

4.8 Échantillonnage associé à la maturité

La connaissance des schémas de reproduction des grands pélagiques ainsi que les caractéristiques de croissance et de mortalité définiront dans les grandes lignes la capacité de régénération que possède une population donnée. Ces informations sont par conséquent très importantes pour la gestion et la conservation, de même que la construction de modèles fiables le sera pour l'évaluation efficace des stocks.

En général, les grands pélagiques sont des géniteurs à ponte fractionnée, ce qui signifie qu'ils ont besoin de longues périodes de fécondité dans leur cycle vital pour assurer la reproduction. Ils y parviennent grâce à différents degrés de reproduction prolongée et en combinant une fécondité fréquente et des fécondités par fraction de ponte relativement élevées (Cayré et Farrugio, 1986 ; Schaefer, 2003). Cette caractéristique biologique accroît la complexité des études de maturité.

La principale approche pour évaluer les schémas de maturité des thonidés et des istiophoridés se fonde sur le prélèvement de gonades afin de réaliser un examen histologique détaillé au microscope. Si cette méthode est précise et fournit des informations précieuses, elle requiert cependant beaucoup de travail, est coûteuse et mortelle pour le poisson. Par ailleurs, il n'est pas toujours possible d'obtenir des échantillons de gonades car les thonidés sont parfois vendus entiers à la criée et les espadons sont éviscérés en mer. Ceci dit, des techniques chimiques visant à déterminer la maturité ont été récemment mises au point. Nous allons les aborder ci-contre.

4.8.1 Échantillonnage associé au sexe et à la maturité

Le lieu et l'heure de l'échantillonnage seront déterminés en fonction de l'objectif du programme. L'obtention d'échantillons tout au long de l'année permet de vérifier les schémas temporels de la maturité. Une couverture plus détaillée dans le temps peut permettre de confirmer l'existence de cycles journaliers dans la reproduction. Par exemple, des études ont indiqué que la reproduction pourrait être synchronisée de sorte à se produire à la tombée du jour chez certaines espèces. Une large couverture spatiale peut déterminer l'existence de lieux de ponte. Il faudra tenir compte de ces facteurs lorsqu'on réalisera des échantillonnages pour obtenir des données de maturité et des informations préalables afin d'orienter de façon appropriée les campagnes d'échantillonnage. La détermination du sexe et le prélèvement de gonades dépendent en général de la possibilité d'accéder à des carcasses qui n'auront pas été éviscérées. Il se peut que cet accès soit restreint lorsqu'il s'agit d'espèces ayant une grande valeur commerciale.

Les gonades peuvent être trouvées dans la partie ventrale du coelome interne. Chez le poisson sexuellement mature, les gonades mâles et femelles remplissent souvent tout l'espace disponible dans le coelome interne. Les ovaires ont d'habitude une forme tubulaire, une couleur rose/rouge et une texture granulaire, tandis que les testicules sont aplatis, blancs/gris et leurs bords ventraux ont souvent une forme ondulée. Chez les istiophoridés, les gonades mâles ont un aspect et une forme relativement irrégulière, avec de nombreux nodules sur la surface externe. Les coupes transversales des gonades mâles montrent une forme rectangulaire caractéristique et, lorsqu'elles sont sexuellement matures, présentent souvent de la laitance. Par contre, les gonades femelles ont un aspect externe plus régulier et la coupe transversale montre une forme ovale et parfois un lumen (orifice) au milieu. Le poids du poisson est un autre facteur permettant de déterminer le sexe d'un istiophoridé, sachant que les mâles de la plupart des espèces sont considérablement plus petits (en moyenne) que les femelles. Ainsi, les makaires bleus mâles dépassent rarement les 100 kg (220 livres), tandis que les femelles peuvent dépasser 400 kg (880 livres) et ont souvent un poids supérieur à 125 kg (275 livres). En théorie, il est peu probable de trouver un makaire bleu mâle ayant un poids manipulé de plus de 125 kg !

