



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Medicina Veterinaria

Corso di laurea specialistica a ciclo unico in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

**ANALISI ISTOPATOLOGICA E BIOMOLECOLARE
DELLA WINTER DISEASE in SPARUS AURATA**

Relatore: Ch.mo Prof. Tomaso Patarnello

Correlatore: Ch.mo Prof. Luca Bargelloni

Laureando: Niccolò Vendramin

Anno accademico: 2008-2009

*“ you can't always get what you want
but if you try sometimes you might find
you get what you need...”*

Rolling Stones 1969

INDICE

1 Abstract	Pag. VII
2 Introduzione	Pag. 1
3 <i>Sparus aurata</i>	Pag. 3
3.1 Classificazione scientifica	Pag. 3
3.2 Caratteristiche biologiche	Pag. 4
3.3 Excursus storico	Pag. 5
3.4 Biologia ed habitat	Pag. 6
3.5 Comportamento	Pag. 6
4 CICLI PRODUTTIVI	Pag. 7
4.1 Ciclo produttivo	Pag. 7
4.2 Sistemi produttivi	Pag. 9
4.2.1 Sistemi di allevamento	Pag. 9
4.2.1.1 Allevamento estensivo	Pag. 9
4.2.1.2 Allevamento semi-estensivo	Pag. 10
4.2.1.3 Allevamento intensivo	Pag. 10
4.3 La vallicoltura	Pag. 14
4.3.1 Caratteristiche generali e metodi di funzionamento	Pag. 14
4.3.2 La vallicoltura da metodo tradizionale estensivo a semi-intensivo	Pag. 17
4.3.3 L'orata in vallicoltura	Pag. 21
4.3.4 Cenni storici	Pag. 22
4.4 Malattie e misure di controllo: loro diffusione e tendenza.	Pag. 24
5 MATERIALI e METODI	Pag. 29
5.1 Protocollo del campionamento	Pag. 30
5.2 Campioni	Pag. 31
5.2.1 Microarray technology	Pag. 31
5.2.2 Real Time RT-PCR	Pag. 32
5.2.3 Istopatologia	Pag. 33
5.3 Estrazione RNA	Pag. 36
5.3.1 Valutazione qualitativa dell'RNA estratto	Pag. 36
5.3.2 Valutazione quantitativa dell'RNA estratto	Pag. 36
5.3.3 Allestimento dei pool	Pag. 37

5.4 Microarray Technology	Pag. 37
5.5 Analisi bioinformatica	Pag. 39
5.6 Real Time RT- PCR	Pag. 40
5.6.1 Retrotrascrizione	Pag. 40
5.6.2 Real Time RT PCR	Pag. 40
5.6.3 Lo strumento	Pag. 41
5.6.4 Curva standard	Pag. 42
5.6.5 Quantificazione relativa	Pag. 43
5.6.6 Chimica di rivelazione	Pag. 44
5.6.7 Curva di Melting	Pag. 55
5.6.8 Analisi statistica	Pag. 47
5.6.9 Geni analizzati in Real Time RT-PCR	Pag. 47
5.7 Caratterizzazione istologica del campione	Pag. 49
6.RISULTATI	Pag. 50
6.1 Estrazione RNA	Pag. 50
6.2 Quantificazione al NanoDrop®.	Pag. 50
6.3 MicroArray Technology	Pag. 51
6.3.1 Liste dei geni differenzialmente espressi	Pag. 52
6.3.2 Gene Ontology e SwissProt per i geni analizzati con Real-Time RT-PCR	Pag. 55
6.4 Real Time RT- PCR	Pag. 56
6.4.1 Curva standard	Pag. 56
6.4.2 Amplification plot	Pag. 57
6.4.3 Analisi della curva di melting	Pag. 57
6.4.4 Istogrammi di quantificazione relativa	Pag. 58
6.4.5 Analisi dei dati di Real-Time RT-PCR	Pag. 60
6.4.6 Analisi statistica	Pag. 61
6.5 Analisi Istologica	Pag. 62
6.5.1 Analisi statistica dei dati	Pag. 65
6.6 Risultati esami istopatologici dei campioni prelevati a T8	Pag. 67
7.DISCUSSIONE	Pag. 72
7.1 Microarray technology	Pag. 72
7.2 Real Time RT-PCR	Pag. 75

7.3 Analisi istologica	Pag. 76
8.CONCLUSIONI	Pag. 77
9.BIBLIOGRAFIA	Pag. 78
10. Ringraziamenti	Pag. 83

1.ABSTRACT

Gilthead sea bream *Sparus aurata* is one of the most important fish reared in coastal lagoon with "valliculture" in the Mediterranean area. During cold periods it is affected by a metabolic syndrome termed "Winter disease" which causes a mortality rate reaching, in some cases, 60% in the North of Italy .

An experiment was conducted to analyse the adaptive response to low temperatures using three kinds of analysis techniques. This experimental trial was based on a case-control scheme. Seabreams were divided into two main groups: seabreams in the "case" tank were exposed to low temperature, whereas for those in the "control" tank temperature was constantly warm. Tissue samplings were carried out through acute and chronic phase.

A first analysis with Microarray technology was performed to reveal the differences of gene expression between fish reared at low temperature and controls. Secondly was performed Real-Time RT-PCR to validate Microarray results and evaluate the differences of gene expression during the experiment. Lastly were evaluated histological analysis of the skin and the cephalic kidney samples during the experimental protocol, and other tissues such as gill, liver, spleen and kidney were collected and analysed after a recovery phase at the end of the experiment.

Biomolecular analysis demonstrates that there is an up-regulation of genes belonging to pathways such as energetic metabolism and lipid metabolism in liver and a down-regulation of genes belonging to immunity response. In gills up-regulated genes belong to very different pathways involved in apoptosis, ROS scavenger and lipidic metabolism, moreover down-regulated genes belong to the immunity response pathway. Histopathological analysis demonstrate a different distribution of melanomacrophage centres in cephalic kidney and a greater severity of lesions affecting fish exposed to low temperature.

It is the first time that cold response was analysed with both biomolecular and histological techniques in *Sparus aurata* to understand the aetiopathogenesis of Winter Stress Syndrome.

2.INTRODUZIONE

I sistemi tradizionali di acquacoltura estensiva e semi-intensiva diffusi lungo le coste dell'Europa meridionale sono oggi minacciati da due tipi di problemi: da un lato l'aumento della competizione per l'utilizzo della fascia costiera e, dall'altro, l'immissione sul mercato di prodotti a basso prezzo da parte dell'acquacoltura intensiva. La valenza dell'acquacoltura estensiva e semi-intensiva, legata alla protezione e riqualificazione ambientale di aree di particolare interesse ecologico, opportunità di impiego e sviluppo in zone rurali e costiere, è stata ampiamente riconosciuta dall'Unione Europea. La principale finalità del progetto SEACASE è quella di sviluppare degli strumenti efficaci per promuovere la competitività, produttività e dunque la sostenibilità dell'acquacoltura estensiva e semi-intensiva attraverso la riduzione dell'impatto ambientale e migliorando la qualità e l'immagine presso il pubblico dei suoi prodotti.

Una delle patologie che affligge pesantemente la produzione dell'orata in vallicoltura è rappresentata dalla *Winter Disease*. Si tratta di una patologia che si ripresenta ogni anno, con l'abbassarsi della temperatura dell'acqua. L'incidenza che caratterizza la *Winter Stress Syndrome* è molto variabile sia sotto il punto di vista temporale che sotto quello geografico. Le segnalazioni di episodi di questa patologia sono frequenti lungo le coste settentrionali di Italia, Spagna, Grecia, ed inoltre Croazia, Creta, Malta, e nelle coste meridionali di Spagna e Portogallo.

Questo sparide subisce fortemente l'influenza della temperatura dell'acqua, molto probabilmente il più sensibile tra i pesci allevati nelle valli da pesca (Ravagnan 1988). L'intensità la durata e la frequenza che caratterizzano le variazioni di temperatura ne modificano profondamente le risposte fisiologiche e comportamentali e possono produrre conseguenze persino letali per il pesce (Hurst, 2007; Donaldson et al., 2008).

Quando la temperatura dell'acqua scende al di sotto dei 13°C l'orata riduce drasticamente l'assunzione di cibo, si blocca così la crescita delle orate, determinando un periodo improduttivo per l'allevamento (Ravagnan et al., 1992; Tort et al., 1998). Nel caso in cui le condizioni metereologiche siano particolarmente sfavorevoli, e la temperatura si abbassi sino a 5°C, si vengono a creare delle condizioni letali per l'orata (Ravagnan et al., 1992; Barnabé, 1990).

Con il naturale abbassamento della temperatura nei mesi invernali e la diminuzione dell'assunzione di cibo, si può sviluppare la condizione patologica di *Winter Disease*. Essa si manifesta in genere nel periodo invernale con mortalità cronica durante i mesi più freddi e gravi episodi di mortalità acuta quando la temperatura inizia ad aumentare all'inizio della primavera (Bovo et al., 1995; Tort

et al., 1998; Domenéch et al., 1997; Sarusic et al., 1999; Gallardo et al., 2003). Il tasso di mortalità è variabile tra il 30% (negli episodi spagnoli e portoghesi come rilevato da Domenech et al., 1997) e il 60% (nelle valli del nord Italia come segnalato da Ravarotto 2005) determinando ingenti e negative conseguenze economiche.

L'obiettivo di questa ricerca è quello di analizzare tramite analisi biomolecolari di espressione genica le risposte adattative di esemplari di orata sottoposti alle basse temperature e confrontarle con i pattern di espressione di orate mantenute in condizioni di temperatura ottimali. I dati ottenuti poi saranno analizzati con software bioinformatici e il risultato dell'analisi ottenuto con *Microarray technology* validato tramite Real Time RT-PCR.

Inoltre verranno condotte analisi istologiche su vari tessuti per poter rilevare evidenze morfologiche indotte dalle condizioni di bassa temperatura nell'orata.

3.SPARUS AURATA

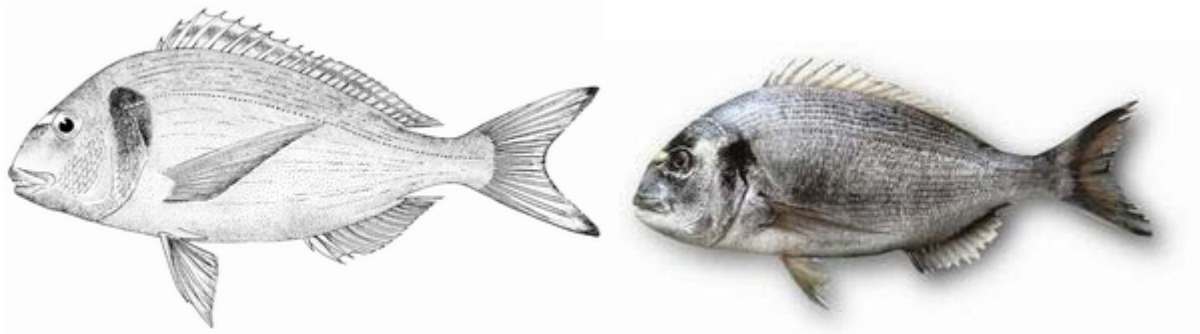


Figura 1: *Sparus aurata*

3.1 Classificazione scientifica (*Sparus aurata* , Linneo 1758)

Regno: Animalia

Sottoregno: Eumetazoa

Ramo: Bilateria

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Superclasse: Gnathostomata

Classe: Actinopterygii

Sottoclasse: Osteichthyes

Superordine: Acanthopterygii

Ordine: Perciformes

Sottordine: Percoidei

Famiglia: Sparidae

Genere: *Sparus*

Specie: *S. aurata*

Tabella 1: classificazione scientifica

3.2 Caratteristiche biologiche :

Il corpo dell'orata si presenta ovale, piuttosto profondo e schiacciato. Il profilo della testa appare regolarmente curvato. La bocca è posta ventralmente rispetto all'asse longitudinale del pesce, con una direzione dell'asse dell'apertura buccale leggermente obliquo. Le labbra sono sottili.

In posizione anteriore, sia sulla mascella che sulla mandibola, troviamo da 4 a 6 denti di forma simile a un canino, a questi seguono caudalmente dei denti di forma più appiattita che diventano progressivamente simili a molari e che sono disposti in 2 o 4 file (i denti che appartengono alle file più esterne sono più resistenti).

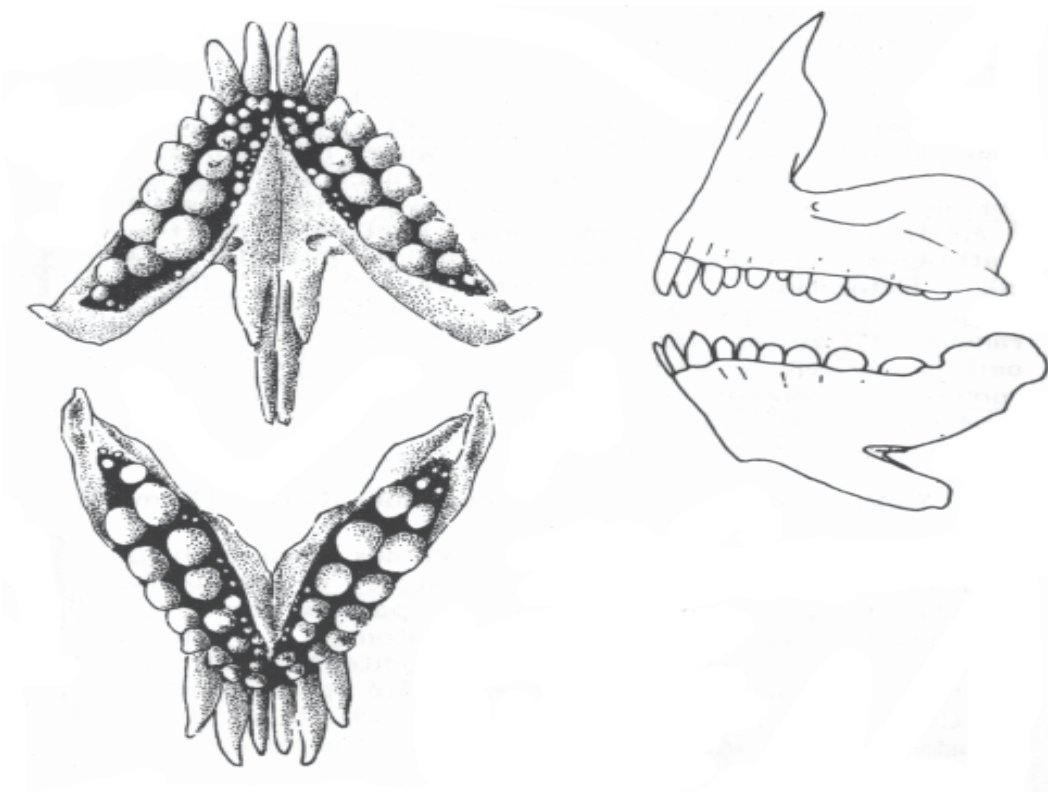


Figura 2: dentatura dell'orata

La pinna dorsale è unica e presenta 11 raggi cornei e da 13 a 14 molli. La pinna anale, anch'essa impari, presenta 3 raggi cornei e da 11 a 12 molli.

Le pinne pari, invece, sono laterali e ventrali, poste in posizione toracica.

La regione delle guance presenta delle scaglie, mentre la zona attorno all'opercolo ne risulta priva. La linea laterale comprende da 73 a 85 scaglie. Il colore è grigio argenteo, all'origine della linea laterale è presente una zona di colore nero che si estende sul margine superiore dell'opercolo sopra ad un'area rossastra; tra gli occhi è presente una banda dorata in posizione frontale che collega le due aree di colore nero, essa non è ben definita negli individui giovani; sul fianco del corpo e della coda possono essere presenti delle bande verticali di colore scuro. Infine è presente un margine di colore nero sia sul margine dorsale della pinna dorsale che su quello caudale della pinna caudale.

