38	0,25	0,76	1,78	18,41
<i>Hx</i>	74	1,17	0,23	0,71	1,64	19,65
<i>Hm</i>	74	0,57	0,11	0,34	0,77	19,35
<i>DDF</i>	41	1,25	0,21	0,85	1,71	17,13
<i>DVF</i>	21	1,09	0,17	0,79	1,31	15,43
<i>DAF</i>	33	0,93	0,18	0,45	1,33	19,67
<i>IO</i>	74	0,46	0,11	0,23	0,67	23,88
<i>PD</i>	74	2,77	0,53	1,81	3,73	19,15

#### Ciclo riproduttivo

##### Indice Gonadosomatico (GSI) ed Epatosomatico (HSI)

Fra i 77 analizzati al fine della determinazione dell'indice gonadosomatico ed epatosomatico, le femmine avevano lunghezze totali comprese tra 4,7 e 9,2 cm e pesi compresi tra 1,1 e 7,1 g e. Per quanto riguarda l'età, la maggior parte delle femmine (14 esemplari) apparteneva alla classe 1+, 10 esemplari appartenevano sia alla classe 4+ che 5+, 7 esemplari alla classe 2+ ed infine solo 4 alla classe 3+. I maschi presentavano lunghezze comprese tra 4,9 e 9,1 cm, pesi compresi tra 1,6 e 8,2 g. Anche in questo caso la classe più numerosa è la 1+ (10 esemplari), seguita dalle classi 4+ e 5+ (9 e 8 esemplari rispettivamente), mentre le classi meno numerose sono la 2+ (4 esemplari) e la 3+ (1 esemplare).

Nelle femmine l'indice GSI medio  $\pm$  deviazione standard raggiunge il massimo a maggio ( $14,15 \pm 2,80$ ), per poi diminuire nei mesi successivi ( $9,10 \pm 2,73$  giugno e  $3,71 \pm 1,19$  ad agosto) e raggiungere il minimo in ottobre ( $1,02 \pm 0,88$ ). I dati successivi indicano un recupero graduale (dicembre  $1,79 \pm 1,50$ , febbraio  $2,50 \pm 1,70$ , aprile  $6,67 \pm 2,78$ ). L'indice epatosomatico HSI mostra un valore minimo in giugno ( $0,25 \pm 0,19$ ), con un aumento costante nei mesi successivi (agosto  $0,49 \pm 0,12$ , ottobre  $0,99 \pm 0,39$ , dicembre  $1,28 \pm 0,76$ ), raggiungendo il valore massimo in febbraio ( $1,75 \pm 0,58$ ), quindi decrescenti (aprile  $0,61 \pm 0,47$ , maggio  $0,53 \pm 0,20$ ) (Figura

6). I maschi denunciano valori più elevati di GSI in agosto ( $1,95 \pm 0,35$ ), bruscamente in calo in ottobre ( $0,61 \pm 0,49$ ) e valori sostanzialmente simili nei mesi successivi (dicembre  $0,62 \pm 0,56$ , febbraio  $0,67 \pm 0,24$ ) seguiti da una ripresa costante ad aprile ( $1,15 \pm 0,75$ ), maggio ( $1,39 \pm 0,18$ ) e giugno ( $1,58 \pm 0,93$ ). L'indice HSI è, al contrario, ai livelli minimi da aprile (il minimo assoluto,  $0,05 \pm 0,02$ ) ad agosto (maggio  $0,57 \pm 0,29$ , giugno  $0,36 \pm 0,21$ , agosto  $0,13 \pm 0,07$ ). Successivamente viene registrato un notevole aumento dei valori (ottobre  $0,93 \pm 0,48$ , dicembre  $1,29 \pm 0,94$ , febbraio  $2,68 \pm 1,26$ ) (Figura 7).

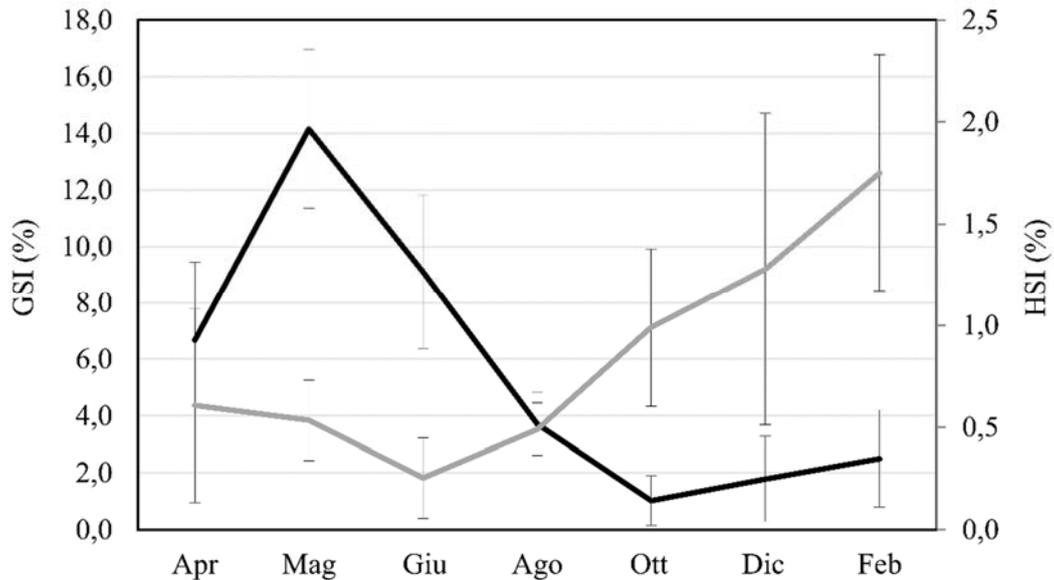


Figura 6. Valori medi  $\pm$  deviazione standard dell'indice gonadosomatico (GSI) e dell'indice epatosomatico (HSI) per gli esemplari di sesso femminile, Linea nera GSI, linea grigia HSI