L'utilisation d'un plan d'échantillonnage stratifié par taille est appropriée pour estimer la taille par maturité et la fécondité. On peut utiliser des gammes de taille comparables aux distributions attendues de taille par âge ou des gammes plus petites. Il se peut qu'il soit nécessaire de modifier le plan d'échantillonnage pour des questions financières sachant qu'il faut échantillonner différentes saisons, zones et années. Il pourrait être nécessaire d'ajouter une stratification pour compenser le comportement des poissons, notamment la concentration des reproducteurs ou la migration génétique.

Les détails suivants doivent être consignés lors du prélèvement des échantillons (voir ci-dessous) :

Date, bateau, espèce, taille, poids, sexe, poids des gonades, poids du sous-échantillon de gonades, lieu de capture (latitude et longitude), type de banc de thonidés et d'association, et un numéro unique d'échantillon par poisson, un échantillon de ce poisson et la zone de la gonade échantillonnée.

Il faut définir des critères précis relatifs aux degrés de maturité pour estimer les proportions d'individus sexuellement matures. Cette question est abordée dans les sections suivantes.

4.8.2 Stades de maturité

L'examen visuel des ovaires pour déterminer le degré de maturité est considéré comme un indicateur imprécis de l'état de reproduction (West, 1990). On recommande par conséquent d'utiliser des méthodes histologiques et/ou chimiques. Les différents stades sont présentés dans le tableau suivant (**Tableau 4.8.1**).

Tableau 4.8.1. Stades de maturité lors de l'examen visuel des gonades des grands pélagiques.

Stade	Critères	
	Mâles	Femelles
I	Gonades en forme de petits rubans, impossible de déterminer le sexe à l'œil nu	Gonades en forme de petits rubans, impossible de déterminer le sexe à l'œil nu
1	Immatures ; testicules très fins, aplatis et en forme de ruban, mais détermination du sexe possible à l'œil nu	Immatures ; gonades allongées et minces, mais détermination du sexe possible à l'œil nu
2	Testicules gonflés, triangulaires dans la coupe transversale, pas de laitance dans le canal central	Maturité précoce ; gonades gonflées, mais pas d'ovule visible à l'œil nu
3	En maturation ; la laitance s'écoule si l'on presse ou pince les testicules	Maturité tardive ; gonades gonflées, ovules visibles à l'œil nu
4	Matures ; grands testicules, la laitance s'écoule facilement des testicules	Matures ; ovaires très gonflés, ovules translucides, sortant facilement des follicules ou libres dans la lumière de l'ovaire
5	Ayant frayé ; testicules flasques, injectés de sang, surface rouge foncé, peu ou pas de laitance dans le canal central	Ayant frayé ; comprend les poissons qui ont frayé et les poissons d'après-ponte, restes d'ovules matures à divers degrés de résorption et reste d'ovules matures de 1,0 mm de diamètre

4.8.3 Échantillonnage histologique et analyse

L'échantillonnage histologique est la méthode la plus utilisée pour évaluer le degré de maturité chez les espèces de grands pélagiques.

Il faut prélever, immédiatement après la capture du poisson, soit la gonade entière soit, si elle est trop grande, des sections de celle-ci (de 1 cm d'épaisseur) provenant de la région centrale de l'ovaire. On les fixera dans une solution de Bouin, formaline neutre à 10% ou formaline à 4% dans l'eau de mer, afin de les envoyer au laboratoire.

Les échantillons doivent être déshydratés dans des concentrations croissantes d'éthanol, rincés à l'histolemon et imprégnés dans de la paraffine. On peut ensuite prendre des sections (5-10 µm d'épaisseur) en utilisant un microtome. Des sections peuvent être colorées uniquement avec de l'hématoxyline-éosine (l'hématoxyline de Harris suivie d'une contre-colorant à l'éosine) ou complétées avec le trichrome de Mallory et la réaction acide périodique Shiff (Pas), avant l'examen au microscope. Il faut indiquer le grossissement (oculaire et objectif).