3.3 Excursus storico:

Tradizionalmente, l'orata è stata allevata in modo estensivo nelle lagune costiere e nelle zone di acqua salmastra, fintantoché non si sono sviluppati i metodi di allevamento intensivo durante gli anni '80. In Italia la vallicoltura e in Egitto "Hosha" sono tecniche di allevamento estensivo che si sviluppano sfruttando le migrazioni trofiche dei pesci agli stadi giovanili dal mare all'interno delle lagune costiere.

L'orata è un pesce molto adatto per l'acquacoltura nel Mediterraneo grazie al buon prezzo di mercato, dell'alta capacità di sopravvivenza e delle abitudini alimentari (che lo pongono abbastanza in basso nella catena alimentare). E' principalmente carnivoro, si nutre di crostacei, compresi i mitili e le ostriche.

L'alimentazione artificiale è stata concretamente e positivamente migliorata in Italia nel 1981-1982 e la riproduzione artificiale di stadi giovanili di orata è stata definitivamente ottenuta negli anni 1988-1989 in Italia, Spagna e Grecia.

La produzione di uova e l'allevamento di questa specie sono una dei successi nel business dell'acquacoltura. Questa specie ha dimostrato velocemente il proprio adattamento alle condizioni di allevamento intensivo sia in gabbie che in vasca e la sua produzione annuale è cresciuta costantemente dal 2000, anno in cui ne sono state prodotte più di 87000 tonnellate.

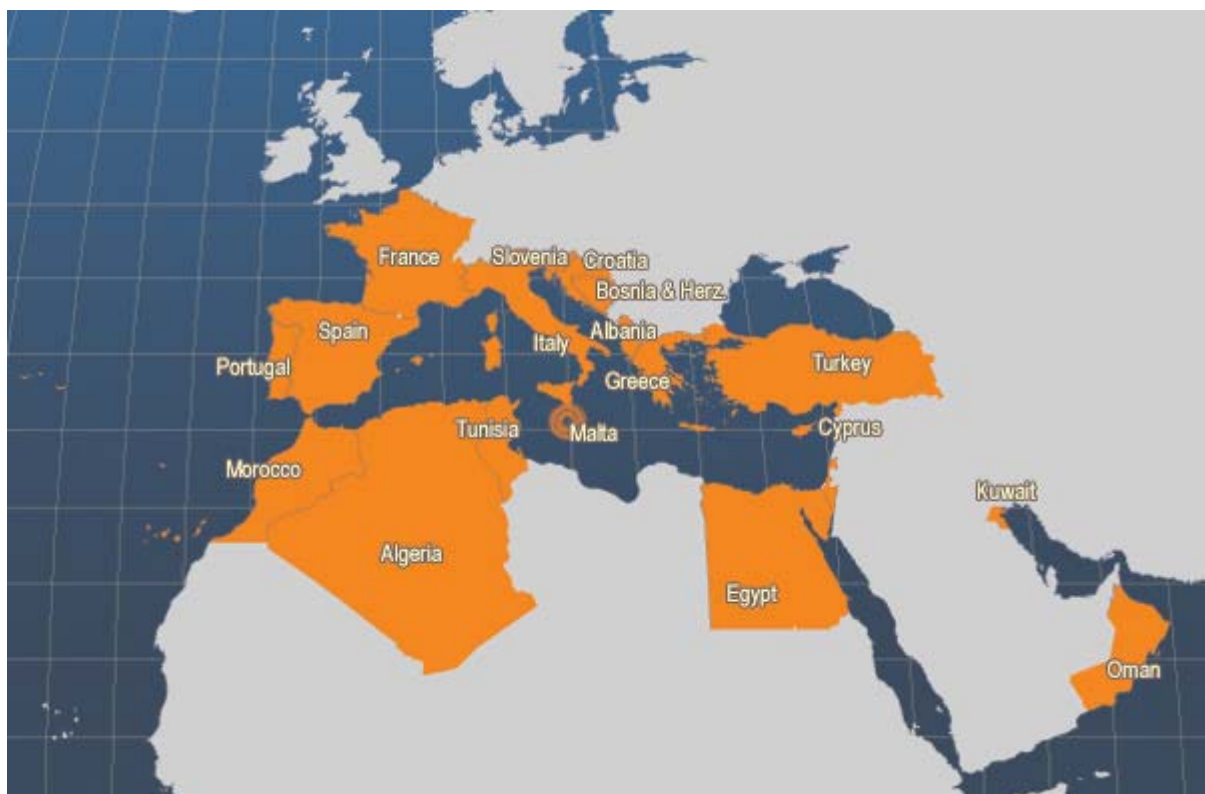


Figura 3: distribuzione geografica dell'orata in Europa, Africa ed Asia

3.4 Biologia ed habitat:

L'orata è comune nel mar Mediterraneo, presente lungo le coste orientali dell'oceano Atlantico dalla Gran Bretagna al Senegal, raramente la si ritrova nel Mar Nero.

A causa delle sue abitudini eurialine ed euriterme, è possibile rinvenire le specie sia in ambiente marino che salmastro come le lagune costiere o le aree degli estuari, in particolare durante la fase iniziale del ciclo di vita. Le uova in genere schiudono in mare aperto durante il periodo tra ottobre e dicembre, le larve e, successivamente, gli avannotti migrano all'inizio della primavera verso le acque costiere dove possono reperire abbondanti risorse trofiche e temperature più miti. E'una specie molto sensibile alle basse temperature (il minimo letale è di 4°C), in tardo autunno ritorna nel mare aperto dove gli adulti si accoppiano. In mare aperto le orate sono trovate su fondali rocciosi e praterie di alghe (*Posidonia oceanica*), ma è frequentemente catturato su fondali sabbiosi. I giovani pesci restano in aree relativamente poco profonde (fino a 30 metri), mentre gli adulti possono raggiungere fondali più profondi, in genere non più di 50 metri. Questa specie è ermafrodita proterandrica, cioè il pesce possiede entrambi gli apparati riproduttori maschile e femminile, che sviluppa in momenti diversi della propria vita. La maturità sessuale in senso maschile è raggiunta ai 2 anni di età (possono corrispondere ad una lunghezza approssimativa di 20-30 cm) e in senso femminile a 3 anni di età (che possono corrispondere a una lunghezza approssimativa di 33-40 cm).

Gli individui di sesso femminile depongono le uova più volte nella stagione riproduttiva e possono depositare tra le 20000 e le 80000 uova ogni giorno per un periodo di 4 mesi.

In cattività, il cambiamento di sesso è condizionato non solo dall'età ma anche da fattori sociali e ormonali.

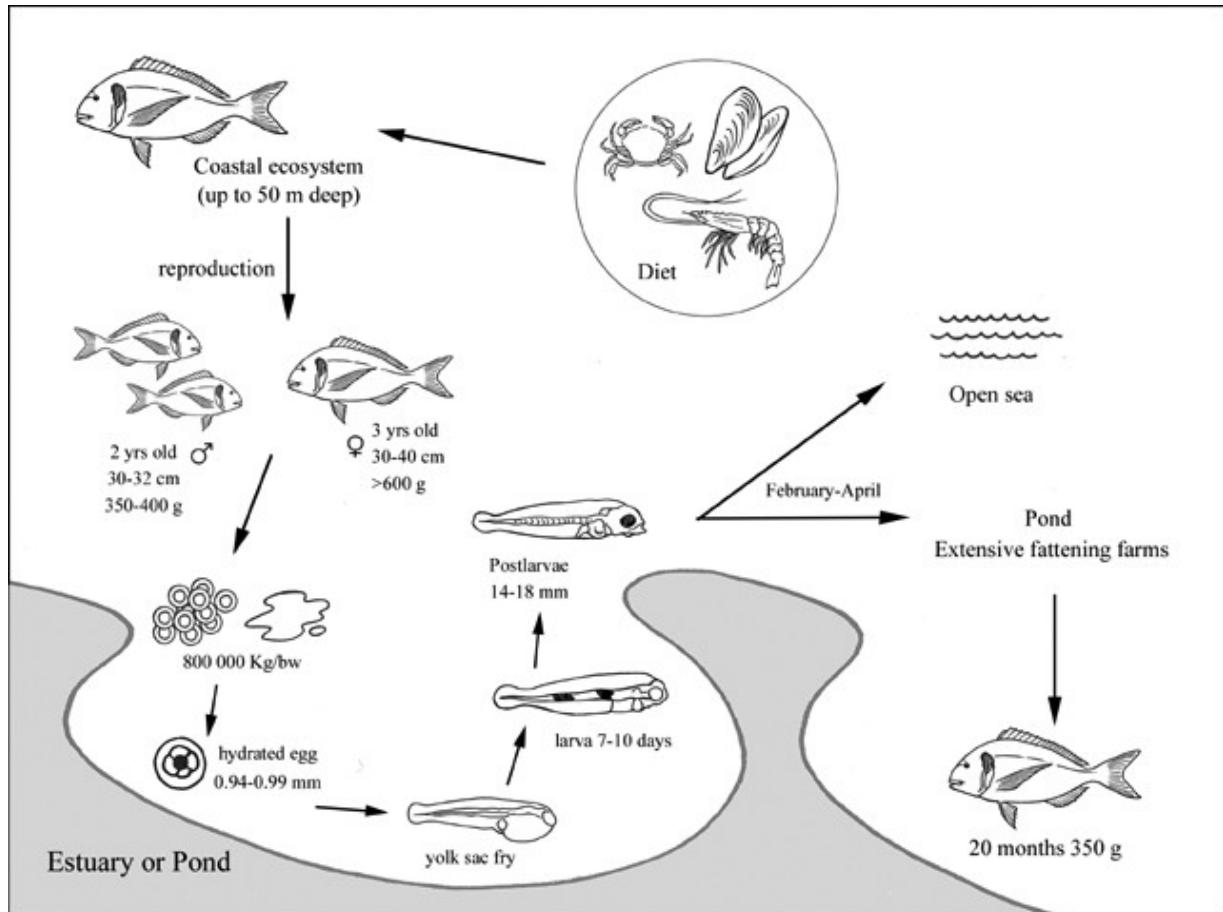
3.5 Comportamento:

I giovani sono gregari mentre gli esemplari più grossi tendono a divenire solitari. Nei suoi spostamenti giornalieri tende a seguire sempre le stesse rotte. Si riproduce in inverno. Durante i mesi estivi tende a spostarsi nelle lagune, da cui si allontana quando si raffreddano.

4.CICLI PRODUTTIVI

4.1 Ciclo produttivo:

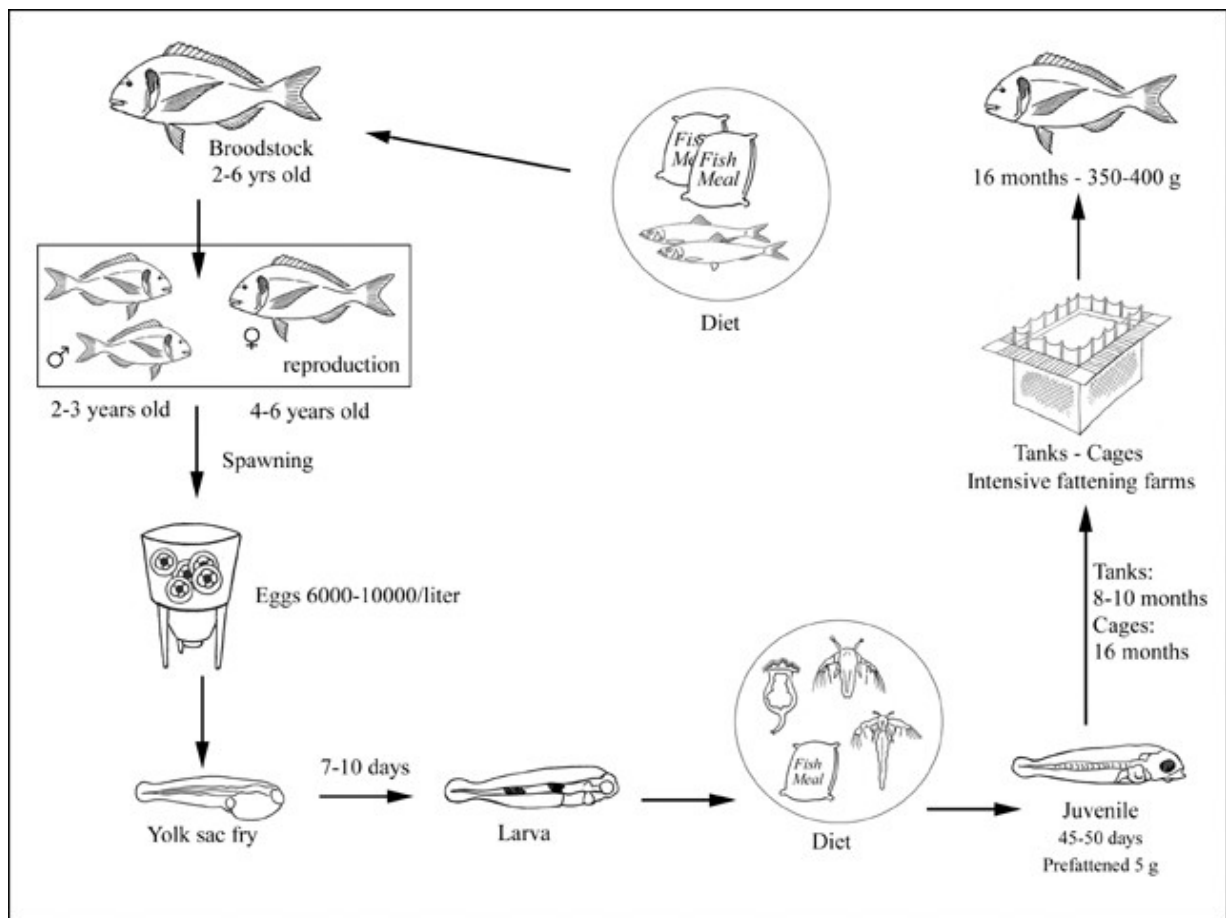
In natura o nell'allevamento estensivo (vallicoltura):



¹ **Figura 4:** schema produttivo dell'allevamento estensivo

¹ Nei mesi tardo autunnali gli adulti si avvicinano alla costa per riprodursi, dal concepimento originano uova idratate di circa 0,9mm di diametro, che daranno origine ad una larva con sacco amniotico (dal quale trae nutrimento), in circa 7-10 giorni essa diventa una larva adulta, poi postlarva nel periodo di febbraio-aprile, essa poi potrà raggiungere il mare aperto o restare in zone di allevamento estensivo fino a raggiungere in 20 mesi la taglia commerciale di 350 g.

In allevamento intensivo:



² **Figura 5:** schema produttivo dell'allevamento intensivo

² In allevamento intensivo dalla spremitura dei riproduttori si ottengono le uova fecondate, dalle quali schiude una larva con sacco amniotico, in 7-10 giorni si forma una larva matura, con la dieta si ottiene poi l'avannotto a circa 45-50 giorni di età, che viene preingrassato per 5 giorni, da qui gli avannotti vengono trasferiti in gabbie o vasche per l'ingrasso fintantoché non raggiungono la taglia commerciale a 16 mesi.

4.2 Sistemi produttivi:

4.2.1 Sistemi di allevamento:

È possibile far riprodurre ed accrescere l'orata in differenti realtà produttive: è possibile cercare di sfruttare le risorse naturali di aree molto estese come bacini costieri e lagune, con metodi estensivi e semi intensivi; oppure utilizzando strutture a terra come le vasche, o gabbie in mare approcciando un metodo di allevamento intensivo. Ovviamente si tratta di sistemi molto diversi dove le maggiori differenze risiedono nel tipo di alimentazione, nell'impegno esercitato dall'uomo e nella densità raggiunta in allevamento. Questo si ripercuote sui costi di produzione: infatti in base a recenti indagini valutative pubblicate dalla FAO (Colloca, F.; Cerasi, S. 2005). Si calcola che in Italia il costo medio di un avannotto di orata del peso di 2 grammi vari tra gli € 0.10-0.18, il *range* (intervallo) così ampio dipende dal tipo di ingrasso cui è stato sottoposto, mentre per individui del peso di 5 grammi il costo sale a € 0.26-0.28. Infine, i costi di allevamento per produrre un orata di taglia commerciale variano tra € 3.0-4.0, a seconda del tipo di allevamento.