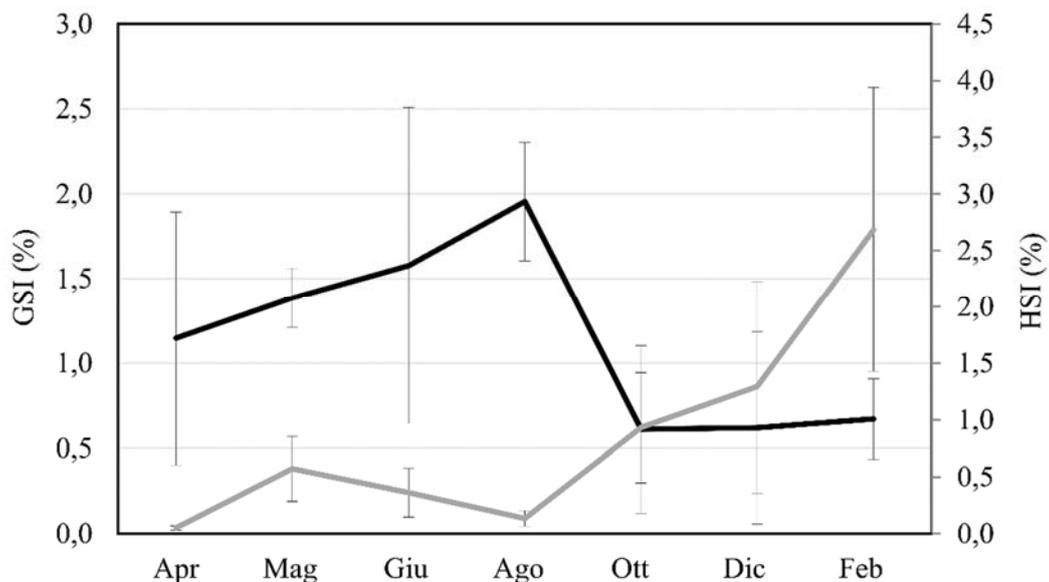


Figura 7. Valori medi  $\pm$  deviazione standard dell'indice gonadosomatico (GSI) e dell'indice epatosomatico (HSI) per gli esemplari di sesso maschile. Linea nera GSI, linea grigia HSI

Istologia delle gonadi

### Ovari

Complessivamente sono stati identificati i seguenti stadi di maturazione: stadio perinucleare precoce, stadio perinucleolare tardivo, stadio del vitello primario e secondario. Negli ovari gli ovociti possono essere frequentemente osservati in diversi stadi di maturazione e questo fatto, accanto all'andamento dell'indice gonadosomatico (GSI), indica che la specie depone le uova a più riprese durante il periodo riproduttivo.

In aprile gli ovociti in fase di maturazione più avanzata erano in fase di vitello primario, con un diametro medio  $\pm$  deviazione standard di  $417,73 \pm 23,44 \mu\text{m}$ . Il nucleo è centrale, con bordo irregolare e diversi nucleoli periferici. L'Ooplasma è riempito con vescicole vitelline metacromatiche, vescicole lipidiche e piccoli granuli di vitello periferico, insieme a globuli di vitello intensamente colorati, sottoposti ad allargamento. La zona radiata è ben sviluppata, le cellule della granulosa sono cubiche.

Ovociti più grandi sono stati osservati a maggio, con un diametro medio  $\pm$  deviazione standard di  $782,34 \pm 48,37 \mu\text{m}$ , ad uno stadio avanzato di vitello secondario, verso lo stadio di vitello terziario (Figura 8), corrispondente al valore massimo dell'indice GSI (Figura 6). In questa fase, il nucleo ( $120,61 \pm 1,50 \mu\text{m}$  di diametro medio) migra verso la membrana ooplasmatica, con bordi irregolari. I nucleoli, in numero decrescente, sono disposti centralmente e raggiungono il loro diametro massimo ( $25,86 \pm 9,98 \mu\text{m}$ ). Le vescicole vitelline (diametro medio  $13,51 \pm 6,32 \mu\text{m}$ ) sono adiacenti alla membrana ooplasmatica, insieme ai granuli di vitello (diametro medio  $9,12 \pm 4,89 \mu\text{m}$ ). Goccioline lipidiche e globuli vitellini principalmente sferoidali (diametro medio  $25,61 \pm 4,28 \mu\text{m}$ ), con contenuto omogeneo, riempiono la parte centrale dell'ooplasma, vicino alla membrana nucleare, mostrando i primi segni di aggregazione. I pori della zona radiata sono molto evidenti (Figura 9), mentre le cellule della granulosa mostrano una marcata vacuolizzazione intracitoplasmatica. La zona radiata raggiunge il suo massimo spessore, pari a circa 8-10  $\mu\text{m}$ .