Pour les femelles, on recommande d'utiliser le schéma de classement des ovocytes développé par Hunter *et al.* (1986) (**Tableau 4.8.2**). Ce type de classification comprend à la fois la fréquence de ponte et la probabilité qu'une femelle continue de frayer (dans l'état atrétique de l'ovaire). Si l'on utilise d'autres schémas (ex Corriero *et al.* (2003) pour le thon rouge), il faudra en donner les références et détailler les interprétations des états immature et mature.

Tableau 4.8.2. Stades de maturité résultant de l'examen histologique des ovaires.

Stade	Maturité	État des ovocytes	Atrésie	Commentaires
1	Immature	Majorité des ovocytes à la fin du stade diplotène tardif ou au début du stade périnucléaire	Pas d'atrésie	Haute densité d'ovocytes de coloration foncée due à l'hématoxyline
2	Immature	Mélange d'ovocytes au début et à la fin du stade périnucléaire. Pas de granules vitellins.	Pas d'atrésie ou atrésie mineure des ovocytes sans vitellus	Premier stade de développement
3	Immature	Partiellement vitellins	Pas d'atrésie ou atrésie mineure des ovocytes sans vitellus	Granules ou globules vitellins rougeâtres visibles depuis la périphérie de la cellule jusqu'à ¼ de la zone périnucléaire
4	Mature	Peuvent être sans vitellus ou partiellement vitellins	Atrésie évidente d'ovocytes tout à fait vitellins	On estime qu'ils ont atteint un stade tout à fait vitellin et de reproducteur en puissance, mais qu'ils sont retournés à un stade d'inactivité reproductive
5	Mature	Ovocytes tout à fait vitellins, mais pas de follicules post-ovulatoires observés	Atrésie nulle ou de moins de 50% des ovocytes tout à fait vitellins	Poisson mature, potentiellement reproducteur
6	Mature	Ovocytes tout à fait vitellins. Ils peuvent se trouver au stade du noyau migrateur ou être hydratés et/ou présenter des follicules post-ovulatoires	Atrésie de moins de 50% des ovocytes tout à fait vitellins, généralement atrésie nulle ou mineure	Poisson reproducteur nageant de façon active avec une atrésie nulle ou mineure
7	Mature	Ovocytes tout à fait vitellins. Ils peuvent se trouver au stade du noyau migrateur ou être hydratés et/ou présenter des follicules post-ovulatoires	Atrésie d'au moins 50% des ovocytes tout à fait vitellins	Poisson reproducteur nageant de façon active avec une atrésie significative
8	Mature	Certains ovocytes tout à fait vitellins, mais aucun au stade de noyau migrateur ou d'hydratation. Pas de POF observé.	Atrésie d'au moins 50% des ovocytes tout à fait vitellins	Poisson potentiellement reproducteur avec une atrésie significative
9	Mature	Pas d'ovocytes tout à fait vitellins, mais l'atrésie d'ovocytes tout à fait vitellins est évidente	Atrésie de 100% des ovocytes tout à fait vitellins	Poisson mature dans une phase de non-reproduction
10	Mature	Pas d'ovocytes tout à fait vitellins. Les ovocytes semblent être au stade 1 ou 2.	Atrésie avancée des ovocytes	Poisson mature dans une phase atrétique de post-reproduction avancée

Ce schéma de classification peut être simplifié en un système de classification de maturité (**Tableau 4.8.3**).

Tableau 4.8.3. Système de classification de maturité fondé sur Hunter *et al.* (1986).

Catégorie	Stade	Présence d'ovocytes tout à fait vitellins	POF présent	Commentaires
Immature	1, 2, 3	Non	Non	Les ovocytes n'ont jamais atteint le stade tout à fait vitellin
Mature	4 à 10	Oui pour stades 5-8	Oui pour St. 6, 7	Ils ont développé des ovocytes tout à fait vitellins
Reproducteur actif	5, 6, 7	Oui	Oui pour St. 6, 7	Présence d'ovocytes tout à fait vitellins
En reproduction	6, 7, 5*	Oui	Oui pour St. 6, 7. Non pour St. 5	Évidence histologique d'un frai récent ou imminent
Reproducteur inactif/ atrétique/post-reproduction	4, 8, 9, 10	Oui pour le stade 8	Non	Ils avaient développé des ovocytes tout à fait vitellins, mais sont retournés au stade d'inactivité partielle ou totale

* Un poisson n'est considéré en reproduction que si l'on observe des ovocytes dans des noyaux migrateurs ou en état d'hydratation.