4.2.1.1 Allevamento estensivo: questo sistema sfrutta la migrazione naturale del pesce eurialino, quando il pesce può essere catturato, sfruttando in genere strumenti di cattura specifici. Dal momento che questa pratica non garantisce una fornitura cospicua e costante di avannotti, molte moderne unità produttive estensive basano il loro allevamento sia sulla cattura di pesce selvatico che sull'acquisto di avannotti. In genere la "semina" (rilascio di avannotti acquistati nella valle da pesca) si effettua con pesci del peso medio di 2-3 grammi nei mesi di aprile e maggio. In queste condizioni di allevamento le orate raggiungono la taglia commerciale (un peso di circa 350 g) in circa 20 mesi, esse sono in genere allevate con cefali, anguille e spigole. Nelle lagune del Mediterraneo settentrionale è necessario far trascorrere l'inverno in bacini profondi per preservare le orate di un anno di età. Il quantitativo totale prodotto da queste policolture varia molto (30-150 kg/ha/anno) ed è intrinsecamente connesso alle caratteristiche trofiche che può fornire la laguna. Negli allevamenti estensivi presenti nelle lagune del Veneto, Emilia Romagna e Friuli Venezia Giulia, la produzione di orate rappresenta tra i 15 e i 30 kg/ha/anno. Durante il ciclo produttivo il pesce si alimenta sfruttando le risorse naturali della laguna, non è prevista la fornitura di una razione alimentare supplementare. Per quanto riguarda le concentrazioni in genere non si superano mai gli 0,0025 kg/m³.

4.2.1.2 Allevamento semi-estensivo: in questo tipo di allevamento il controllo dell'uomo è maggiore rispetto a quello estensivo. Può trattarsi semplicemente di seminare in lagune avannotti precedentemente ingrassati in allevamenti intensivi al fine di accorciare il periodo necessario a portare a taglia commerciale l'animale e minimizzare la mortalità. In questo caso è possibile anche fertilizzare la laguna per fornire maggiori capacità nutritive per la fauna allevata. Altri tipi possibili di allevamento semi-estensivo necessitano di un controllo maggiore e prevedono l'utilizzo di ossigeno supplementare e di alimentazione artificiale. Questo tipo di allevamento è, in genere, mantenuto in aree lagunari recintate con reti. Il prodotto finale può essere profondamente diverso, dipendentemente dalla taglia degli avannotti utilizzati e dalla quantità di cibo presente. La densità in un allevamento semi-estensivo non supera in genere 1 kg/m^3 e il *range* di produzione varia tra i 500 e i 2400 kg/ha/anno.

4.2.1.3 Allevamento intensivo: la fase di ingrasso intensiva segue le altre fasi dell'allevamento: riproduzione, crescita larvale e pre-ingrasso. La fase di pre-ingrasso nell'orata può essere effettuata in vasche a terra di forma rettangolare con una capacità molto variabile (tra i 200 e i 3000 m^3) in dipendenza dalla dimensione dei pesci e dalla richieste produttive. La crescita può anche avvenire in gabbie a mare in zone riparate o semi esposte (gabbie galleggianti) o in siti completamente esposti (gabbie sommerse). I centri di ingrasso possono rifornirsi da diverse avannotterie acquistando gli avannotti, ma le unità produttive più importanti sono autosufficienti nella rimonta. Nei sistemi intensivi l'indice di conversione alimentare (FCR) è molto favorevole (può arrivare a 1.3:1). Quando le orate sono stabulate in vasche le densità presenti sono molto elevate, si aggirano attorno a $15\text{-}45 \text{ kg/m}^3$ ed è necessaria una cospicua iniezione di ossigeno per assicurare la sopravvivenza dei pesci. In particolari ed eccellenti condizioni di temperatura (tra i $18\text{-}26 \text{ }^\circ\text{C}$), gli esemplari degli stadi giovanili preingrassati (del peso di 5 g) raggiungono precocemente il peso commerciale (350-400 g) in appena 12 mesi. L'ingrasso, invece, in gabbie a mare è semplice ed economico; è il sistema di ingrasso più comunemente utilizzato nel bacino del Mediterraneo. Sebbene le concentrazioni non siano così elevate come in vasca ($10\text{-}15 \text{ kg/m}^3$), ci sono dei grossi vantaggi per rendere le gabbie più remunerative. Per esempio, non ci sono costi aggiuntivi per pompare l'acqua, ossigenarla e trattare l'acqua reflua dell'allevamento. Tuttavia la mancata possibilità di controllare la temperatura nelle gabbie rende maggiormente prolungati i tempi per raggiungere la taglia commerciale o determina la necessità di iniziare ad

ingrassare un maggior numero di avannotti per sopperire al tasso di mortalità imputabile alla bassa temperatura.

In media un'esemplare di orata preingrassata di grosse dimensioni (10 g) raggiunge la taglia commerciale in un anno, mentre partendo da orate di peso modesto (5 g) è richiesto un periodo di 16 mesi.

Considerando, poi, le modalità di somministrazione dell'alimento le razioni di cibo sono distribuite da alimentatori automatici programmati con intervalli di 2 ore dalle 8.00 alle 20.00 fintantoché sono pesci di piccole dimensioni (1-3 g), utilizzando percentuali sempre maggiori di alimenti artificiali con particelle tra i 150 e i 300 μm ; mentre per pesci di dimensioni maggiori la distribuzione dell'alimento è eseguita manualmente. E' necessario effettuare la selezione per taglia e successiva separazione dei pesci ("*grading*") almeno due o tre volte per ciclo per evitare la crescita sproporzionata di alcuni individui a scapito di altri. Per quanto concerne le tecniche di raccolta è bene precisare che prima della cattura i pesci vengono mantenuti in una condizione di digiuno per alcuni giorni. La durata di questo periodo varia dipendentemente dalla temperatura e dalla velocità di alimentazione; sono sufficienti 24 ore ad una temperatura di 25°C, mentre a temperature più basse sono necessarie 48-72 ore. Dopo un periodo di digiuno il pesce è pronto per essere catturato. Prima di iniziare quest'operazione è necessario monitorare la presenza di pesci morti o moribondi. E' possibile raccogliere il pesce in ogni condizione atmosferica nelle vasche a terra. Nelle vasche in cemento, il personale spinge gli animali verso l'ingresso dell'acqua utilizzando una piccola rete (sciabica); successivamente rimuovono i pesci tramite reti o aspirandolo con specifiche pompe. Viene posta molta attenzione nella pulizia del fondo della vasca prima della raccolta, al fine di garantire le qualità igienico-sanitarie del prodotto e conservare le caratteristiche organolettiche, evitando che del materiale indesiderato, depositatosi sul fondo precedentemente, possa entrare nella bocca o nelle branchie del pesce. Altre considerazioni riguardano, invece, la raccolta nelle vasche a mare dove è fondamentale lo stato del mare per garantire la sicurezza degli operatori addetti alla raccolta. Il pesce anche in questo caso viene concentrato in una piccola area e poi pescato con retini o aspirato con pompe apposite. In entrambi i tipi di allevamento le orate muoiono in genere per shock termico; i pesci, infatti, vengono posti in recipienti che possono essere in plastica o acciaio, con ghiaccio, possono essere saturati con anidride carbonica per ridurre il dolore. Viene riposta attenzione nel momento dello stoccaggio del pesce, la

manovra viene eseguita in velocità per evitare la perdita di squame e mantenere la lucentezza e la livrea del pesce.

Fornitura di materiale riproduttivo: solitamente ogni allevamento dispone della sua unità riproduttiva, dove stazionano riproduttori di varie età, dai maschi di 1 anno di età alle femmine di 5 anni di età. Questi riproduttori vengono mantenuti in condizioni ottimali per preservarli a lungo. I riproduttori possono provenire essi stessi dall'allevamento o essere selvatici. All'inizio della stagione di deposizione delle uova i riproduttori selezionati sono trasferiti dalle loro vasche a lungo termine nelle vasche di deposizione. Il controllo del rapporto tra i sessi nelle vasche di deposizione e fecondazione è un fattore molto importante per l'orata, ed è necessario prendere delle precauzioni perché in questa specie l'inversione del sesso è determinata anche socialmente. Per esempio, la presenza di giovani maschi alla fine del periodo di deposizione aumenta il numero di pesci più vecchi che diventeranno femmine. D'altro canto, la presenza di femmine anziane riduce l'inversione di sesso nei giovani pesci.

Gestione dei riproduttori: il gruppo dei riproduttori viene solitamente condizionato con manipolazioni delle condizioni ambientali per allungare o modificare il periodo riproduttivo. I pesci, infatti, sono mantenuti in vasche dotate di un sistema di riscaldamento e raffreddamento a controllo computerizzato, inoltre queste vasche dispongono di una fonte di illuminazione artificiale anch'essa regolabile in intensità. La maturazione sessuale è ottenuta esponendo il gruppo dei riproduttori a condizioni di temperatura e fotoperiodo che si manifestano in natura nel momento dell'accoppiamento. L'ovodeposizione da parte delle femmine può essere ottenuta anche mediante l'inoculazione di ormoni quali il GonadotropinReleasingHormone a (GnRHa) alla dose di 5-20 mg/kg. Esistono poi due differenti modalità per allevare gli stadi larvali dell'orata quello su grande scala e quello su piccola scala. La modalità di allevamento su piccola scala (volume trattati inferiore a 10 metri cubi) è caratterizzata dall'esercitare il massimo controllo sui parametri ambientali ed è strutturato per produrre grandi quantità di avannotti (fino a 150-200 per litro). La modalità su larga scala invece simula un ecosistema naturale (sfrutta volumi di circa 200 metri cubi). Questa tecnica garantisce una miglior qualità delle larve rispetto a quella ottenibile con la tecnica su piccola scala, ma produce molti meno avannotti (al massimo 10 per litro). Le larve di orata in genere esauriscono il materiale del sacco amniotico in circa 3-4 giorni di alimentazione

endogena. In questa fase gli occhi della larva sono pigmentati e la bocca è formata, questo consente alle larve di predare organismi allo stadio larvale. Nella maggior parte degli allevamenti l'alimento usato per le prime fasi di vita delle larve sono i rotiferi (ad esempio *Brachionus plicatilis*). Questa scelta trova la propria spiegazione nella facilità con cui è possibile allevare su larga scala questi organismi. Dopo 10-11 giorni la dieta sinora esclusivamente a base di rotiferi viene integrata con *Artemia salina nauplii* fino a che le larve non hanno terminato la metamorfosi (32-35 giorno dalla schiusa). Prima di essere somministrate alle larve, sia i rotiferi che l'artemia, sono solitamente arricchiti con preparazioni lipidiche commerciali per aumentare il livello di acidi grassi essenziali quali EPA (l'acido eicosapentaenoico) e DHA (acido docoesaenoico), e di vitamine, di importanza fondamentale per una buona crescita, sviluppo e sopravvivenza delle larve. Nei vivai mediterranei le microalghe quali (*Chlorella* sp., *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Nannochloropsis oculata*, *N. gaditana*, *Dunaliella tertiolecta*) sono utilizzate sia per la produzione dei rotiferi che per migliorare la qualità dell'acqua delle vasche dove vengono cresciute le larve, creando così le cosiddette "acque verdi" che sono utilizzate nelle prime fasi dell'allevamento. Lo svezzamento con una dieta secca ad alto contenuto proteico (50-60%) viene effettuato quando le larve raggiungono un peso compreso tra i 5 e i 10 mg.

Nursery: gli avannotti, ad un'età di circa 45 giorni sono spostati in sezioni dedicate dell'allevamento, dotate di vasche più spaziose di forma rettangolare o cilindrica con una capacità tra i 10 e i 25 metri cubi, dove viene attuato lo svezzamento. La fase di svezzamento è fortemente intensiva per l'intero sistema di allevamento. In un primo momento vengono mantenuti circa 10-20 avannotti per litro ad una temperatura di circa 18°C con una salinità del 35-37 ‰. La densità finale sarà di circa 20 kg/m³. L'alimentazione è somministrata ad intervalli di due ore dalle 8.00 alle 20.00, utilizzando percentuali crescenti di mangimi artificiali composti da particelle di 150-300 µm. L'alimento secco inizialmente deve essere somministrato alla concentrazione di 20 kg/m³ con pesci del peso medio di 2-3 grammi.

4.3 La vallicoltura

4.3.1 Caratteristiche generali e metodi di funzionamento.

Nell'ambito della moderna vallicoltura vengono ora analizzati gli aspetti che la caratterizzano in modo peculiare nelle zone umide del nord-est italiano. Esistono, infatti, una serie di bacini contenenti acqua salmastra che si estendono dal delta del fiume Po a sud al confine tra Veneto ed Emilia Romagna e si estendono fino alla laguna di Grado in Friuli. Questi habitat comprendono le valli di Comacchio a sud, poi la laguna di Caleri, l'intera laguna veneta considerando in particolare quella di Chioggia più a sud, Venezia nella parte centrale e Jesolo a nord, risalendo sempre verso nord le zone di Caorle e Bibione per arrivare fino a Lignano e la laguna di Grado. In questa vasta area geografica del nord-est italiano trovano sede le valli da pesca, questo nome racchiude in sé entità produttive molto differenti sia per le caratteristiche intrinseche dell'ecosistema in cui sono state create, sia per l'intensità con cui l'uomo ha modificato il territorio. Sono presenti, infatti, valli caratterizzate da terreno argilloso di bassa profondità, valli sempre con fondo argilloso e di alta profondità, valli con terreno sabbioso. Esistono poi valli che soggiacciono a un sistema idraulico naturale e che subiscono quindi direttamente gli sbalzi della marea, e valli che sono pensili o governate con idrovore. Una caratteristica che accomuna tutte le valli del nord-est e le differenzia da quelle presenti in sud Italia o nelle isole è quella di essere valli a clima freddo.

Un'altra importante caratteristica di queste realtà produttive è che in esse si pratica la policoltura, generalmente sono allevate le seguenti specie: Orata (*Sparus aurata*), Branzino o Spigola (*Dicentrarchus labrax*), Lotregano (*Liza auratus*), Bolegna (*Chelon labrosus*), Volpina (*Mugil cephalus*), Verzellatta (*Liza saliens*), Caostello (*Liza ramada*), Anguilla (*Anguilla anguilla*) e Passarìn (*Platichthys flesus luscus*).

Sin dall'antichità l'uomo ha notato: "la montata dei pesci dal mare; una legge ittiologica che si verifica in modo costante in tutte le lagune, bassi fondi, foci dei fiumi; per cui in dati mesi dell'anno alcune specie di pesci e il novellame di mare e le cieche (piccole anguille) entrano nei porti per installarsi nelle lagune, ivi per alcuni mesi pascolano ed ingrandiscono, per discendere verso l'inverno al mare al riparo dalla stagione ed allo scopo della propagazione della specie" (Bullo, 1940). Questo fenomeno è da attribuirsi alla natura eteroterma del pesce, infatti nei bacini di acqua salmastra si innalza precocemente la temperatura rispetto che alla fascia litoranea di mare antistante, e all'inizio della primavera il pesce entra nei bacini salmastri in cerca di fonti alimentari e migliori condizioni ambientali, successivamente con il trascorrere dell'estate e l'approssimarsi dell'autunno

la temperatura comincia a scendere e nuovamente i bacini di acqua salmastra subiscono per primi il decremento della temperatura, questa nuova condizione spinge il pesce a tornare in mare dove, recandosi in zone con profondità elevate, troverà nuovamente una condizione di temperatura migliore per la propria omeostasi. In secondo luogo è da considerare anche che questi bacini, nella stagione favorevole, presentano infatti grandi risorse alimentari grazie al notevole apporto di nutrienti e detriti trasportati dalle acque torbide dei fiumi ed accumulati durante il periodo invernale. Si vengono così a creare le condizioni ottimali soprattutto per le fasi giovanili delle molte specie ittiche eurialine. L'attività di pesca nelle valli è effettuata utilizzando principalmente il Lavoriero. Si tratta di un manufatto fondamentale dell'attività di pesca nelle valli lagunari. Nel lavoriero tradizionale particolari incannicciate (grisole), infisse nel fondo lagunare e sostenute da un'intelaiatura di pali e pertiche, delimitano un perimetro cuneiforme nel quale una serie di bacini triangolari, come punte di freccia, comunicanti fra loro, consentono la cattura differenziata del pesce. Nel corso del tempo, dal lavoriero primitivo di canna si è passati a quello moderno in cemento e metallo, più facile e rapido da costruire.