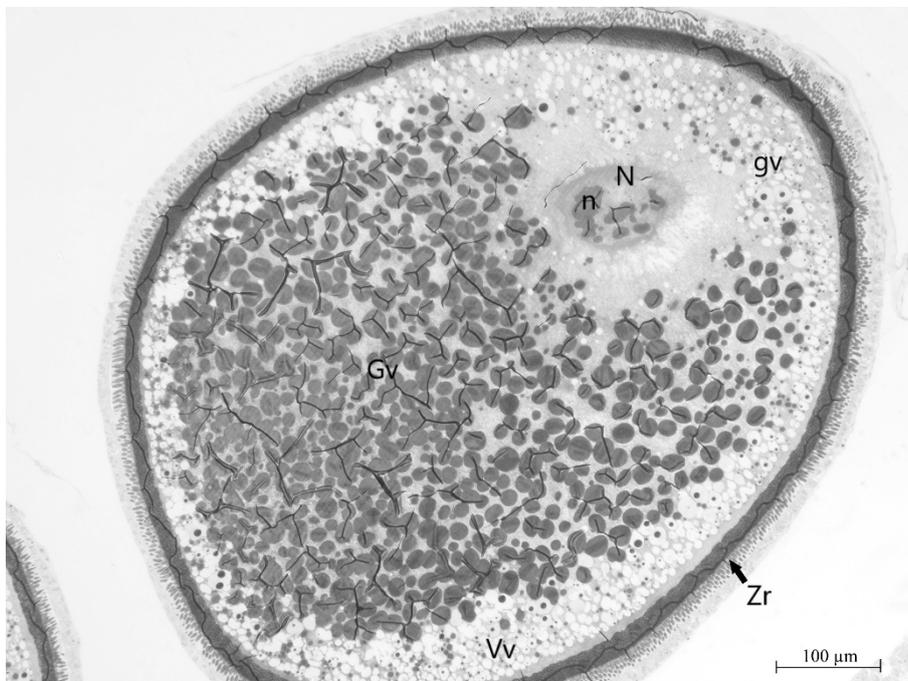


Figura 8. Maggio. Sezione semifine di ovario. Oocita allo stadio di vitello secondario-terziario. **Gv**, globuli vitellini; **gv**, granuli vitellini; **N**, nucleo; **n**, nucleoli; **Vv**, vescicole vitelline; **Zr**, Zona radiata

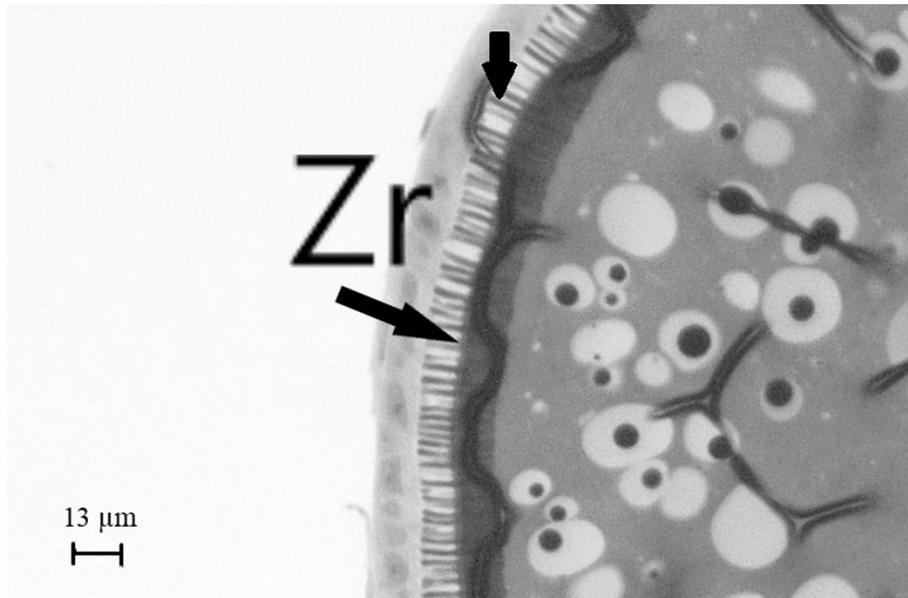


Figura 9. Particolare di un oocita a livello della Zona radiata. La freccia verticale indica uno dei pori

A giugno, nei nostri campioni, gli oociti più avanzati erano in stadio di vescicole vitelline tardivo - stadio di vitello primario, con un diametro medio di  $554,53 \pm 84,25 \mu\text{m}$ . Il nucleo è centrale (diametro medio  $119,64 \pm 22,62 \mu\text{m}$ ), irregolare con numerosi nucleoli periferici. Le vescicole vitelline metacromatiche sono disposte secondo un gradiente dimensionale centripeto. La zona radiata è ben sviluppata, con evidenti pori, le cellule della granulosa sono cubiche (Figura 10).