Le diamètre d'un certain nombre d'ovocytes (par ex. 350-400 par section) doit être mesuré en microns pour obtenir les distributions de fréquence des étapes sélectionnées du développement des ovocytes.

On peut déterminer le moment et le lieu de frai à partir de spécimens ayant des ovocytes hydratés dans les ovaires, ce qui indique une ponte imminente.

En ce qui concerne les mâles, Abascal *et al.* (2004) et Schaefer (1996) ont développé tous les deux des clefs associées au développement des testicules dans différentes espèces de thonidés. La clef de Schaefer sert de guide pour analyser la situation de reproduction des mâles, tandis que les descriptions d'Abascal *et al.* décrivent les stades microstructuraux et histologiques que peuvent présenter les testicules des thonidés.

La classification de Schaefer (**Tableau 4.8.4**), développée pour *T. albacares* dans l'océan Pacifique oriental, se fonde sur la taille du canal déférent, sur l'épaisseur du tissu myoïde entourant le canal, sur la quantité de spermatozoïdes contenus à l'intérieur du canal, sur le degré de torsion que présente le canal, sur le fait que le tissu adjacent au canal est ou non très nucléé et sur les caractéristiques de coloration du tissu adjacent au canal (avec la coloration l'hématoxyline-éosine).

Tableau 4.8.4. Stades de développement fondés sur l'examen microscopique des testicules.

Stade	Contenus et structure du canal déférent	Coloration épithéliale du canal déférent
Pré-reproduction	Sans sperme, très enroulé	Coloration foncée
En frai ou ayant frayé récemment	Rempli de sperme, canal ouvert arrondi aux bords	Pas de coloration foncée apparente

La preuve d'un frai récent chez un mâle de *T. albacares* du Pacifique oriental n'a été constatée qu'environ 12 heures après la reproduction. L'échantillonnage doit par conséquent tenir compte du facteur temporel.

Abascal *et al.* (2004) a observé l'existence de deux zones distinctes dans la section transversale des testicules de *T. thynnus*. Dans la zone extérieure, les lobules séminifères possèdent une fine paroi formée par l'épithélium germinatif dans lequel se développent les cellules germinales en association avec les cellules de Sertoli. Les lumens des lobules sont remplis de spermatozoïdes qui ont été libérés à la fin du processus de spermiogenèse. L'émission de sperme mature depuis les spermatocytes dans les lumens des lobules provoque la discontinuité de l'épithélium germinal. Dans la zone centrale du testicule, les lobules testiculaires perdent l'épithélium germinal et deviennent des canaux dans lesquels les lobules n'ont plus la fonction de produire, mais de stocker le sperme. On ne trouve dans cette zone que des spermatozoïdes matures qui remplissent les lumens enflés des lobules. Les différents stades des gamètes sont indiqués dans le **Tableau 4.8.5**.

Tableau 4.8.5. Stades de développement des spermatozoïdes d'après un examen histologique et moléculaire de type SEM.

Stade	Description	Position
Spermatogonies primaires	Grandes cellules ovoïdes, noyau à chromatine diffuse et un seul nucléole central. Nombre élevé de corps chromatides dans le cytoplasme.	Distribuées le long de l'épithélium germinal
Spermatogonies	Résultat de mitoses successives de spermatogonies primaires. Formation en petits groupes. Le noyau contient de la chromatine clairsemée.	
Spermatocytes de premier ordre	Groupes, avec des cellules reliées par des ponts cytoplasmiques. Noyau hétérochromatique. Le cytoplasme contient des ribosomes libres.	
Spermatocytes de deuxième ordre	Rarement trouvés dans des échantillons histologiques. Le cytoplasme est réduit, le noyau présente une chromatine diffuse formant des groupes relativement opaques aux électrons	
Spermatides et spermatozoïdes	Formation en groupes, la tête face aux parois des lobules et faisceaux de flagelles dirigés vers le lumen du lobule séminifère. Les jeunes spermatides ont un noyau sphérique à chromatine dense. La chromatine devient plus homogène chez les spermatides moyens. La chromatine se condense en une forme granulaire épaisse chez les spermatides âgés. Le noyau prend également une forme ovoïde et constitue une encoche basale sur le segment proximal de l'axonème. Le flagelle s'allonge, la masse cytoplasmique se réduit et les mitochondries confluent autour de la partie proximale de l'axonème. Le flagelle reste parallèle à la base du noyau dans le spermatozoïde.	Restent dans les spermatocytes