In autunno, quando si instaurano le condizioni favorevoli alla pesca, l'acqua del mare viene fatta entrare in valle per mezzo dell'apertura delle chiaviche (Apertura praticata in muratura o legname e munita di porta a saracinesca, attraverso gli argini delle valli, per porre le valli stesse in comunicazione con i canali esterni e permettere la circolazione della acqua, la montata de novellame dall'esterno, e la pesca) poste sui canali di comunicazione. L'istinto riproduttivo stimola gli individui sessualmente maturi delle valli a risalire, lungo canaletti interni detti covole, le correnti di acque marine affluenti, più calde e ossigenate di quelle vallive, per raggiungere il mare. Nella sua migrazione il pesce s'imbatta nei lavorieri allestiti nelle stazioni di pesca e, attraverso le aperture A e B del "botteghino", passa nel "colauro" vero. Il pesce bianco (cefali, orate, spigole) e le anguille s'introducono, attraverso la "bocca di cento", nella "baldresca". Le anguille, grazie all'assenza delle scaglie, incuneandosi per la coda riescono ad attraversare il fitto cannicciato ("grisole") della "baldresca", giungendo nella "cogolarà" e, successivamente, attraverso le aperture C arriva nelle "otele": qui il cannicciato del lavoriero, spesso fino a trenta centimetri, ne impedisce la fuga. La funzione del lavoriero, quindi, non è solo quella di intrappolare i grossi contingenti di pesci in migrazione, ma serve anche a separare il pesce bianco, che si ferma nella "baldresca", dalle anguille raccolte nelle "otele".



Figura 6: lavoriero tradizionale

Schema di un lavoriero tradizionale:

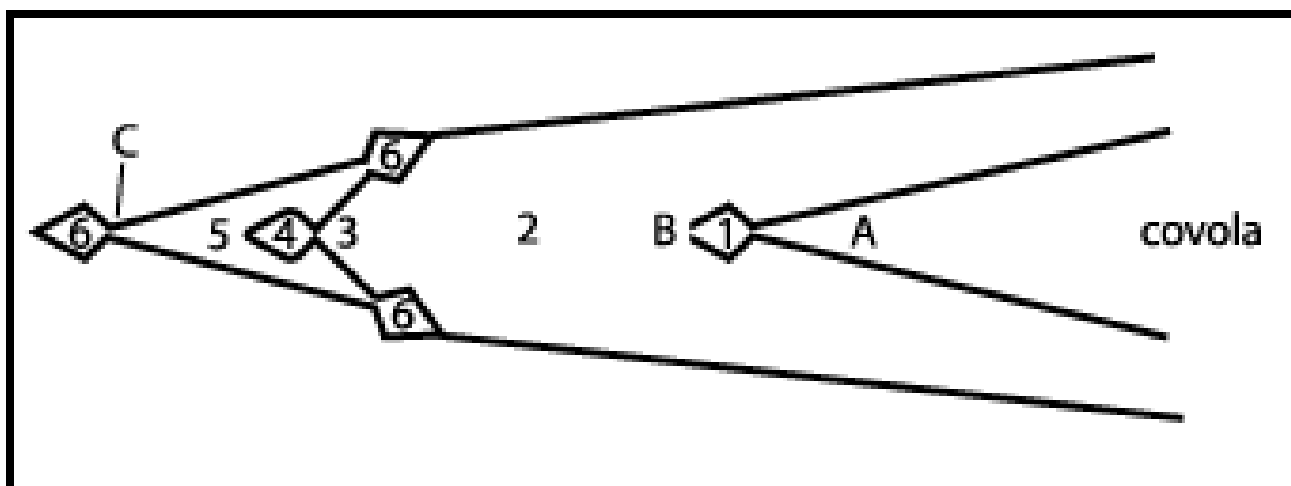


Figura 7: schema del lavoriero tradizionale

Legenda: 1 - Botteghino
 2 - Colauro vero
 3 - Bocca di cento
 4 - Baldresca
 5 - Cogolara
 6 - Otele

Altre strutture che rivestono particolare importanza per la continuità dell'allevamento vallivo sono quelle per la stabulazione dei pesci: si tratta delle cosiddette peschiere di sverno, bacini dove i pesci che sono stati introdotti all'inizio della primavera e che non hanno raggiunto ancora la taglia adatta per essere immessi sul mercato vengono tenuti durante l'inverno. Questi presentano una profondità maggiore rispetto alla valle, grazie a tale caratteristica la temperatura dell'acqua sul fondo permane più alta e questo consente ai pesci di superare la stagione fredda.

4.3.2 La vallicoltura da metodo tradizionale estensivo a semi-intensivo:

in tempi ormai lontani per ripopolare la valle di pesce si sfruttava il già citato effetto di “montata”, cioè la tendenza da parte del pesce ad entrare in ambienti eutrofici per meglio sopperire alle proprie esigenze alimentari. Il perfezionamento delle strutture, l’estendersi delle aree utilizzate e la maggiore richiesta di prodotto ittico hanno nel tempo aumentato in modo sostanziale il fabbisogno di novellame e il solo effetto di montata non è in grado di garantire un ripopolamento adeguato. Per sopperire a questa carenza primaria si è cominciata ad attuare in vallicoltura la manovra di “semina”, essa consiste nel reperire avannotti ed immetterli nella valle. Tuttavia gli avannotti in genere non vengono rilasciati direttamente nella zona più estesa della valle, ma trascorrono inizialmente un periodo della durata di un paio di mesi nel “seragio del pesse novelo”,

una sezione separata dal resto della valle dove il pesce viene tenuto per almeno due mesi in modo tale da acclimatarlo alle condizioni della valle. Nei seragi è molto importante che sia mantenuto un livello di salinità e di ossigenazione ottimale alla sopravvivenza e alla crescita del novellame. Quando hanno raggiunto una taglia sufficiente, i pesci vengono immessi nella valle vera e propria attraverso delle chiaviche. In passato era presente la figura del “novellante” un pescatore che tramite metodi di pesca tradizionali catturava il novellame dalle aree marine prospicienti la valle, e poi rivendeva il novellame al vallicoltore, oggi giorno i piscicoltori si rivolgono a centri di produzione di novellame che lo ottengono tramite riproduzione artificiale.

Dopo il periodo di adattamento il novellame passa nelle ampie zone di pascolo della valle iniziando così la fase di ingrasso.

Sfruttando l’effetto di “smontata³” nel periodo autunnale si ottiene il convogliamento di tutta la popolazione ittica della valle nei bacini di raccolta (i “colauri”), zone caratterizzate dall’essere poco estese ma più profonde dei bacini di pascolo. Dai bacini di raccolta la popolazione ittica viene smistata, la parte che ha già raggiunto la taglia commerciale viene destinata alla vendita, mentre quella di dimensioni più contenute viene inviata alle peschiere di sverno. Con l’approssimarsi della primavera successiva il pesce che ha passato l’inverno viene re-immesso nei bacini di pascolo per poi richiamarlo nell’autunno seguente.

Il ciclo di allevamento dura da un minimo di uno/due anni per l’orata, fino ad un massimo di cinque/sei per il cefalame. L’anguilla è l’animale con il ciclo produttivo più lungo fino a sette/nove anni ma non manifesta particolari problemi di svernamento.

³ L’effetto di “smontata” è l’esatto contrario di quello di “montata”: il pesce percependo all’interno della valle da pesca l’ingresso dell’acqua di mare più calda e ricca di nutrienti è richiamato da essa e tende a migrare verso il mare. Con l’ingresso dell’acqua di mare insorge lo stimolo riproduttivo per gli animali adulti, si attenua fino a spegnersi quello alimentare, viene accentuata la reotassi (tendenza del pesce a nuotare controcorrente).

Fintantoché l'intera alimentazione è affidata all'ambiente, senza interventi né diretti come la somministrazione di alimento, né indiretti come trattamenti di concimazione e aratura delle valli in secca, si tratta di un allevamento di tipo prettamente estensivo. Con questo tipo di impianto si possono produrre dagli ottanta ai centocinquanta chilogrammi di pesce per ettaro.

Alcuni impianti per aumentare la produttività, ridurre le spese e, quindi, aumentare la redditività hanno profondamente modificato il ciclo produttivo integrando la propria produzione con quella di un impianto di tipo estensivo ed articolando il piano produttivo in sette punti :

- a) semina di avannotti in vasche che sono al coperto inizialmente e successivamente sono scoperte
- b) allevamento intensivo per il primo anno
- c) svernamento in vasche riscaldate o in bacini esterni attrezzati
- d) immissione in bacini intensivi per il secondo anno
- e) in questa fase avviene lo smistamento: una parte del prodotto viene venduta e una parte reimessa nei bacini di svernamento
- f) passata la fase di svernamento il residuo è immesso in zone estensive
- g) totale raccolta della popolazione presente nell'estensivo con cattura e vendita dell'intero prodotto

Oltre alle modifiche nel ciclo di allevamento, in questi impianti, vengono attuate altre operazioni quali il prosciugamento nei bacini per la raccolta.

Con il metodo sopra descritto è possibile ottenere una prima quota di prodotto commerciabile del peso di 250-300 grammi già a partire dal 18°-20° mese di allevamento e un secondo contingente di pezzatura più rilevante, 500-600 grammi, al 30°-32° mese che proviene dall'estensivo. Tale metodo di allevamento viene definito semi-intensivo.

Esiste un limite alla quantità massima di prodotto ittico che può produrre un'area valliva? Per rispondere a questa domanda bisogna introdurre il concetto di "portanza biologica", parametro che è sintesi delle caratteristiche dell'impianto, ad esso infatti sono riconducibili sia fattori direttamente controllabili dal piscicoltore come la quantità di avannotti immessi in ogni semina, sia ad altri che sono da ricondurre invece alla natura dell'impianto come la possibilità di ricambio idrico (si ricordi che ad essa è strettamente legata l'ossigenazione dell'acqua) e la capacità del terreno di generare risorse alimentari per la popolazione ittica. Proprio per la sua natura "onnicomprensiva" si tratta di un parametro molto difficile da stimare (Ravagnan1988). Esistono d'altro canto una serie di accorgimenti cui può ricorrere l'allevatore per elevare o quantomeno mantenere costante la portanza biologica del proprio impianto, si tratta di interventi mirati sull'impianto quali: erpicature o arature del fondo vallivo, concimazioni, aumento dell'efficienza di ricambio idrico, ossigenazione,

policoltura, prosciugamento e avvicendamento. Per stimare la portanza biologica, è importante analizzare i dati di produttività media degli impianti vallivi. Essi si attestano a 150 kg/ha. In seguito all'infestazione da *Argulus* (crostaceo Brachiuro) si è fortemente ridotta la produzione di anguilla, dal momento che questo pesce occupa una nicchia ecologica molto particolare il suo forte decremento non è stato in nessun modo compensato dall'incremento di altre specie ittiche presenti. Oltre alla particolarità che caratterizza la nicchia ecologica dell'anguilla bisogna tenere presente il fatto che in un allevamento estensivo viene utilizzato un ciclo di allevamento molto lungo e poco controllato. Per la sua stessa impostazione, infatti, l'allevamento estensivo è dotato di scarsa elasticità e capacità di sfruttare una risorsa biologica che è certamente presente o in alcuni casi si è addirittura arricchita.

Se si analizzano i dati di produttività delle valli da pesca venete si nota come essa si attesta ad un valore oscillante tra i 100 e i 150 kg/ettaro lordo, ma sempre in relazione alle caratteristiche dell'allevamento in esso troviamo sia il pesce prontamente commerciabile, che le cosiddette "scorte", cioè quella quota di pesce che deve ancora terminare il proprio ciclo produttivo e che resterà in allevamento per circa 4 anni. Qual è il rapporto tra prodotto finito e scorte? Ebbene si valuta che le scorte siano circa il 250%, ossia che per ogni quintale di pesce prodotto sono presenti in rotazione in allevamento 2,5 quintali; oppure capovolgendo il ragionamento che dotando una valle da pesca di 250 kg di pesce essa ne restituirà 350 kg. Un'altra considerazione per quanto concerne la "maturazione" delle scorte, bisogna infatti considerare che un pesce per raggiungere la taglia commerciale passerà almeno 5 inverni in allevamento, per consentire che esso superi in modo favorevole la stagione rigida verrà di volta in volta richiamato nelle peschiere e poi rilanciato in lago, le continue migrazioni cui il pesce è sottoposto per superare la stagione invernale richiedono una quota cospicua di energia, essa non è una voce trascurabile e concorre ad allungare il periodo produttivo, inoltre il superamento anche se favorevole dell'inverno induce un sensibile dimagrimento nel pesce, per un valore che oscilla tra il 5 e il 10% del peso. Adottando buone pratiche di razionalizzazione quali la suddivisione della valle in bacini, l'aumento della densità del pesce, la suddivisione del pesce per taglia possono portare ad un significativo risparmio alimentare stimato nel 20%. Inoltre alcuni interventi di carattere ambientale quali l'erpicoltura, l'aratura, il trattamento con algicidi, possono aumentare significativamente la quota produttiva rispetto all'estensione totale della valle, si valuta infatti che a un ettaro lordo corrisponda mediamente mezzo ettaro produttivo. In funzione di ciò un'area valliva perfettamente attivata potrebbe essere in grado di raddoppiare la propria produzione per ettaro. In conclusione la quantità di prodotto per ettaro che si può ottenere da una valle da pesca adottando un metodo semi-intensivo è la stessa ottenibile da un allevamento estensivo, nella prima però si possono apprezzare vantaggi quali

brevità del ciclo, uniformità del prodotto e immediata commerciabilità dello stesso. La definizione di semi-intensivo sottolinea la non autonomia dell'impianto che deve ricorrere ad un allevamento intensivo per poter immettere nella valle un carico di pesce alimentato artificialmente, con un buon potere di accrescimento e con buone capacità di sopravvivenza.