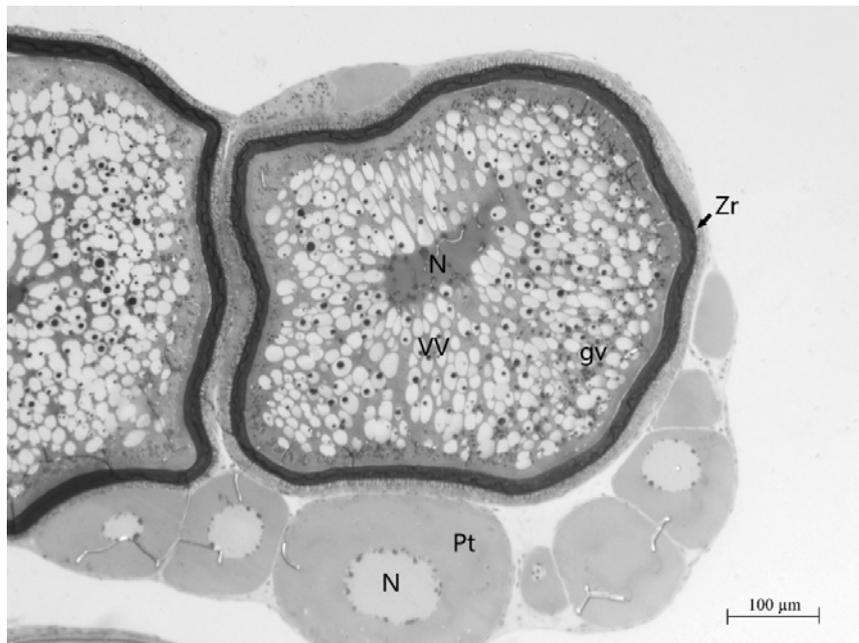
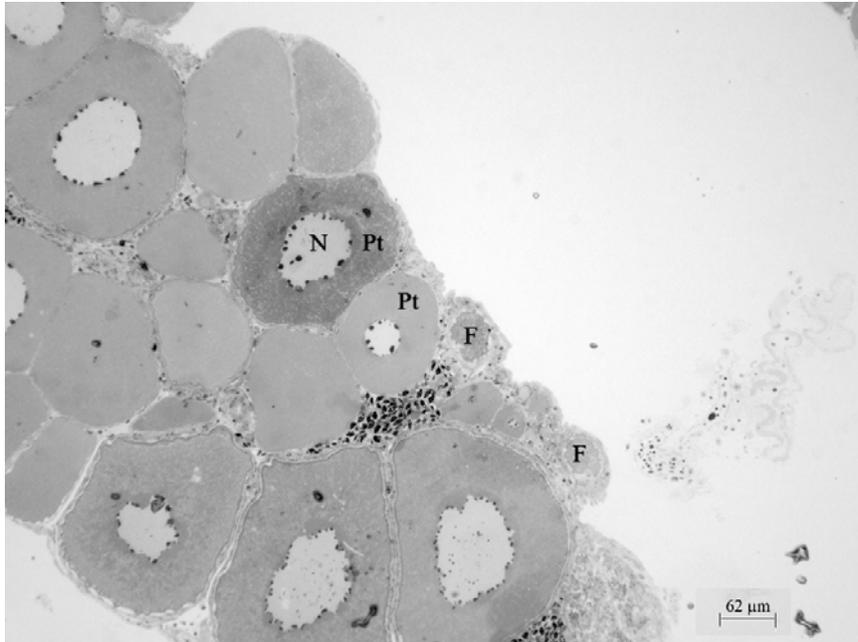
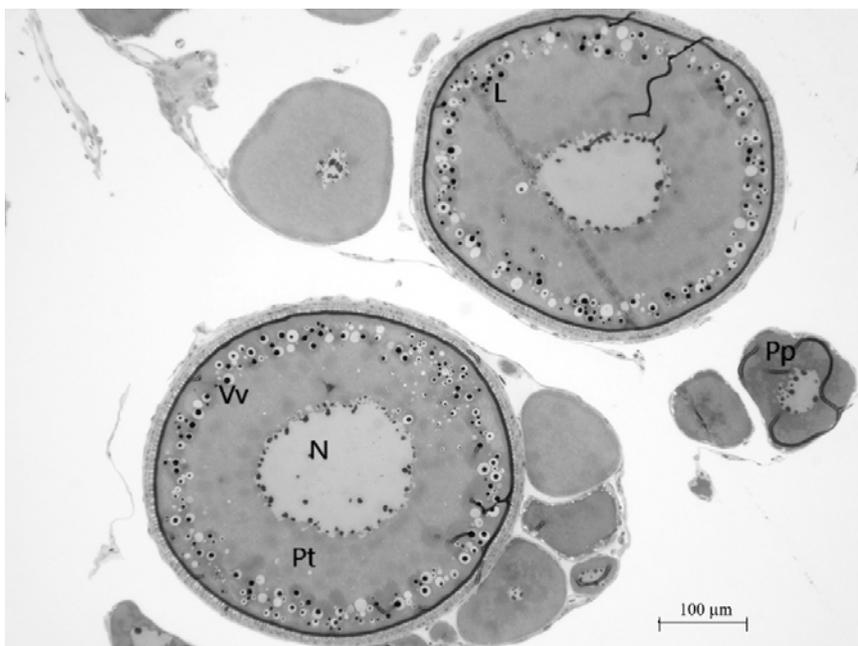


Figura 10. Giugno. Oociti allo stadio perinucleolare tardivo (Pt) e allo stadio di vescicole vitelline tardivo- di vitello primario. gv, granuli vitellini; N, nucleo; Pt, stadio perinucleolare tardivo; Vv, vescicole vitelline; Zr, zona radiata

In agosto gli ovociti hanno i valori medi minori di diametro,  $197,03 \pm 20,33 \mu\text{m}$ , probabilmente quando, dopo il periodo riproduttivo, in accordo con i dati di GSI, gli ovari si trovano nella fase di riposo sessuale. In questa fase sono stati osservati follicoli post-ovulatori e ovociti nella fase perinucleolare precoce (Figura 11).