4.8.4 Méthodes chimiques

Dans de nombreuses pêcheries, les poissons sont déchargés déjà éviscérés et, si ce n'est pas le cas, la valeur de leur chair empêche d'ouvrir leur ventre pour déterminer leur sexe et leur maturation sexuelle. L'identification externe est une tâche difficile du fait de l'absence de dimorphismes sexuels. Dans ce cas, les méthodes endocrinologiques moléculaires permettent d'identifier le sexe et le stade de maturation à partir d'échantillons sanguins et de tissus. La maturité par taille peut être estimée en collectant des échantillons de muscles sur une vaste gamme d'individus de chacune des unités de gestion.

On peut prélever des échantillons de sang et de muscle pour réaliser des analyses chimiques d'hormones de reproduction. Il va de soi que les échantillons provenant d'individus matures présentent un grand intérêt. On a développé une biopsie à l'emporte-pièce (Bridges *et al.*, 2000) qui permet de prélever des échantillons d'environ 100 à 150 g de muscle sans causer de dommages apparents au poisson. Les échantillons de sang et de muscle doivent être congelés après l'extraction.

Le sang doit être centrifugé pour obtenir le plasma (par ex. 5 000 g pendant 15 minutes). Les échantillons de plasma ainsi obtenus peuvent être directement analysés. Les échantillons de muscle doivent être homogénéisés et il faut extraire les stéroïdes avec du dichlorométhane avant d'effectuer les mesures.

On peut faire une évaluation en utilisant les méthodes standard ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) pour les hormones sexuelles (ex. 17 β -estradiol (E₂), 17 α -20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17,20 β P), 11-ketotestostérone (11-KT)) et la lipoprotéine vitellogénine (Vtg), qui est synthétisée sous l'action de E₂.

En général, les changements observés dans les hormones stéroïdes et dans la vitellogénine peuvent être mis en corrélation avec l'indice gonadosomatique (GSI) et avec le diamètre des ovocytes. La 17,20 β -P peut servir à déterminer le type d'émission de sperme et des ovules. La relation entre la testostérone et la 11-KT peut être utilisée pour identifier le sexe, tandis qu'on peut prendre plusieurs portions de stéroïdes sexuelles pour définir la maturité et le sexe d'un poisson donné (par ex. présence/absence d'estradiol, vitellogénine).

Il faut signaler que si les stéroïdes restent stables pendant plusieurs semaines à une température ambiante, les échantillons de vitellogénine doivent être stockés à basse température.

4.8.5 Estimation des caractéristiques associées à la maturité

La procédure statistique visant à obtenir un schéma de maturité implique d'ajuster un modèle prédictif de régression non-linéaire correctement pondéré directement aux données de maturité. Le modèle peut être ensuite utilisé pour prédire des proportions de poissons sexuellement matures à des tailles et/ou âges spécifiques. On peut également utiliser ces données pour faire des évaluations statistiques de la variation spatiale et temporelle dans les fonctions de maturité. La maturité par âge peut être estimée à l'aide d'une courbe logistique de la façon suivante :

$$\%mature = \frac{100}{1 + e^{-a(\text{taille}+b)}}$$

ou de façon linéaire :

$$\ln\left[\frac{p}{1-p}\right] = \alpha + \beta * \text{taille}$$

où p est la probabilité qu'un thonidé soit mature, α et β sont les paramètres de régression du modèle, et la taille est la taille du poisson. Il faut calculer des intervalles de confiance de 95%. Si l'on n'a pas utilisé d'échantillonnage stratifié par taille, l'ajustement du modèle doit être pondéré par le nombre d'échantillons dans chaque classe de taille afin de s'assurer que les tailles limitées situées aux extrémités de la gamme de taille échantillonnée n'auront pas une répercussion excessive sur l'ajustement du modèle.