Una volta trascorsa la prima stagione di allevamento, che può protrarsi a lungo, i pesci di un anno devono essere ricoverati in bacini con caratteristiche tali da permettergli di attraversare le rigide temperature invernali. La condizione migliore per non arrecare stress al pesce è quella di sfruttare la reotassi (istinto del pesce a nuotare controcorrente) e inviarlo in vasche vicine all'uscita. L'efficienza sia della tecnica di svernamento che le caratteristiche degli impianti sono determinanti per il buon funzionamento dell'intero allevamento. Le condizioni climatiche che caratterizzano i rigidi inverni nell'alto adriatico rendono sostanzialmente necessario l'impianto di sverno in ogni valle, che altrimenti risulterebbe improduttiva. Risulta evidente che viene svernato il pesce che è giudicato di taglia non ottimale per l'immissione sul mercato. L'orata nella classifica delle specie allevate in valle è quella per cui la tecnica di sverno è più complicata, vista la scarsa resistenza di questo pesce alle basse temperature (G. Ravagnan 1988). Il pesce viene pertanto immesso nella stagione invernale nelle peschiere; si tratta di una serie di canali collegati tra loro caratterizzati dall'aver profondità di gran lunga maggiori rispetto al bacino di allevamento (tra i 3 e i 6 metri), essi inoltre dovrebbero essere disposti in modo da essere perpendicolari alla direzione dei venti dominanti, così da offrire una minore superficie di scambio. Gli argini di questi canali hanno un'altezza di circa un metro e su di esso vengono coltivate piante sempreverdi per costituire una siepe frangivento. Le condizioni più sfavorevoli per lo svernamento sono presenti dopo abbondanti nevicate, brinate o quando spirano venti gelidi. In concomitanza con questi eventi ci si affida alla capacità termica della peschiera, ma se essi perdurano è possibile che essa si esaurisca. Ecco allora che il corretto orientamento della peschiera rispetto al contesto anemologico (direzione dei venti dominanti) permette di ridurre l'eventualità dell'esaurimento della capacità termica, così come la profondità della peschiera, e le eventuali coperture. In caso di abbondante brina o neve si può ricorrere ad un artificio per evitare che lo scioglimento sottragga un'eccessiva quantità di calore all'acqua della peschiera, rendendola così inadatta alla sopravvivenza del pesce ivi presente: è possibile infatti lasciar fluire abbondanti quantità d'acqua, creando un flusso superficiale costante che verrà a costituire una sorta di "copertura flottante". Essendo infatti molto maggiore il volume d'acqua fluente, esso si raffredderà gradatamente con lo scioglimento della neve e della brina, diminuendo la riduzione di calore degli strati più profondi della peschiera, quelli dove si concentra la stragrande maggioranza del pesce.

4.3.3 L'orata in vallicoltura.

L'orata è uno dei pesci più pregiati allevati nelle valli, i motivi per cui il mercato gradisce particolarmente questo prodotto risiedono senza dubbio nella qualità e prelibatezza delle sue carni, ma senza dubbio al suo successo concorrono anche fattori imponderabili, vista la presenza in valle di pesci altrettanto gustosi ma che non riscuotono un così grande successo sul mercato. L'orata rappresenta comunque un capitolo economicamente significativo e importante all'interno di una valle da pesca. Uno dei fattori limitanti lo sviluppo dell'allevamento dell'orata è il costo del novellame e la reperibilità dello stesso. In passato era ben rappresentata la figura professionale del pescatore novellante, mentre attualmente ci si rivolge principalmente a lotti di avannotti preingrassati che vengono liberati nella valle. Stante il costo e la ridotta fruibilità di novellame, nelle valli da pesca si attua un allevamento all'orata di tipo estensivo. E' sempre comunque consigliabile trattenere la "semina" in vasche per il primo periodo, questo al fine di poter operare un corretto controllo profilattico e garantire un corretto adattamento. La percentuale di sopravvivenza dell'orata alla fine del primo anno di allevamento risulta superiore al 50 %, mentre alla fine del secondo anno sono normali valori del 95% (G.Ravagnan1988). Queste percentuali sono da riferirsi a condizioni di svernamento ottimali ed a pesci che hanno già raggiunto un peso di circa 200 grammi, in caso infatti di inverni con temperature particolarmente rigide, o della presenza di situazioni che non consentono un corretto svernamento del pesce le percentuali di mortalità al primo anno possono essere del 60 %. (Ravarotto 2005).

Per quanto riguarda l'accrescimento in genere l'orata raggiunge la taglia commerciale (3-400 g) già dal secondo anno di allevamento. L'avannotto di orata dunque dopo un breve soggiorno in vasca viene lanciato nei bacini estensivi e lo si rivede pronto alla vendita o allo svernamento al momento di richiamo di pesca autunnale, al quale risponde con grande prontezza anche perché l'epoca di raccolta coincide con la sua maturazione sessuale. Tra le caratteristiche che possono concorrere ad una buona sopravvivenza dell'orata sono la sua naturale resistenza e la aggressività. L'allevamento dell'orata in valle tuttavia è fortemente condizionato dalla scarsissima resistenza alle basse temperature di questo pesce. E' questa la ragione che rende necessaria un'attrezzatura di sverno a lei dedicata, l'orata va infatti svernata da sola in bacini a lei dedicati.

Il costo dell'avannotto è in genere elevato e induce l'allevatore a vendere l'orata alla fine del secondo o addirittura terzo anno, potendo sfruttare l'aumento del prezzo per la maggiore taglia. Ecco dunque che un corretto svernamento diventa fondamentale per il buon risultato economico dell'allevamento di questo pesce. Nelle valli si riservano dunque alle orate le peschiere migliori, questo comunque non assicura il risultato e molti allevatori dispongono sul fondo dei bacini delle reti per poter recuperare il pesce moribondo e venderlo immediatamente per recuperare almeno

parte delle spese. In alcuni allevamenti particolarmente avvantaggiati, esistono infiltrazioni di acqua calda nelle peschiere che mantengono una temperatura ottimale anche in inverno oppure in taluni vi è la presenza di pozzi artesiani dai quali si attinge acqua calda da immettere nelle peschiere. Considerato l'elevato peso economico di questo pesce in valle, la condizione ideale sarebbe quella di svernarlo in vasche coperte a temperatura controllata.

4.3.4 Cenni storici.

Storicamente, nelle lagune dell'Alto Adriatico si osserva la progressiva e lenta evoluzione di un sistema di pratiche empiriche il cui risultato finale è stato lo sviluppo di una forma di allevamento estensivo del pesce nota come vallicoltura (Bullo, 1891 e 1940; Brunelli, 1933; Ardizzone et al., 1988). L'uomo ha iniziato a "intercettare" il flusso ittico, accogliendolo in fase di "montata" e trattenendolo poi in quello di "smontata"(Ravagnan, 1992). Le valli venivano probabilmente già in qualche modo utilizzate in epoca preromana. Attorno al 1000 iniziano le citazioni di sistemi di pesca basati sulle migrazioni del pesce (*piscariae aquae*), mentre il primo riferimento riconducibile al attuale concetto di "valle" risale al 5 luglio 1425 (deliberazione in Rogadis del Consiglio dei Pregadi della Repubblica di Venezia, in cui si fa cenno alla *clausura valium*). Quest'attività si è poi venuta ad affermare con Repubblica Veneta a partire dal 1515-1520, ed è rimasta sostanzialmente invariata fino agli anni 1950-1960. Inizialmente esistevano solo "valli aperte", parte integrante del sistema lagunare e caratterizzate da bassi fondali costantemente coperti dall'acqua, dove venivano esercitati diritti esclusivi di pesca. Il passaggio successivo fu la chiusura temporanea di queste aree lagunari con sbarramenti fatti di pali di legno e "grasiole" (lo stelo della cannuccia comune, *Phragmites*). Gli sbarramenti di grasiole permettevano la montata naturale degli avannotti mentre impedivano l'uscita dei pesci una volta cresciuti. Questi spazi lagunari così delimitati furono chiamati prima "acque chiuse" o "piscariae" e poi, a partire dal XV secolo, "valli" o "valli da pesca" (Bullo, 1940). La circolazione dell'acqua all'interno delle valli delimitate da graticci di grasiole, chiamate "valli a serraglia" o "seragia", avveniva in modo naturale e quindi la qualità della stessa era ottima; questo tipo di sbarramento però, a causa della sua fragilità e della scarsa altezza, poteva rompersi in particolari condizioni di forti maree e di burrasche improvvise, con la conseguente perdita di tutto il pesce stabulato che poteva così liberamente tornare al mare. Il passo successivo fu quindi lo sviluppo delle cosiddette "valli semiarginate", dove la parte sopravvento era chiusa da argini in terra mentre quella sottovento era ancora delimitata da sbarramenti a grasiole. In questa fase la valle da pesca non è più considerata solamente un'area di pesca, ma un'area da gestire nella quale in inverno il pesce sottotaglia viene mantenuto nelle "peschiere di sverno" (canali relativamente stretti e profondi, collocati sottovento) per poi essere

reimpresso nei bacini vallivi nella primavera successiva. A questo punto la produttività delle valli da pesca non è più affidata alla sola montata naturale, parzialmente impedita dalla stessa chiusura degli spazi lagunari, ma dipende dalle semine di avannotti catturati in laguna dai pescenovellanti, ovvero da pescatori specializzati nella pesca, nel trasporto e nel mantenimento in vivo del “pesce novello” (Voltolina, 1894a, 1894b; Bullo, 1891, 1940). Oltre alle peschiere di sverno, compare nelle valli la “peschiera” o “seragio per il pesce novello”, labirinto di fossi comunicante con il resto della valle per mezzo di chiaviche, dove i piccoli pesci vengono fatti acclimatare alle condizioni vallive prima di essere immessi nel “lago di valle”. L’ultima fase evolutiva delle valli venete sono le “valli arginate o a stagno”, totalmente

chiuse mediante argini e comunicanti con la laguna grazie a delle chiaviche che permettono di governare il regime dell’acqua in entrata o in uscita dalla valle (Bullo, 1891, 1940).

La vallicoltura è rimasta, sostanzialmente, quella delle origini, sia per la sua struttura come per il suo funzionamento e la sua produttività; un sistema di piscicoltura strettamente correlato all’approvvigionamento di novellame derivante dalla pesca e biologicamente dipendente dall’ambiente marino. Con la grande alluvione del Po del 1951 si è assistito ad un evento pesantemente traumatico per le valli del Delta ricadenti tra l’Adige e il Po di Maistra (5200 ettari, circa), ma si è trattato soprattutto un segnale di distacco dal passato. Dopo l’alluvione ci si rese infatti conto della rapida subsidenza del fondale del Delta del Po (si tratta di un lento e progressivo abbassamento verticale del fondo di un bacino marino). Al termine degli anni '50 le valli del Delta (fatta eccezione per quelle marginali verso l’Adige) furono costrette a una gravosa gestione idraulica affidata alle idrovore. Di conseguenza, il loro rapporto col mare mutò radicalmente. Negli anni '60-'61 una virulenta forma di parassitosi (l’infestazione da *Argulus* estesa a tutta la costa Alto-Adriatica) distrusse in pochi mesi la produzione di anguilla, caposaldo dell’economia valliva (G.Ravagnan-1988). La vallicoltura del Delta dopo questi eventi ha dovuto attivarsi in modo diverso, scollegandosi da alcune delle dipendenze con l’ambiente che la rendevano troppo assoggettata alle condizioni naturali per non scomparire.

4.4 Malattie e misure di controllo: nell'elenco seguente viene proposto un'elenco delle malattie che colpisce maggiormente l'orata. E loro diffusione e tendenza.

Patologia	Diffusione	Tendenza	Impatto Economico
Infezioni da Mixobatteri (<i>Flexibacter marittimus</i>)	++	In aumento	Basso
Pasteurellosi (<i>Photobacterium damsela subsp. piscicida</i>)	++	In diminuzione	Discreto
Vibriosi (<i>Vibrio anguillarum</i>)	++	Stabile	Basso *
Mixosporidi (<i>Myxidium leei</i> - <i>Enteromyxum leei</i>)	++	In aumento	Discreto – alto
Winter Syndrome	++	In diminuzione	Basso
Trichodina spp.	++	Stabile	Basso o nullo *
Oodinium spp.	++	In aumento	Basso – discreto *
Trematodi digenei	++	In diminuzione	Basso o nullo *

Tabella 2: principali infezioni che colpiscono l'orata in allevamento

Legenda : La diffusione viene indicata:

+ < al 10% allevamenti infetti;

++ tra il 10% e il 30% allevamenti infetti;

+++ > al 30% allevamenti infetti.

* in particolari situazioni ambientali o casi sporadici può avere un forte impatto economico (soprattutto nelle valli con allevamento semi-intensivo, estensivo).

(Corbari, Fabris 2005)

- Pasteurellosi; malattia ad eziologia batterica sostenuta da *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, gli animali colpiti mostrano sintomi quali anoressia e necrosi focale delle branchie. Il trattamento è preventivo mediante vaccinazione di riproduttori e avannotti, si possono effettuare trattamenti con immunostimolanti, vitamine ed eventualmente antibiotici.

Nel caso di pasteurellosi viene posta molta attenzione nella qualità e l'igiene della fonte tramite cui l'allevamento si approvvigiona di acqua.

- Vibriosi; gruppo di malattie sostenute da batteri diversi che danno origine a sindromi differenti: la prima è la vibriosi da *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* che si manifesta con imbrunimento cutaneo, letargia, distensione dell'addome, emorragie. I trattamenti che vengono applicati sono l'eliminazione di mangimi molto ricchi in lipidi ed eventualmente l'impiego di antibiotici.
- Vibriosi sostenuta dal batterio *Vibrio alginolyticus*, la sindrome molto simile alla precedente si manifesta nell'orata con aumento del pigmento melanico cutaneo e lesioni cutanee nonché dalla presenza di emorragie. I trattamenti che vengono generalmente applicati riguardano anche in questo caso l'igiene dell'acqua e l'impiego di antibiotici.
- Vibriosi sostenuta dal batterio *Vibrio anguillarum*; nel caso di infezione da parte di questo patogeno si assiste a letargia, anoressia e stazione alterata con testa mantenuta verso il fondo. Anche in questo caso si interviene con il controllo dell'igiene dell'acqua e l'utilizzo di antibiotici.

- Linfocistis, infezione sostenuta da *Iridoviridae*, determina l'insorgenza di una lesione pseudo tumorale biancastra. I trattamenti riguardano il management dell'allevamento, si interviene riducendo la somministrazione di cibo, la biomassa presente, riducendo lo stress sui pesci colpiti. Non esiste un trattamento.

- Aquareovirus, sostenuta da *Aquareovirus*, l'infezione non si manifesta con sintomi, è un'infezione a bassa patogenicità per la quale non esiste trattamento.

- Sindrome dell'intestino disteso (DGS) è sostenuta da una particella simil-virale, la sindrome si manifesta con addome disteso, nuoto in circolo atassico, immobilità con la testa puntata in basso. Per controllare questa sindrome viene irraggiata l'acqua che viene immessa in allevamento e gli stadi larvali con raggi UV.

- Enteriti parassitarie sostenute da *Myxidium leei*, i sintomi più evidenti sono letargia, addome disteso, iperpigmentazione. Non esiste trattamento, l'unica misura di controllo è l'eliminazione delle fonti di stress dall'allevamento.