*Figura 11. Agosto. Ovociti allo stadio perinucleolare tardivo (Pt), e follicoli postovulatori (F). N, nucleo*



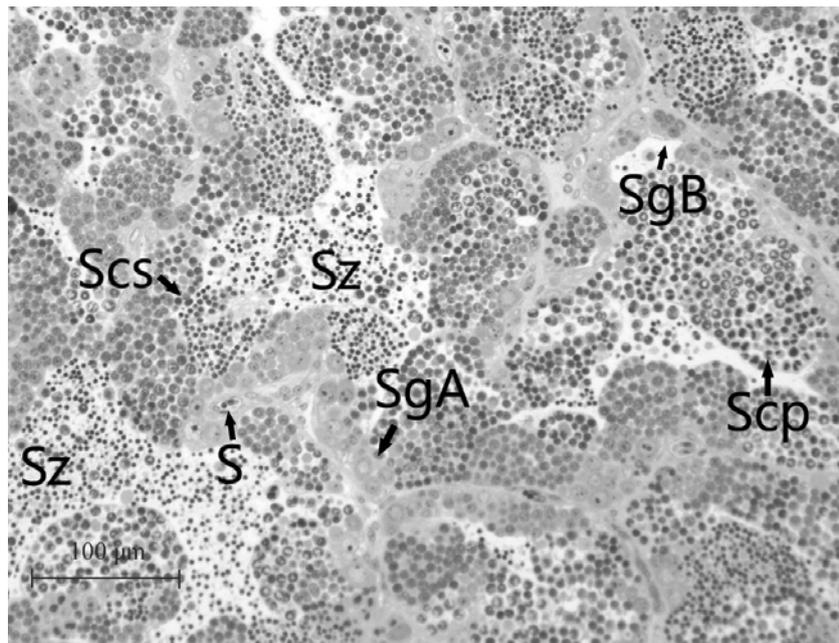
*Figura 12. Febbraio. Oociti allo stadio di vescicole vitelline. L, vescicole lipidiche; N, nucleo; Vv, vescicole vitelline*

Gli ovociti sono ovoidali (Figura 12), circondati da cellule follicolari piatte, con un nucleo centrale circolare (diametro medio  $85,89 \pm 16,80 \mu\text{m}$ ), con molti piccoli nucleoli ( $3,32 \pm 2,08 \mu\text{m}$ ) disposti disordinatamente nell'area marginale. La corona intermedia è formata da una sottile rete di vescicole debolmente colorate, la zona radiata non è distinguibile. Sono stati anche osservati alcuni ovociti in fase perinucleolare tardiva, con piccole vescicole lipidiche in formazione.

A febbraio gli ovociti erano nelle fasi perinucleolare tardiva (diametro medio:  $390,94 \pm 2,72$ ) e di vescicole vitelline (diametro medio  $514,78 \pm 76,18 \mu\text{m}$ ). In questi ultimi il nucleo è molto sviluppato (diametro medio  $148,92 \pm 0,41 \mu\text{m}$ ), con bordo irregolare, i nucleoli sono per lo più disposti nelle rientranze della membrana nucleare. Nei nostri campioni non sono mai stati osservati oociti idratati o atresici.

### *Testicoli*

I testicoli nella fase di maturazione più avanzata sono stati osservati a maggio (Figura 13). Nelle sezioni analizzate sono stati osservati spermatogoni A e B, cellule di Sertoli al limitare dei lobuli, spermatociti primari e secondari, spermatozoi liberi che, su un'area totale di  $58,485 \pm 22,199 \mu\text{m}^2$ , occupano  $16,342 \pm 4,486 \mu\text{m}^2$ , quindi dal 30 al 40% dell'area analizzata.



*Figura 13. Maggio. Sezione semifine di testicolo in sviluppo tardivo. Visibili cellule di Sertoli (S), spermatogoni A (SgA) e B (SgB), spermatociti primari (Scp) e secondari (ScS), nonché spermatozoi liberi (Sz)*

Nel mese di giugno sono stati osservati testicoli in post-riproduzione, in cui il lume lobulare è quasi completamente svuotato (Figura 14).

I campioni del mese di ottobre hanno stadi intermedi di maturazione, con spermatogoni con nuclei piuttosto grandi e spermatociti primari, mentre a dicembre, oltre agli spermatogoni, si osservano soprattutto spermatociti primari e cominciano a comparire anche spermatociti secondari.

Analogamente a quanto osservato negli ovari, anche l'emissione di spermatozoi sembra verificarsi più volte durante il periodo riproduttivo. Quindi è piuttosto frequente trovare campioni con testicoli a diversi stadi di maturazione (o durante il rilascio) e contemporaneamente esemplari con testicoli in riposo sessuale.