Pour les espèces d'istiophoridés, on peut calculer l'indice gonadique (IG). C'est le rapport entre le poids de l'ovaire (O_w) et la taille. On utilise d'habitude la longueur maxillaire inférieur-fourche (LJFL). L'IG est alors :

$$GI_{LJFL} = \frac{O_w}{LJFL^3} * 10^4$$

Au-delà d'une valeur critique de l'IG, propre à chaque espèce, il est admis que l'individu étudié est en état de maturité sexuelle (Albaret, 1977 ; Cayré et Laloé, 1986). Chez l'espadon, un IG supérieur ou égal à 2,09 est une indication *a priori* de femelles en phase de reproduction active (García Cortés et Mejuto, 2003). Dans la mesure du possible, il faudra calculer des intervalles de confiance de 95% pour l'IG.

L'indice gonadosomatique (IGS) est le rapport entre le poids des gonades et le poids du corps. Il peut indiquer l'état de maturation :

$$GSI = \frac{W_G}{W} * 100$$

où W_G est le poids des gonades et W est le poids de l'individu sans gonades. Si un indice gonadosomatique est calibré, par exemple à travers l'histologie, il pourra être utilisé pour déterminer les distributions spatio-temporelles de la reproduction. Ceci dit, il ne sera pas assez précis pour obtenir une classification de la maturité ou de l'activité reproductive. Cet aspect requiert l'analyse de données histologiques détaillées.

L'estimation de la fécondité annuelle chez les thonidés requiert le calcul d'estimations des fréquences de ponte par classe de taille et des estimations correspondantes des fécondités par acte de ponte dans toute la gamme de taille des femelles matures. Il est nécessaire de connaître l'aspect et la longévité des follicules post-ovulatoires dans les ovaires après la ponte pour estimer la fréquence de celle-ci. La fréquence à laquelle les ovaires des femelles matures contiennent des follicules post-ovulatoires peut être ensuite utilisée pour estimer la fréquence de ponte. Les femelles de grande taille semblent capables de maintenir une fréquence de ponte plus élevée.

Ce n'est que dans les stades finaux de la maturation des ovocytes, qui commence par la phase de migration du noyau et est suivie par la phase d'hydratation, qu'on observe une discordance dans la distribution des ovocytes d'où l'on peut extraire des estimations de la fécondité par acte de ponte. Celle-ci ne doit être estimée qu'à partir d'ovaires se trouvant à l'état hydraté, mais pré-ovulatoire. Toute perte d'ovocytes fausserait les estimations de fécondité. Sachant que de nombreux thonidés sont des géniteurs avec des pontes séquentielles (par ex. Corriero *et al.*, 2003), les estimations de la fécondité fondées sur des ovaires non-hydratés peuvent surestimer de façon considérable la fécondité par acte de ponte étant donné qu'il n'est pas possible de distinguer des épisodes successifs de ponte avant le début de l'hydratation. La fécondité par acte de ponte doit être déterminée en utilisant la méthode gravimétrique qui compte le nombre d'ovocytes hydratés présents dans un sous-échantillon pondéré du tissu ovarien (O_w). On prélèvera à cet effet des sections de lamelles ovigères de la région antérieure, moyenne et postérieure de l'ovaire. Chacun de ces échantillons doit être disposé sur une lame pour microscope (l'échelle longitudinale de la lame peut faciliter le comptage), saturé avec une solution de glycérine et recouvert d'une lame. On comptera trois fois le nombre d'ovocytes hydratés présents dans chaque échantillon et on prendra la moyenne numérique des ovocytes hydratés pour calculer la fécondité par acte de ponte :

$$B_f = H_e * O_w$$

où B_f est la fécondité par acte de ponte, H_e est le nombre d'ovocytes hydratés par unité de poids dans l'échantillon de tissu et O_w est le poids de l'ovaire. On peut ensuite calculer la moyenne des estimations des sections antérieure, moyenne et postérieure de l'ovaire afin d'obtenir une estimation représentative de tout l'échantillon. Il faut prendre un nombre élevé d'échantillons et d'individus afin d'obtenir une mesure de la variabilité dans les estimations de la fécondité par acte de ponte.