- *Winter Disease*: con questo termine si descrive una sindrome metabolica che appare nel periodo invernale ed alla quale non è stato ancora possibile associare un agente eziologico. L'incidenza di tale patologia varia di anno in anno e da zona a zona, ma si presenta comunque in maniera ricorrente ogni inverno, in modo particolare nelle aree in cui la temperatura dell'acqua scende al di sotto della soglia degli 11-12°C. Segnalazioni di episodi di *Winter Disease* sono frequenti lungo le coste settentrionali di Italia, Spagna, Grecia, ed inoltre Croazia, Creta, Malta, e nelle coste meridionali di Spagna e Portogallo. In alcuni allevamenti l'incidenza di mortalità ha raggiunto il 30% (Domenech et al. 1997) ed in taluni casi percentuali anche del 60% (Ravarotto et al., 2005) con conseguenti danni economici ingenti. L'ipotesi più accreditata ritiene che la *Winter Disease* derivi da uno stato di immunodepressione che consente l'infezione degli animali da parte di patogeni opportunistici, quali ad esempio *Pseudomonas anguilliseptica*. Un esame dei principali indicatori dell'attività del sistema immunitario aspecifico di orate colpite dalla sindrome ha, infatti, dimostrato una evidente depressione della maggior parte di essi: l'attività del complemento, quella del lisozima del plasma e l'agglutinazione sono tutte apparse ridotte, come pure è apparso diminuito il numero dei linfociti circolanti (Padros et al., 1996; Tort et al., 1998). Le cause precise di questo stato di immunodepressione non sono ancora del tutto chiare. Per quanto la risposta immunitaria non specifica possa essere attiva anche a temperature inferiori a 15°C e nonostante le proteine del complemento lavorino efficacemente anche a temperature inferiori a tale valore (Sunyer e Tort, 1995), Bly e Clem(1998) hanno suggerito, a questo proposito, che la temperatura possa influenzare l'adattamento omeoviscoso delle membrane dei linfociti, osservando anche un aumento degli acidi grassi polinsaturi nei fosfolipidi dei linfociti medesimi, dei trombociti e degli eritrociti, nonché un blocco dell'attivazione delle cellule-T. Oltre all'effetto diretto della temperatura, lo stress può essere ritenuto un fattore aggravante, determinando, come è noto, una generale depressione della risposta immunitaria (Wedemeyer, 1996). L'importanza dello stress sembra essere confermata dalle osservazioni che evidenziano una maggior incidenza della *Winter Disease* in condizioni di elevata densità di allevamento. Un ultimo fattore da considerare tra le possibili cause della mortalità è certamente la ridotta ingestione di alimento da parte dell'orata nei mesi invernali. Questa riduzione del livello alimentare

può a sua volta comportare un inadeguato bilancio energetico e deficienze nella sintesi delle molecole responsabili della funzione immunitaria (Gatlin, 2002). Nel periodo invernale, infatti, l'ingestione giornaliera può ridursi allo 0,1-0,2% del peso corporeo e scendere ulteriormente fino ad includere dei periodi di digiuno, contro valori del periodo estivo del 2-4% del peso corporeo. Ne consegue che in questo periodo si possono verificare carenze di alcuni nutrienti, le quali possono risultare più gravi nel caso in cui la dieta sia inadeguata o non bilanciata accuratamente, come sembra confermato da osservazioni istopatologiche effettuate su orate affette da *Winter Disease* che suggeriscono, appunto, possibili problemi di carenza nutrizionale (Tort et al.1998) per cui, a volte, la morte sopraggiunge per deplezione lipidica. In effetti, una strategia piuttosto diffusa nella pratica per combattere la sindrome in esame consiste nel ridurre le razioni e nel ricorrere ad alimenti a bassa densità energetica, con l'obiettivo di non forzare il metabolismo dell'animale in una fase critica per il normale svolgimento delle funzioni fisiologiche. Tale strategia non consente, però, di evitare carenze di alcuni nutrienti essenziali, portando inoltre a perdite di peso e a conseguenti elevatissime conversioni alimentari. Precedenti studi in condizioni di laboratorio hanno dimostrato il ruolo dell'alimentazione nello sviluppo di alcune manifestazioni correlate alla *Winter Disease* nell'orata (Coutteau et al.2000; Verstrate et al., 2009) e hanno consentito di verificare l'efficacia di un approccio nutrizionale al problema delle condizioni di allevamento a terra (Coutteau et al.2001). Nonostante sia ancora sconosciuta l'eziologia specifica di questa patologia, è importante sottolineare come sia stato possibile individuare alcuni fattori che ne favoriscono l'insorgere e concorrono a determinare il carattere polifattoriale della *Winter Disease*. Questi fattori sono: l'immunodepressione (la temperatura pare influenzare l'adattamento omeoviscoso delle membrane linfocitarie), in cui va annotata la capacità di adattamento del pesce alle basse temperature; sembra infatti che lo stato immunitario peggiore si abbia nelle ore seguenti ad un brusco calo di temperatura (Bly e Clem,1991) mentre i caratteri esaminati per valutare le difese immunitarie (attività fagocitaria ed endocitaria) si mantengono a livelli buoni in pesci che hanno raggiunto basse temperature in un tempo tale da consentirgli di adattarsi (Plytycz e Jurewicz 1994). Oltre all'effetto diretto della temperatura vi è lo stress propriamente detto, inteso come continuo e continuato stato di attivazione degli assi ipofisi-tessuto interrenale e simpatico- cellule cromaffini che possono influire negativamente sullo stato immunitario dei soggetti (Pickering e Stewart,1984; Mazur e Iwama 1993). Il terzo ed ultimo dei fattori presi in esame è la ridotta ingestione di cibo e, connesso ad esso, lo

sbilibrio energetico e l'impossibilità di sintetizzare molecole per la funzione immunitaria.
Alla base di ognuno dei fattori predisponenti di questa patologia vi è la bassa temperatura.

5.MATERIALI E METODI

Nell'ambito del progetto S.E.A.C.A.S.E. (*Sustainable Extensive and Semi-intensive Coastal Aquaculture in Southern Europe*) è stato condotto l'esperimento task 2.3 presso la valle da pesca "valle Bonello" sita in provincia di Rovigo, per studiare la risposta adattativa allo stress da basse temperature nell'orata (*S. aurata*), con uno studio di genomica funzionale.

Sono state preparate sei vasche in vetroresina di forma cilindrica, ciascuna contenente circa 250 esemplari di *Sparus aurata* del peso compreso tra i 78 e i 283 grammi e di lunghezza compresa tra i 16,6 e i 27,2 cm. In quattro delle vasche allestite sono stati stabulati a digiuno per il periodo dell'esperimento (dicembre 2007 - marzo 2008) orate di provenienza da uno stock di valle Bonello. Nelle altre due sono state stabulate per l'intero periodo dell'esperimento orate provenienti dalla Sicilia.

Per quanto riguarda le orate di valle Bonello, tutti i pesci sono stati mantenuti a digiuno. Nelle due vasche di controllo la temperatura è stata mantenuta a 16°C, mentre in quelle sperimentali è stata abbassata prima a 12°C e poi a 7°C. A questa temperatura le orate non si alimentano. Per quanto riguarda le orate di provenienza siciliana, nella vasca di controllo è stata mantenuta una temperatura costante di 16°C e gli animali sono stati costantemente alimentati, mentre nell'altra vasca la temperatura è stata progressivamente ridotta fino ad arrivare a 7°C e i pesci mantenuti a digiuno.

5.1 Protocollo del campionamento:

FASE 1 (durata di 30 giorni)	FASE 2 (durata di 7 giorni)	FASE 3 (durata di 28 giorni)
Periodo di acclimatamento, in tutte le vasche la temperatura dell'acqua è stata mantenuta attorno a 16°C	La temperatura è stata progressivamente abbassata fino a 12°C	La temperatura è portata fino a 7°C ed è mantenuta costante per tutto il periodo dell'esperimento
Al termine di questa fase è stato effettuato un precampionamento	Al termine di questa fase è stato effettuato il primo campionamento (T0)	In questa fase sono stati effettuati campionamenti a 6 ore, 12 ore, 24 ore, 36 ore, 3 giorni, 7 giorni, 14 giorni, 21 giorni, 28 giorni (T1, T2, T3, T4, T5, T6, T7, T8).

Tabella 3 protocollo del campionamento

Per quanto riguarda le orate di valle Bonello in ogni fase del protocollo sono stati campionati 10 esemplari per ogni vasca dei trattati (in totale 20 esemplari) e 10 esemplari per ogni vasca dei controlli (in totale 20 esemplari).

Per quanto riguarda le orate provenienti dalla Sicilia sono stati raccolti i campioni di tessuto da 8 esemplari per vasca per ogni prelievo previsto dal protocollo.

Ogni gruppo di orate campionate da una vasca è stato trasferito in un recipiente contenente acqua salata e tricaina metansolfonato MS-222 (250mg/l) per l'eutanasia⁴.

Le analisi e la raccolta dei campioni hanno seguito quattro differenti indirizzi:

- misure biometriche
- prelievo di sangue per valutare profilo endocrino, metabolico e immunitario
- prelievo di campioni per l'istologia
- prelievo di campioni di branchie, fegato, milza e rene cefalico per l'analisi genetica.

⁴ Si tratta di un rilassante muscolare che opera prevenendo la formazione di potenziali d'azione. Con l'annullamento di questi potenziali, nessun segnale può essere scambiato tra il sistema nervoso centrale e le estremità; vengono escluse le informazioni sensoriali e i comandi motori, bloccando il muscolo.

Per ogni esemplare sono state effettuate le misure biometriche (il peso e la lunghezza) ed è stato fatto un prelievo di sangue per poter valutare :

- il profilo endocrino misurando il cortisolo
- il profilo metabolico valutando gli elettroliti, l'osmolalità, il glucosio, il lattato, i NEFA, le proteine totali
- il profilo immunitario analizzando i livelli di attività del complemento plasmatico, del lisozima e del *respiratory burst* (reazione cellulare che prevede il rapido rilascio di specie reattive dell'ossigeno) dei fagociti del sangue.

Di ogni esemplare, sono stati raccolti campioni di milza, fegato e branchie, conservati in RNA-later per poter estrarre successivamente l'RNA ed effettuare l'analisi di espressione genica.

Per 30 esemplari, dieci campioni a T3, T7, T8 sono stati raccolti campioni per l'esame anatomoistopatologico di cute e rene cefalico.

5.2 CAMPIONI:

5.2.1- Microarray technology: a partire dai campioni conservati in RNA-later, sono stati estratti gli RNA dei singoli esemplari e, successivamente, sono stati organizzati dei *pool* per gli individui campionati dalle vasche numero 4 e 6 rispettivamente contenenti individui sottoposti alle basse temperature e controllo a T1 (6 ore), T2 (12 ore), T3 (24 ore), T7 (21 giorni). Essendo campionati da ogni vasca 10 esemplari i pool A e B erano costituiti da 3 individui mentre il C da 4. Pool fegato:

	V4 (7°C)			V6 (16°C)		
T1	Fe T1 A v4	Fe T1 B v4	Fe T1 C v4	Fe T1 A v6	Fe T1 B v6	Fe T1 C v6
T2	Fe T2 A v4	Fe T2 B v4	Fe T2 C v4	Fe T2 A v6	Fe T2 B v6	Fe T2 C v6
T3	Fe T3 A v4	Fe T3 B v4	Fe T3 C v4	Fe T3 A v6	Fe T3 B v6	Fe T3 C v6
T7	Fe T7 A v4	Fe T7 B v4	Fe T7 C v4	Fe T7 A v6	Fe T7 B v6	Fe T7 C v6

Tabella 4: Pool di fegato

Fe: fegato

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

A,B,C: nomi dei *pool*

T1,T2,T3,T7: tempi in cui sono stati prelevati i campioni, rispettivamente 6 ore,12 ore, 24 ore, 21 giorni

Pool branchie:

	V4 (7°C)			V6 (16°C)		
T1	Br T1 A v4	Br T1 B v4	Br T1 C v4	Br T1 A v6	Br T1 B v6	Br T1 C v6
T2	Br T2 A v4	Br T2 B v4	Br T2 C v4	Br T2 A v6	Br T2 B v6	Br T2 C v6
T3	Br T3 A v4	Br T3 B v4	Br T3 C v4	Br T3 A v6	Br T3 B v6	Br T3 C v6
T7	Br T7 A v4	Br T7 B v4	Br T7 C v4	Br T7 A v6	Br T7 B v6	Br T7 C v6

Tabella 5: Pool di branchie

Br: branchie

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

A,B,C: nomi dei *pool*

T1,T2,T3,T7: tempi in cui sono stati prelevati i campioni, rispettivamente 6 ore,12 ore, 24 ore, 21 giorni

5.2.2- Real Time RT-PCR: per questa analisi sono stati utilizzati i campioni di branchia di tutti gli individui delle vasche V4 e V6 per T1 e T7.

Br	V4 (7°C)					V6 (16°C)				
T1	I T1 v4	II T1 v4	III T1 v4	IV T1 v4	V T1 v4	I T1 v6	II T1 v6	III T1 v6	IV T1 v6	V T1 v6
	VI T1 v4	VII T1 v4	VIII T1 v4	IX T1 v4	X T1 v4	VI T1 v6	VII T1 v6	VIII T1 v6	IX T1 v6	X T1 v6
T7	I T7 v4	II T7 v4	III T7 v4	IV T7 v4	V T7 v4	I T7 v6	II T7 v6	III T7 v6	IV T7 v6	V T7 v6
	VI T7 v4	VII T7 v4	VIII T7 v4	IX T7 v4	X T7 v4	VI T7 v6	VII T7 v6	VIII T7 v6	IX T7 v6	X T7 v6

Tabella 6: campioni analizzati con Real Time RT-PCR

Br: branchie

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

T1, T7: tempi in cui sono stati prelevati i campioni, rispettivamente 6 ore, 21 giorni

I-X: singoli individui analizzati

5.2.3- Istopatologia: i prelievi effettuati per l'esame istopatologico riguardavano tessuti di cute e rene cefalico durante l'arco dell'esperimento per 4 tempi: T3, T5, T6, T7. Il tessuto della cute è stato prelevato dalla porzione adiacente alla pinna ventrale comprendendola. Questo campione è stato parcellizzato ottenendo per ogni esemplare 2 porzioni di tessuto da analizzare : una comprendente la pinna e una senza. Per ogni esemplare quindi sono stati analizzati 3 vetrini: il

primo con una sezione di rene cefalico, il secondo con una sezione di cute e il terzo con una sezione di cute e pinna. Per ogni tempo sono stati campionati 10 esemplari, 5 provenienti dalla vasca 4 (trattati) e 5 dalla vasca 6 (controlli).

Rene Cefalico

	V4 (7°C)					V6 (16°C)				
T3	I 1 v4 RC	I 2 v4 RC	I 3 v4RC	I 4 v4 RC	I 5 v4 RC	I 1 v6RC	I 2 v6RC	I 3 v6RC	I 4 v6RC	I 5 v6RC
T5	II 1 v4 RC	II 2 v4 RC	II 3 v4 RC	II 4 v4 RC	II 5 v4 RC	II 1 v6 RC	II 2 v6RC	II 3 v6RC	II 4 v6RC	II 5 v6RC
T6	III 1 v4 RC	III 2 v4 RC	III 3 v4 RC	III 4 v4 RC	III 5 v4 RC	III 1 v6 RC	III 2 v6RC	III 3 v6RC	III 4 v6RC	III 5 v6RC
T7	IV 1 v4 RC	IV 2 v4 RC	IV 3 v4 RC	IV 4 v4 RC	IV 5 v4 RC	IV 1 v6 RC	IV 2 v6RC	IV 3 v6RC	IV 4 v6RC	IV 5 v6RC

Tabella 7: campioni di rene cefalico per l'istologia

RC: rene cefalico

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

T3, T5, T6, T7: tempi in cui sono stati prelevati i campioni, rispettivamente 24 ore, 7 giorni, 14 giorni, 21 giorni.

I-IV: numero del campionamento

1-5: numero progressivo riferito al singolo individuo campionato

Cute

	V4 (7°C)					V6 (16°C)				
T3	I 1 v4 C	I 2 v4 C	I 3 v4 C	I 4 v4 C	I 5 v4 C	I 1 v6 C	I 2 v6 C	I 3 v6 C	I 4 v6 C	I 5 v6 C
T5	II 1 v4 C	II 2v4 C	II 3 v4 C	II 4 v4C	II 5 v4 C	II 1 v6 C	II 2 v6 C	II 3 v6 C	II 4 v6 C	II 5 v6 C
T6	III 1 v4 C	III 2 v4 C	III 3 v4 C	III 4v4 C	III 5 v4C	III 1 v6 C	III 2 v6 C	III 3 v6 C	III 4 v6 C	III 5 v6 C
T7	IV 1 v4 C	IV 2 v4 C	IV 3 v4C	IV 4 v4C	IV 5 v4 C	IV 1 v6 C	IV 2 v6 C	IV 3 v6 C	IV 4 v6 C	IV 5 v6 C

Tabella8: campioni di cute per l'istologia

C: cute

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

T3, T5, T6, T7: tempi in cui sono stati prelevati i campioni, rispettivamente 24 ore, 7 giorni, 14 giorni, 21 giorni.