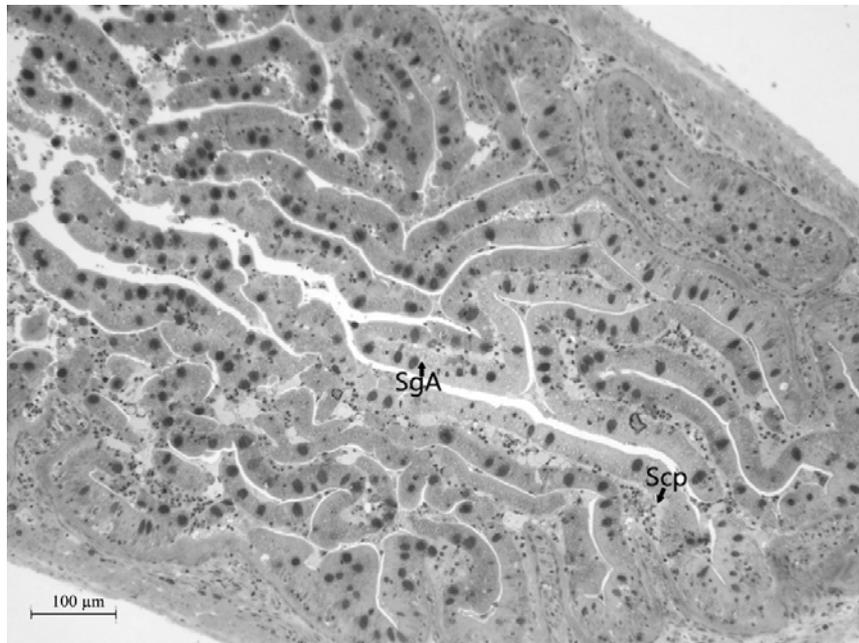


Figura 14. Giugno. Testicolo in post riproduzione. Osservabili spermatogoni A (SgA) e spermatociti primari (Scp)

Tutti gli esemplari oggetto di indagine istologica delle gonadi sono risultati sessualmente maturi ad indicare che, nell'area indagata, la maturità sessuale è raggiunta a conclusione del primo anno di vita entrambi i sessi.

### Discussione e Conclusioni

Il presente studio è stato condotto nel Torrente Reca, facente parte del Bacino del Fiume Isonzo, unica area del Friuli Venezia Giulia in cui *Gobio benacensis* registra una discreta presenza con una popolazione composta da esemplari di età compresa tra 0 e 5 anni. Si tratta di un corso d'acqua, caratterizzato da una comunità ittica prevalentemente Ciprinicola, inserito in un contesto interessato da agricoltura intensiva. Monitoraggi condotti da ARPA FVG, nel 2011 e 2014, hanno evidenziato che lo stato ecologico dell'ambiente subisce delle variazioni stagionali, verosimilmente indotte dalle attività agricole e, più in particolare, dalle viticolture presenti sia in territorio italiano che, più a monte, in quello sloveno. Durante l'anno lo stato ecologico passerebbe da situazioni tipiche di ambienti poco alterati a situazioni in cui sono percepibili fenomeni di inquinamento (<http://dati.arpa.fvg.it>).

La rilevazione di parametri chimico-fisici, nel corso del presente studio, ha infatti portato a registrare valori dei nutrienti che indicano chiaramente di una situazione distrofica, registrata nel corso di tutti i monitoraggi condotti tra maggio 2016 e marzo 2017.

Essendo il Torrente Reca l'unico sito in cui il gobione italico in Friuli Venezia Giulia è presente e poiché vi sono fattori ambientali che possono mettere in pericolo la sua sopravvivenza, è stato ritenuto interessante analizzare la biologia di questa specie anche al fine di fornire le informazioni necessarie all'adozione di piani volti alla sua conservazione. L'identificazione

sistematica della specie, in relazione alla sua travagliata attribuzione tassonomica (Gandolfi & Zerunian, 1987; Bianco & Taraborelli 1984; Zerunian, 2004; Bianco & Ketmaier, 2005; Kottelat & Freyhof, 2007; Bianco, 2009; Bianco & Delmastro, 2011; Takács, 2012; Bianco, 2014; Candiotta & Bo, 2016) ed alla presenza in Italia sempre più frequente della specie cogenerica europea, *Gobio gobio*, è stata condotta sia mediante analisi dei caratteri meristici che con indagini genetiche. I primi concordano con i valori riportati da Bianco & Ketmaier (2005) e Bianco (2009) per il gobione italico. Tali parametri concordano anche con quelli riportati da Pizzul *et al.*, (1993) per esemplari catturati nel bacino Ausa-Corno e nel Fiume Judrio in Friuli Venezia Giulia, ad eccezione del numero di scaglie presenti tra ano e l'origine della pinna anale. Le indagini genetiche hanno confermato l'appartenenza degli esemplari alla specie *G. benacensis* con una similarità del 100% solo con la sequenza di questa specie riportata nel database nucleotidico di Genebank.