La fécondité par acte de ponte est généralement décrite par une fonction de puissance de la forme suivante :

$$B_f = cL^b$$

où L est la taille du poisson, et c et b sont des paramètres estimés. La fécondité par acte de ponte par poids est généralement décrite par un rapport linéaire sous la forme suivante :

$$B_f = aW + b$$

où W est le poids du poisson.

La fécondité annuelle peut être estimée à partir des estimations de la fécondité par acte de ponte (nombre d'ovocytes libérés par ponte) et de la fréquence de ponte.

4.8.6 Bibliographie

- ALBARET, J.J. (1977). La reproduction de l'albacore (*Thunnus albacares*) dans le Golfe de Guinée. Cah. ORSTOM, Sér. Océanogr. 15(4): 389-419.
- ABASCAL, F.J., C. Megina and A. Medina (2004). Testicular development in migrant and spawning bluefin tuna (*Thunnus thynnus* (L.)) from the eastern Atlantic and Mediterranean. Fish. Bull. 102, 407-417.
- AROCHA, F. (2002). Oocyte development and maturity classification of swordfish from the north-western Atlantic. J. Fish Biol. 60, 13-27.
- BRIDGES, C.R., P. Schröder, V. Susca, A. Corriero, M. Deflorio, G. De Metrio (2001). A new muscle biopsy technique for sex and sexual maturity determination in large pelagic fisheries. Col. Vol. Sci. Pap. ICCAT, 52(2): 752-758.
- CAYRÉ, P. and H. Farrugio (1986). Biologie de la reproduction du listao (*Katsuwonus pelamis*) de l'océan Atlantique. In: Symons, P.E.K., P.M. Miyake, G.T. Sakagawa (eds.), Proc. ICCAT Conference on the International Skipjack Year Program, Madrid, pp. 252-272.
- CAYRÉ, P. and F. Laloé (1986). Review of the gonad index (GI) and an introduction to the concept of its "critical value": Application to the skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, in the Atlantic Ocean. Marine Biology 90:345-351.
- CORRIERO, A., S. Desantis, M. Deflorio, F. Acone, C.R. Bridges, J.M. De la Serna, P. Megalofonou and G. De Metrio (2003). Histological investigation on the ovarian cycle of the bluefin tuna in the western and central Mediterranean. J. Fish Biol. 63(1), 108-119.
- GARCÍA-CORTÉS, B. and J. Mejuto (2003). Sex ratio patterns and gonadal indices of the swordfish (*Xiphias gladius*) caught by the Spanish surface longline fleet in the Indian Ocean. IOTC Proceedings no 6, 287-299.
- HUNTER, J.R., B. Macewicz and J.R. Sibert (1986). The spawning frequency of skipjack tuna, *Katsuwonus pelamis*, from the South Pacific. Fish. Bull. 84, 895-903.
- SCHAEFER, K.M. (1996). Spawning time, frequency, and batch fecundity of yellowfin tuna, *Thunnus albacares*, near Clipperton Atoll in the eastern Pacific Ocean. Fish. Bull., 94, 98-112.
- SCHAEFER, K.M. (2003). Estimation of the maturity and fecundity of tunas. Report of the working group on modern approaches to assess maturity and fecundity of warm- and cold-water fish and squids. Fisker og Havet 12, 117-124.
- SUSCA, V., A. Corriero, C.R. Bridges and D. De Metrio (2001). Study of the sexual maturity of female bluefin tuna: purification and partial characterisation of vitellogenin and its use in an enzyme-linked immunosorbent assay. J. Fish Biol. 58, 815-831.
- WEST, G. (1990). Methods of assessing ovarian development in fishes: a review. Aus. J. Mar. Freshwater Res. 41, 199-222.