I-IV: numero del campionamento

1-5: numero progressivo riferito al singolo individuo campionato

Cute con Pinna

	V4 (7°C)					V6 (16°C)				
T3	I 1 v4 P	I 2 v4 P	I 3 v4 P	I 4 v4 P	I 5 v4 P	I 1 v6 P	I 2 v6 P	I 3 v6 P	I 4 v6 P	I 5 v6 P
T5	II 1 v4 P	II 2 v4P	II 3 v4 P	II 4 v4 P	II 5 v4 P	II 1 v6 P	II 2 v6 P	II 3 v6 P	II 4 v6 P	II 5 v6 P
T6	III 1 v4 P	III 2 v4 P	III 3 v4 P	III 4 v4 P	III 5 v4 P	III 1 v6 P	III 2 v6 P	III 3 v6 P	III 4 v6 P	III 5 v6 P
T7	IV 1 v4 P	IV 2 v4 P	IV 3 v4 P	IV 4 v4 P	IV 5 v4 P	IV 1 v6 P	IV 2 v6 P	IV 3 v6 P	IV 4 v6 P	IV 5 v6 P

Tabella 9: campioni di cute con pinna per l'istologia

P: pinna con porzione di cute

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

T3, T5, T6, T7: tempi in cui sono stati prelevati i campioni, rispettivamente 24 ore, 7 giorni, 14 giorni, 21 giorni.

I-IV: numero del campionamento

1-5: numero progressivo riferito al singolo individuo campionato

Inoltre al termine dell'esperimento, nella fase di *recovery*, in cui la temperatura è stata riportata a 16°C, sono stati campionati ulteriori tessuti (branchie, epatopancreas, milza, rene cefalico, rene caudale) da 3 soggetti controllo e 3 soggetti trattati.

T8	V4 (7°C)			V6 (16°C)		
Rene caudale	v4 T8-1 Rca	v4 T8-2 Rca	v4 T8-3 Rca	v6 T8-1 Rca	v6 T8-2 Rca	v6 T8-3 Rca
Rene cefalico	v4 T8-1 Rce	v4 T8-2 Rce	v4 T8-3 Rce	v6 T8-1 Rce	v6 T8-2 Rce	v6 T8-3 Rce
Epatopancreas	v4 T8-1 Fe	v4 T8-2 Fe	v4 T8-3 Fe	v6 T8-1 Fe	v6 T8-2 Fe	v6 T8-3 Fe
Branchie	v4 T8-1 Br	v4 T8-2 Br	v4 T8-3 Br	v6 T8-1 Br	v6 T8-2 Br	v6 T8-3 Br
Milza	v4 T8-1 Mi	v4 T8-2 Mi	v4 T8-3 Mi	v6 T8-1 Mi	v6 T8-2 Mi	v6 T8-3 Mi

Tabella 10: campioni per l'istologia dopo *recovery*

Rca: rene caudale

Rce: rene cefalico

Fe: epatopancreas

Br: branchie

Mi: milza

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

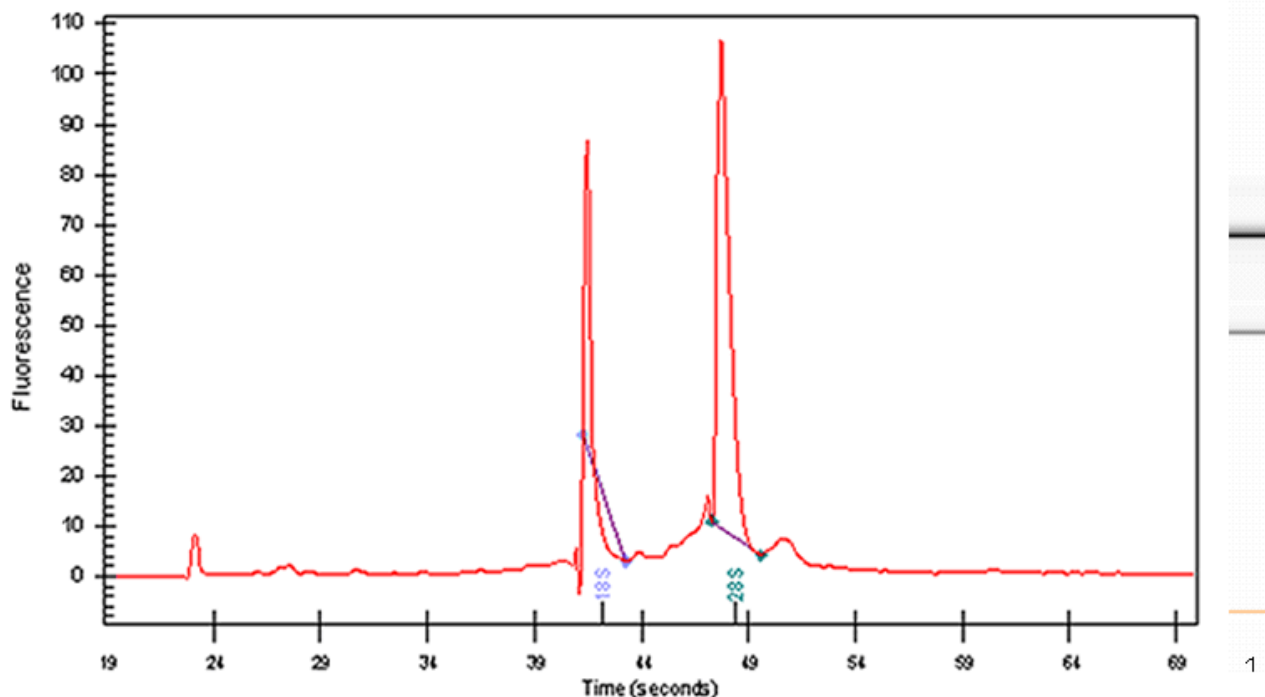
T8: tempo in cui sono stati prelevati i campioni 29 giorni, dopo *recovery*

1-3: numero progressivo riferito al singolo individuo campionato

5.3 ESTRAZIONE RNA.

E' stata effettuata utilizzando il kit RNA-easy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo le procedure indicate dal fornitore.

5.3.1 Valutazione qualitativa dell'RNA estratto: utilizzando lo strumento Agilent 2100 BioAnalyzer che permette di valutare il R.I.N (RNA Integrity Number), valore assegnato all'acido nucleico dopo averlo sottoposto ad una corsa elettroforetica su gel di agarosio. Vengono in questo modo valutate le due subunità ribosomali 18S e 28S: minore è l'area all'interno dei due picchi e migliore è la qualità del campione. E' un valore che varia da 0 a 10, e per poter sottoporre un campione ad analisi con Microarray Technology è necessario che il suo R.I.N sia $\geq 7,5$.



⁵Figura 8: grafico fluorescenza vs tempo e corsa elettroforetica di campione di RNA ottenuta da BioAnalyzer

5.3.2 Valutazione quantitativa: effettuata tramite quantificazione spettrofotometrica al NanoDrop® (ND 1000 NanoDrop Technologies, Wilmington, USA), che permette di analizzare volumi piccoli di un campione (1 µl).

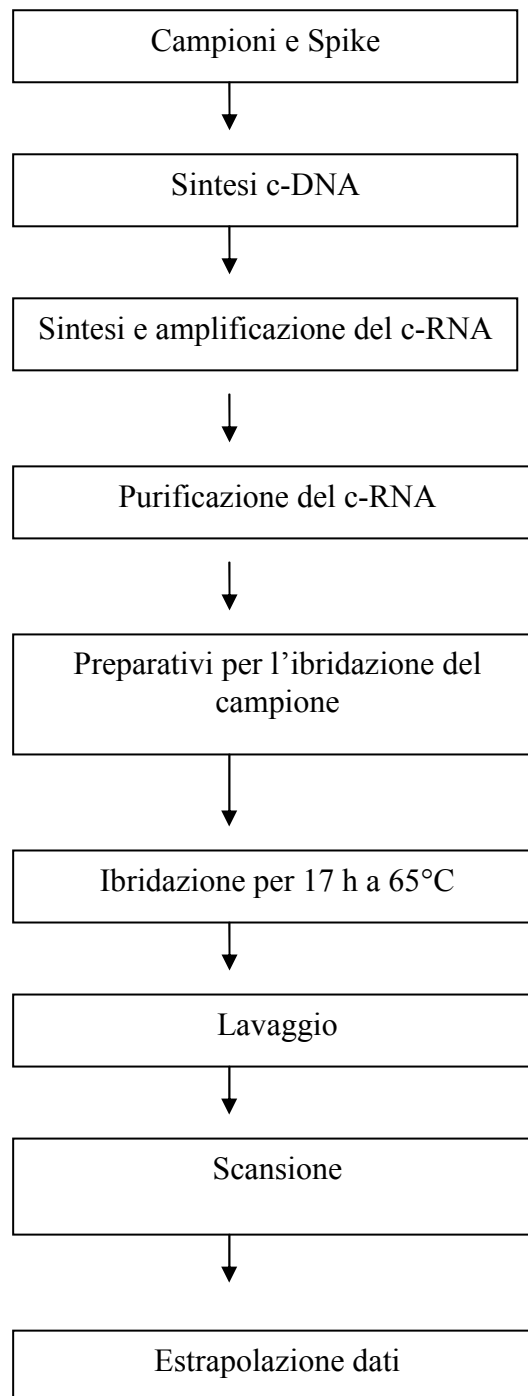
5.3.3 Allestimento dei pool: i singoli campioni, una volta estratto l'RNA e confermato il loro corretto stato qualitativo e quantitativo con le metodiche sopra spiegate, sono stati raggruppati in pool di 3-4 individui per sottoporli all'analisi con Microarray Technology. Lo scopo di tale operazione è stato quello di eliminare la variabilità individuale nell'analisi dell'espressione genica e contenere i costi dell'analisi. Per ogni vasca ad ogni tempo analizzato sono stati preparati 3 pool, di cui 2 composti da 3 esemplari e 1 da 4 esemplari. La concentrazione finale di acido ribonucleico analizzato è stata di 200 ng/µl.

⁵ Come si può notare nella figura 8, oltre al grafico dove viene rilevata la fluorescenza delle due subunità 18S e 28S in funzione del tempo è anche presente la corsa elettroforetica sul gel di agarosio. In questo esempio specifico è possibile notare la netta distinzione tra le bande, segno di una buona qualità dell'RNA. Al contrario, se il campione fosse degradato sarebbe possibile notare nel grafico fluorescenza vs tempo una curva senza la presenza dei picchi ben definiti e nella corsa elettroforetica la presenza di uno "smear" o striscio.

5.4 MICROARRAY TECHNOLOGY

Per l'analisi *Microarray* sono stati utilizzati vetrini 4 x 44k custom array, su cui sono spottate 19732 ESTs ottenute da una *library* di cDNA di orata. Per assicurare un controllo interno nelle analisi è stata aggiunta una miscela di RNA virali (*spike*) a concentrazioni scalari, per poter valutare alla fine dell'analisi che sia stata mantenuta la linearità tra il valore di fluorescenza e la quantità di RNA di partenza.

Diagramma di flusso del procedimento:



- I processi di marcatura e ibridazione sono stati eseguiti utilizzando il kit Agilent One Color Cy3
- Per la scansione delle piattaforme è stato utilizzato Agilent G2565BA DNA microarray scanner.
- Per l'estrapolazione dei dati è stato usato il Feature Extraction Software 9.5.1, il cui risultato è un *Quality Control Report*.
- I dati ottenuti sono stati normalizzati con la *Cyclic Lowess Normalization* usando il software R 2.6.1.

- L'analisi successiva è stata effettuata con SAM (*Significance Analysis Microarray*) e TMeV (*TIGR Multi experiment Viewer*).

Il risultato di queste analisi ha permesso di ottenere una lista di geni differenzialmente espressi tra i controlli e gli animali sottoposti alle basse temperature.

5.5 ANALISI BIOINFORMATICA

Dalla lista dei geni differenzialmente espressi ottenuta dalle analisi con *Microarray Technology* sono stati selezionati quattro geni differenzialmente espressi (MDH, PGK-1, B-cell, SOD). Per i primi due erano stati già disegnati i *primer* presso il nostro gruppo di ricerca; per gli altri due si è proceduto alla costruzione dei *primer* allineando la *query* di *Sparus aurata* con le sequenze di altre specie vicine dal punto di vista filogenetico (*Oryzias latipes*, *Ephippion guttifer*, *Gasterosteus aculeatus*, *Sphoeroides maculatus*) di cui è stato sequenziato l'intero genoma. L'allineamento è stato effettuato con il software UCSC *Genome Browser* per individuare le giunzioni esone-introne che si assume siano conservate tra le diverse specie, per poter disegnare i primer ed evitare l'amplificazione di DNA genomico.

Il disegno dei primer è stato effettuato utilizzando il software Primer3.

Gene	Sequenza	Lunghezza amplicone (bps)	Tm (°C)
SAPD25133 B-cell For	AAAGATGACATTA AAAAGGTCCTG	105	57.86
SAPD25133 B-cell Rev	CACCCACTTGAATATaCGTAAGGA	105	59.35
SAPD22939 SOD	ACtCTCAgTGGgCccttgT	106	59.70
SAPD22939 SOD	CGTTGCCcGTCTTTAGACTC	106	59.88

Tabella 11: primer costruiti per i geni SOD e B-cell

For: *Primer forward*

Rev: *Primer reverse*

Tm: temperatura di appaiamento

5.6 REAL TIME RT- PCR

5.6.1 Retrotrascrizione: per poter svolgere le analisi in Real Time RT-PCR è stato retrotrascritto 1 µg di RNA a cDNA utilizzando l'enzima virale Superscript II (Invitrogen™). Il campione da retrotrascrivere è costituito da un volume di campione tale da contenere 1 µg di RNA diluito con acqua fino a raggiungere un volume di 10 µl.

→ Al campione è stata aggiunta la prima miscela composta da 1 µl di Random esameri e 1 µl di dNTPs alla concentrazione 10mM.

→ Successivamente all'aggiunta della prima mix il campione viene messo nel termociclatore seguendo il programma SSRII per 5 minuti, non appena la temperatura raggiunge i 25 °C i campioni vengono messi in ghiaccio e viene aggiunto l'enzima RNasi OUT.

→ E' stata allestita la seconda miscela della reazione che comprende DTT 2µl, 5x Buffer 4µl, RNasi OUT 1µl per raggiungere il volume totale di 7 µl per ogni campione

→ Il campione riposizionato nel termociclatore viene riportato a una temperatura di 25°C, a questo punto viene aggiunto 1 µl di retrotrascrittasi e il programma del termociclatore prosegue.

→ per altri 10 minuti la temperatura è mantenuta a 25°C e poi viene innalzata a 41°C per i successivi 50 minuti.

5.6.2 Real time RT PCR:

Le tecniche di Real Time PCR costituiscono un significativo miglioramento dei vari metodi di amplificazione e quantificazione di acidi nucleici. La PCR tradizionale (*endpoint*), infatti, è solo qualitativa poiché, per poterli visualizzare, gli amplificati vengono fatti correre su un gel di agarosio ed etidio bromuro mediante elettroforesi e successivo irraggiamento UV. L'etidio si intercala in modo aspecifico nella doppia elica di DNA, perciò l'intensità delle bande non è una misura precisa della quantità di acido nucleico presente.

A differenza della PCR convenzionale, la Real Time PCR permette di monitorare l'andamento dell'amplificazione durante il processo e non al suo termine, misurando, quindi, la quantità di acido nucleico durante ogni ciclo di amplificazione. E' possibile monitorare la reazione di PCR durante la fase esponenziale, in cui l'aumentare dei prodotti di PCR è correlato in modo lineare con l'andamento della fluorescenza misurato dallo strumento.

5.6.3 Lo strumento:

La reazione di amplificazione è stata condotta su LightCycler 480 (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). Esso è composto da:

- un termociclatore che può ospitare piastre da 96 pozzetti
- una lampada allo xeno ad alta intensità
- un sensore che rileva l'intensità luminosa del campione mentre viene irraggiato.

Dalla fonte luminosa vengono emesse delle radiazioni elettromagnetiche che, dopo essere state selezionate da un filtro, irraggiano il pozzetto che contiene il campione. Nel pozzetto oltre al campione è contenuto il fluoroforo, cioè una molecola che irraggiata si eccita e diviene fluorescente. L'intensità delle fluorescenze emesse da ciascun pozzetto vengono captate e registrate dalla camera ogni 7 secondi.