Le curve di regressione lunghezza–peso, calcolate separatamente per i due sessi non hanno evidenziato differenze significative nel confronto tra i coefficienti (ANCOVA) e quindi le statistiche delle 22 variabili biometriche assunte sono state calcolate senza distinzione di sesso. Gli 86 esemplari catturati nel corso del primo campionamento (aprile 2016) appartenevano a 6 classi di età (0 – 5 anni), in accordo con Bontardelli *et al.* (2013) che riporta un'età massima variabile tra 5 e 7 anni.

Per quanto attiene al ciclo riproduttivo, poiché non sono disponibili dati sull'istologia delle gonadi di *G. benacensis*, è stato preso come riferimento il taxon più vicino a questa specie: *G. gobio*, analizzato da Kestemont (1987, 1989).

L'analisi istologica, condotta su esemplari di età pari e superiore ad 1 anno e risultati tutti sessualmente maturi, ha evidenziato che l'emissione di gameti femminili e maschili ha luogo più volte durante il periodo riproduttivo. Questo si estende, in accordo con Bianco (2009), Bontardelli *et al.*, (2013) e Albano *et al.*, (2014) tra aprile e giugno; tuttavia, nel presente studio è stato osservato uno sfasamento nei due sessi in quanto i maschi sono ancora sessualmente attivi nel mese di agosto, in cui i valori di GSI sono massimi (Figura 7), come osservato anche da Kestemont (1989) in *G. gobio*, in cui le fasi di maturazione attiva dei testicoli vanno da aprile ad agosto. Questo fatto potrebbe essere dovuto, nell'area indagata, a due possibili cause:

- 1) l'analisi è stata condotta su un numero molto limitato di esemplari (deliberatamente, per limitare il più possibile l'interferenza sulla popolazione);
- 2) i campioni maschili (anche grazie a un minore investimento energetico) tendono a mantenere nel tempo valori GSI più alti, anche in considerazione del tempo maggiore richiesto dai testicoli per ridurre la massa, mentre gli ovari post ovulatori la riducono velocemente;

La distribuzione dei valori di GSI per gli ovari differisce invece da quanto riportato da Mann (1980) e Kestemont (1987) in *G. gobio*, con valori massimi in maggio e giugno, mentre in *G. benacensis* i valori massimi sono stati osservati in aprile e maggio (Figura 6). Per quanto riguarda la relazione tra le caratteristiche chimico fisiche ambientali e il periodo riproduttivo, è stato osservato che i valori più alti di GSI si riscontrano nei mesi in cui la temperatura dell'acqua è superiore a 15 ° C, in accordo con Bourgeois (1964) e Kestemont (1987; 1989) per *G. gobio* nelle acque francesi e con Van Aerle *et al.* (2001) in Inghilterra.

## Bibliografia

Albano P.G., Ambrogio A., Bishop K., Bracchi G., Capostagno S., Carloni G., Cumani N., Fior E., Parolo G., Hamisia E., Luppi S., Maiorana F., Marchi A., Oradini A., Osculati L., Pizzetti L., Putzolu M., Raimondi B., Rigoni P., Rossi G., Rigamonti I., Serra M., Sotgia C., Spotorno C., Tugnoli E., Uggeri A., Zanni F., Zuffi G., Strazzari G. (2014). SIC ZPS

- IT4010018. Fiume Po da Rio Boriacco a Bosco Ospizio. Misure Specifiche di Conservazione. Provincia di Piacenza.
- Bianco P.G. (1995). Mediterranean endemic freshwater fishes of Italy. *Biological Conservation* 72, 159–170.
- Bianco P.G. (2009). Threatened fishes of the world: *Gobio benacensis* (Pollini, 1816). *Environmental Biological Fish* 84, 39–40.
- Bianco P.G. (2014). An update on the status of native and exotic freshwater fishes of Italy. *Journal of Applied Ichthyology* 30, 62–77.
- Bianco P.G., Delmastro G. B. (2011). Recenti novità tassonomiche riguardanti i pesci d'acqua dolce autoctoni in Italia e descrizione di una nova specie di luccio. *Researches on Wildlife Conservation. IGF Publications. USA* 2, 1–14.
- Bianco P.G., Ketmaier V. (2005). Will the Italian endemic gudgeon, *Gobio benacensis*, survive the interaction with the invasive introduced *Gobio gobio*? *Folia Zoologica* 54, 42–49.
- Bianco P.G., Ketmaier V. (2015). Nature and status of freshwater and estuarine fisheries in Italy and Western Balkans. *Freshwater Fisheries Ecology* 3, 283–291.
- Bianco P.G., Taraborelli T. (1984). *Gobio gobio benacensis* (Pollini, 1816) sottospecie valida per l'Italia (Pisces, Cyprinidae). *Bollettino Museo civico di Storia Naturale. Verona* 11, 525–536.
- Bontardelli L., Cielo P., Lazzarini M., Longoni V., Morera A., Pascale M. (2013). Le sorgenti del Bacchiglione. Pesci, anfibi e rettili. Provincia di Vicenza. Cooperativa Tipografica degli Operai di Vicenza, Vicenza.
- Bourgeois M. (1964). Le goujon. La peche et les poisons 229, 45.
- Candiotto A., Bo T. (2016). Inquadramento territoriale, fauna ittica e status ecologico/funzionale del Fiume Tanaro nel tratto insistente nei territori comunali di Barbaresco e Neive (CN). Piemonte, Cuneo.
- Collins T.J. (2007). ImageJ for microscopy. *Bio Techniques* 43, 25–30.
- Crivelli A.J. (2006). *Romanogobio benacensis*. In: IUCN 2010. The IUCN Red List of Threatened Species.
- Decreto Legislativo N. 152 del 3/04/2006. Norme in materia ambientale. *Gazzetta Ufficiale* N.88 del 14/04/2006, S.O. n.96.
- Decreto Legislativo N. 26 del 4/3/2014. Attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. *Gazzetta Ufficiale* N.61 del 4/3/2014.
- Decreto Ministeriale n°260 del 08/11/2010. Regolamento recante i criteri tecnici per la classificazione dello stato dei corpi idrici superficiali, per la modifica delle norme tecniche del Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n°152, recante “Norme in materia ambientale”.
- Direttiva 2010/63/EU Del Parlamento europeo e del Consiglio del 22 settembre 2010 sulla protezione degli animali utilizzati ai fini scientifici. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* 276/33.
- Ermak T.H., Eakin R.M. (1976). Fine structure of the cerebral and pygidial ocelli in *Chone ecaudata* (Polychaeta: Sabellidae). *Journal of Ultrastructure Research* 54, 243–260.
- Freyhof J., Brooks E. (2011). European Red List of Freshwater Fishes. Publications Office of the European Union, Luxembourg.
- Gandolfi G., Zerunian S. (1987). I pesci delle acque interne italiane: aggiornamento e considerazioni critiche sulla sistematica e la distribuzione. *Atti della Società italiana di Scienze naturali e del Museo civico di Storia naturale, Milano* 128, 3–56.
- IUCN (2011). IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.
- Kestemont P.P. (1987). Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. I. Variations saisonnières dans l'histologie de l'ovaire. *Journal of Applied Ichthyology* 3, 145–157.

- Kestemont P.P. (1989). Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 2 Variations saisonnières dans l'histologie des testicules. *Journal of Applied Ichthyology* 5, 111–121.
- Kottelat M., Freyhof J. (2007). Handbook of European freshwater fishes. Publications Kottelat, Cornol Switzerland and Freyhof, Berlin Germany.
- Kottelat M., Persat H. (2005). The genus *Gobio* in France, with redescription of *G. gobio* and description of two new species (Teleostei: Cyprinidae). *Cybium* 29, 211–234.
- Mann R.H.K. (1980). The growth and reproductive strategy of the gudgeon, *Gobio gobio* (L.), in two hard-water rivers in southern England. *Journal of Fish Biology* 17, 163–176.
- Peruzza L., Piazza F., Manfrin C., Bonzi L.C., Battistella S., Giulianini P.G. (2015). Reproductive plasticity of a *Procambarus clarkii* population living 10°C below its thermal optimum. *Aquatic Invasions* 10, 199–208.
- Pizzul E., Specchi M., Valli G. (1993). *Gobio gobio benacensis* (Pollini, 1816) (Osteichthyes, Cyprinidae) nelle acque del Friuli Venezia Giulia. *Atti del Museo Civico di Storia Nat. Trieste* 45, 163–168.
- Schneider C.A., Rasband W.S., Eliceiri K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9, 671–675.
- Seber G.A.F. (1973). The estimation of animal abundance and related parameters. Charles Griffin Company. London.
- Seber G.A.F., Le Cren E.D. (1967). Estimating population parameters from catches large relative to the population. *The Journal of Animal Ecology* 36, 631–643.
- Stoch F., Paradisi S., Danevich M. (1992). Carta Ittica del Friuli Venezia Giulia. Ente Tutela Pesca del Friuli Venezia Giulia. Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia:147–148.
- Szlachciak J., Zabkiewicz D. (2008). Morphological characteristics and variation of gudgeon. *Gobio gobio* (Actinopterygii: Cyprinidae). From the Odra River drainage. Poland. *Acta Ichthyologica et Piscatoria* 38, 9–19.
- Takács P. (2012). Morphometric differentiation of gudgeon species inhabiting the Carpathian Basin. Balaton Limnological Institute. Centre for Ecological Research of the Hungarian Academy of Sciences 48, 53–61.
- Tang K.L., Agnew M.K., Chen W., Hirt M.V., Raley M.E., Sado T., Schneider L.M., Yang L., Bart H.L., He S., Liu H., Miya M., Saitoh K., Simons A.M., Wood R.M., Mayden R.L. (2011). Phylogeny of the gudgeons (Teleostei: Cyprinidae: Gobioninae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61, 103–124.
- Topic Popovic N., Strunjak-Perovic I., Coz-Rakovac R., Barisic J., Jadan M., Persin Berakovic A., Saverborn Klobucar R. (2012). Tricaine methane-sulfonate (MS-222) application in fish anaesthesia. *Journal of Applied Ichthyology* 28, 553–564.
- Van Aerle R., Nolanusan M., Jobling S., Christiansen L.B., Sumpter J.P., Tyler C.R. (2001). Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom freshwaters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2841–2847.
- Ward R.D., Zemplak T.S., Innes B.H., Last P.R., Hebert P.D. (2005). DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 360, 1847–1857.
- Zerunian S. (2004). Pesci delle acque interne d'Italia. Quaderni di Conservazione della Natura n° 20. Ministero dell'Ambiente e Istituto Nazionale per la fauna selvatica. Roma.