Lo strumento utilizzato è dotato di un software dedicato (Roche Applied Science's LightCycler® Software) che permette di impostare i vari tipi di reazione, settare la piastra ed infine visualizzare i risultati e svolgere diversi tipi di analisi.

I risultati della reazione vengono elaborati in un grafico, in ascissa è presente il numero di cicli della reazione, in ordinata la fluorescenza. Per effettuare la quantificazione lo strumento si avvale del valore di CP (*Crossing Point*), dato che viene poi elaborato col metodo della Derivata Seconda.

Il *Crossing Point* è quel valore di fluorescenza che identifica il numero di cicli al quale il campione diventa rilevabile dati dallo strumento. Esso inoltre è rapportato al valore della derivata seconda nel punto di massimo, in tal modo è possibile discernere tra amplificazioni che hanno lo stesso Ct (threshold cycle) ma una diversa velocità di crescita della fluorescenza.

Con questa metodica è possibile effettuare due tipi diversi di quantificazioni:

- La quantificazione assoluta, nel caso in cui si calcoli il numero di copie del trascritto di interesse riferendosi ad una curva standard costruita in precedenza con campioni a titolo noto di molecola target.
- La quantificazione relativa, che descrive il cambiamento di espressione del gene *target* in un campione, relativamente ad un gene *reference* e ad un calibratore esterno.

Nel lavoro condotto si è seguita la quantificazione relativa di espressione dei geni MDH (Malato Deidrogenasi), PGK-1 (PhosphoGlucoKinasi 1), SOD (SuperOssido Dismutasi) e B-cell nei campioni di branchie (controllo e trattati) appartenenti a singoli individui, per dimostrare l'omogeneità dei *pool* analizzati con *Microarray Technology* e validarne i risultati ottenuti.

5.6.4 Curva standard

Si tratta della quantificazione assoluta effettuata su una serie di diluizioni scalari dello stesso campione.

La curva standard viene ottenuta per testare singole coppie di *primer*, per valutare l'efficienza di reazione di ogni singolo saggio (test) e il parametro R^2 all'interno del *range* dinamico.

Per disegnare la curva standard il *software* riporta nel grafico i valori di CP di ogni campione. Se l'efficienza della reazione è alta (~100%) i valori di CP sono legati nella fase esponenziale da un rapporto di correlazione lineare. In queste condizioni la curva standard è la retta di regressione su cui giacciono i vari CP.

Il parametro R^2 (coefficiente di regressione) rappresenta graficamente la distanza media dei punti dalla retta di regressione. Tanto più la distanza tra i CP e la retta di regressione diminuisce tanto più il valore del coefficiente di regressione tende ad 1.

Il *range* dinamico corrisponde all'intervallo della curva di amplificazione in cui la reazione è lineare.

Nella realizzazione di questo metodo bisogna lavorare con estrema precisione nell'effettuare le diluizioni e nell'utilizzare le pipette, perché lievi errori possono determinare visibili inesattezze nella rappresentazione grafica. La curva viene costruita riportando in grafico i valori di Ct, in funzione delle diluizioni seriali del campione a concentrazione nota di cui si vuole determinare l'efficienza. Dopo aver eseguito la regressione lineare, l'efficienza viene calcolata dalla pendenza della retta (Lekanne et al.,2002).

Noto il coefficiente angolare (q) della retta di regressione l'efficienza della reazione (E) è determinata dalla seguente equazione :

$$E=10^{-1/q}$$

I valori ottimali di pendenza della retta standard e del coefficiente di regressione sono, rispettivamente, -3,30 e 0,997. I geni preferiti come controllo endogeno, che vengono amplificati per standardizzare la quantità di RNA o DNA aggiunta alla reazione, sono geni costitutivamente espressi. Nel caso specifico è stato selezionato come reference RPL13a (*Ribosomal Protein L13a*) basandosi sui risultati di Tang (2007) e Hibbeler (2008) dove è dimostrato come questo sia uno dei geni che viene espresso in modo più costante rispettivamente in *Danio rerio* e *Gasterosteus aculeatus*

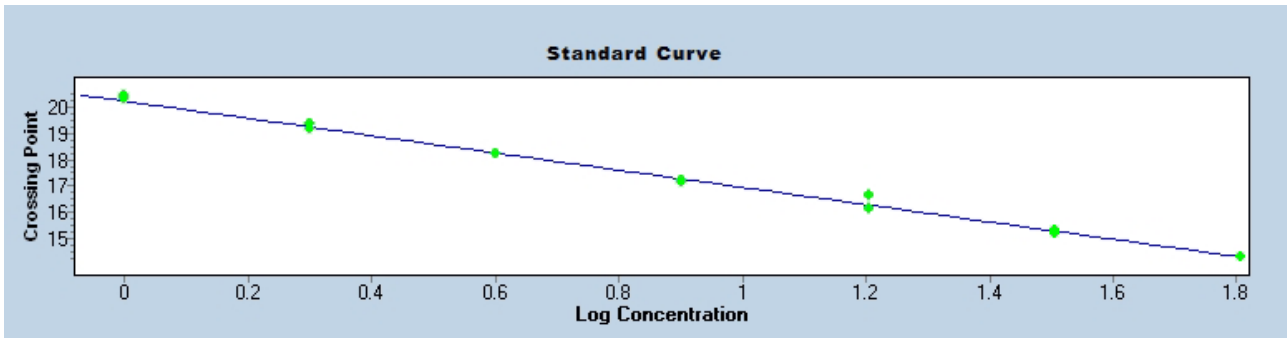


Figura 9: grafico di una curva standard, ad ogni punto corrisponde una concentrazione differente del campione.

5.6.5 Quantificazione relativa :

L'analisi di quantificazione relativa raffronta due rapporti:

- il primo rapporto tra la concentrazione della sequenza *target* e la concentrazione della sequenza *reference* del campione
- il secondo rapporto tra le concentrazioni *target* e *reference* del calibratore

Per *target* si intende il gene di interesse, mentre per *reference* si intende il gene che si conosce essere costante in tutti i campioni e che viene utilizzato come controllo endogeno. Il *reference* è usato per la normalizzazione tra campioni, mentre il calibratore è in genere un controllo positivo che ha un rapporto *target-reference* costante ed è utilizzato per normalizzare e quindi poter comparare tutti gli esperimenti come se fossero un unico esperimento.

Il risultato dell'analisi di quantificazione relativa è un rapporto normalizzato:

$$\text{Normalized Ratio} = \left(\frac{\text{Concentrazione target}}{\text{Concentrazione reference}} \right)_{\text{Campione}} \div \left(\frac{\text{Concentrazione target}}{\text{Concentrazione reference}} \right)_{\text{Calibratore}}$$

La quantificazione relativa si basa sul presupposto che la concentrazione di DNA al *crossing point* sia la medesima per ogni campione che contiene lo stesso *target*. Questa è la concentrazione di acido nucleico necessaria affinché lo strumento possa rilevarla al di fuori del “rumore di fondo” (*background noise*). Ogni campione richiede un numero di cicli differente per raggiungere il *crossing point* (CP) in dipendenza della iniziale concentrazione di DNA del campione. Alla fine dell'esperimento, la concentrazione di acido nucleico di ogni campione può variare, in dipendenza di quanti cicli di replicazione sono stati completati dopo che è stato raggiunto il CP. Questo tipo di

analisi sfrutta il CP (espresso come numero di cicli), l'efficienza della reazione, il numero di cicli completati, e altri valori per determinare di quanto sia aumentata la concentrazione di DNA di ogni campione alla fine dell'amplificazione. L'analisi usa questi calcoli per comparare i campioni e determinare i rapporti. Il rapporto finale risultante dalla normalizzazione con il calibratore è determinato dall'efficienza della PCR e dai CP.

5.6.6 Chimica di rivelazione

La chimica di rivelazione usata è il SYBRGreen. Si tratta di un colorante asimmetrico a base di Cianina. Durante la reazione di polimerizzazione si intercala in modo aspecifico nell'acido nucleico a doppio filamento e diventa luminescente. Le cianine asimmetriche hanno due gruppi aromatici contenenti azoto, uno dei quali carico positivamente, collegato tramite un legame con l'amminoacido metionina. Questo colorante non è fluorescente quando è libero in soluzione, a causa delle vibrazioni che impegnano entrambi i gruppi aromatici. Le vibrazioni sono convertite in calore che viene dissipato nella soluzione circostante. Al contrario, diventano estremamente fluorescenti quando si legano al DNA, presumibilmente perché viene limitata la possibilità di rotazione attorno al legame di metionina. (Nygren et al.,1998).

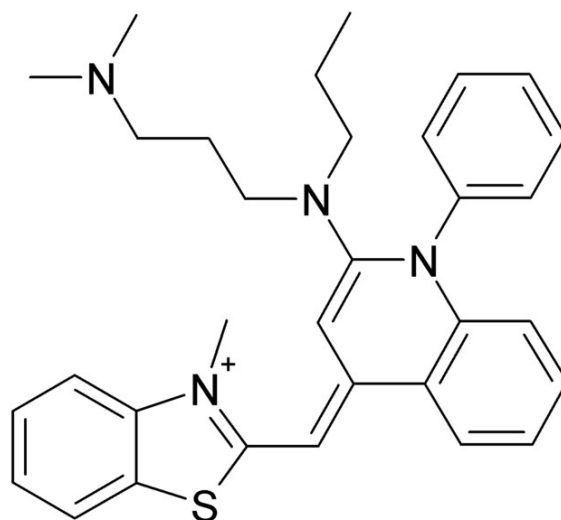


Figura 10 : molecola di cianina

5.6.7 Curva di Melting

Nella reazione di PCR la fluorescenza aumenta man mano che si formano composti a doppio filamento poiché la quantità di colorante che si intercala è maggiore.

Alcuni fattori possono influire su quanto appena affermato: in effetti la velocità con cui il colorante si intercala nel doppio filamento decresce nel corso della reazione, per cui con un alto numero di cicli la fluorescenza sarà leggermente inferiore rispetto a una previsione iniziale.

La fluorescenza del colorante dipende anche in parte dal tipo di sequenza del DNA.

Tuttavia, nonostante questi fattori possano modulare la reazione una certa quantità di doppio filamento di DNA target, in assenza di quantità significative di altri doppi filamenti di DNA, sprigiona sempre la stessa fluorescenza ogni volta.

Per questa caratteristica ripetibilità i coloranti aspecifici sono ottimi per le reazioni di Real Time PCR quantitativa quando i campioni sono raffrontati allo stesso livello di fluorescenza in assenza di altre strutture di DNA che interferiscono con la reazione.

Infatti essendo intercalanti aspecifici, le cianine aumentano la fluorescenza del campione intercalandosi in qualunque composto di DNA a doppio filamento; se si formano dimeri di primer (la cianina si intercala anche in essi) si osserva una fluorescenza che non rappresenta correttamente la reale quantità del campione esaminato. Per escludere l'errore dato da questo artefatto è buona prassi eseguire l'analisi della curva di *melting* al termine della PCR.

Man mano che la temperatura aumenta, i filamenti di DNA si separano e la fluorescenza diminuisce, poiché aumenta l'energia termica che consente una maggior capacità rotativa nel legame tra la sonda e il DNA. La fluorescenza diminuisce gradualmente fino a quando viene raggiunta la temperatura alla quale metà dei filamenti di DNA sono separati e metà sono uniti la cianina si separa e la fluorescenza diminuisce in modo estremamente rapido. Il valore di temperatura cui corrisponde questa reazione, noto come temperatura di *melting* (T_m), è determinato facilmente come il punto di massimo nella derivata prima negativa. Dal momento che i dimeri di *primer* sono tipicamente più corti che i prodotti *target*, essi si separano a temperature più basse e la loro presenza è facilmente riconosciuta nell'analisi della curva di *melting*.

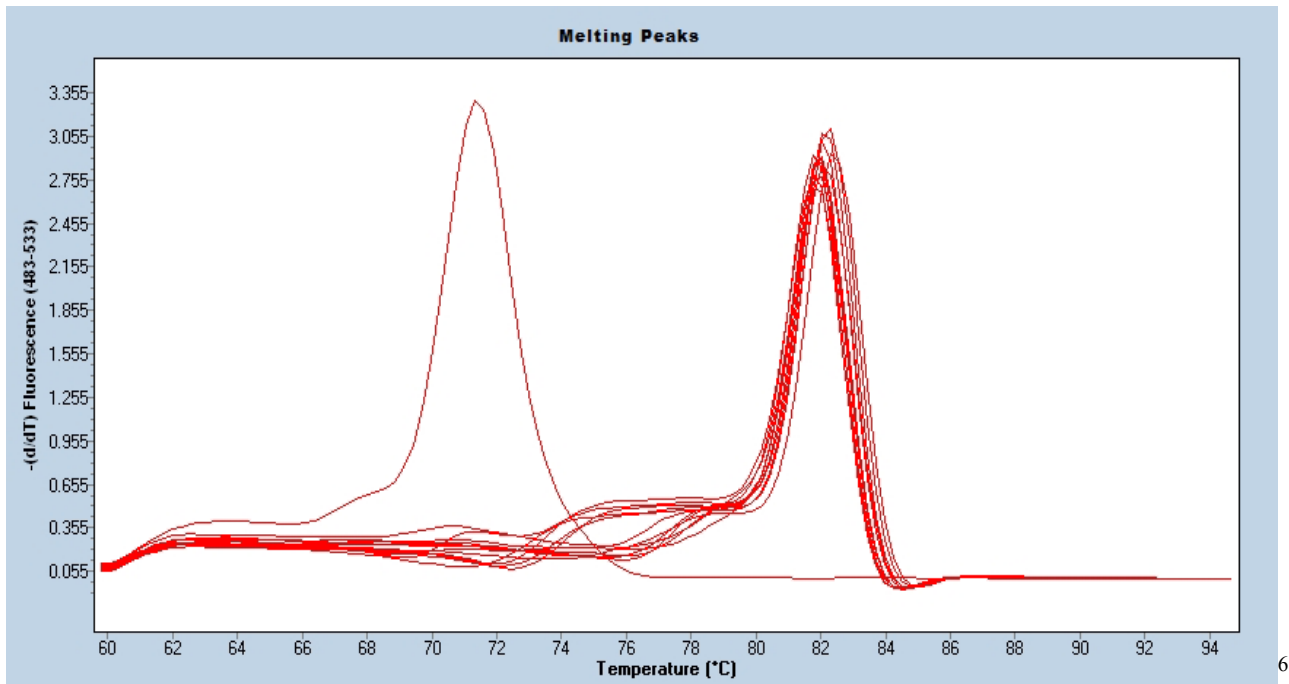


Figura 11: grafico della curva di melting

Mix per la reazione di Real Time RT-PCR :

Reagenti	Volumi
Mastermix (SYBRGreen 1)*	5 µl
Primer forward (250nM)	0,5 µl
Primer reverse (250nM)	0,5 µl
H2O	1,5 µl
c-DNA template	2,5 µl
Volume finale	10 µl

* (Invitrogen, Carlsbad, CA)

Tabella 12: miscela di reazione per Real Time RT-PCR

⁶ In questa immagine si può apprezzare il grafico della derivata prima negativa di una curva di melting in cui si può vedere l'imponente decremento di fluorescenza (che corrisponde al picco) raggiunta la temperatura di melting, quella a cui metà dei filamenti sono separati e metà uniti. Il primo picco è quello riferito al campione negativo presente nell'esperimento.

5.6.8 Analisi statistica

Sui dati di *Normalized Ratio* di ogni gene, ottenuti dall'analisi per T1 e T7 di tutti gli individui trattati e controlli con RT-PCR, è stato effettuato il *t-test*.

5.6.9 Geni analizzati in Real Time RT-PCR:

→ Geni sovra espressi:

PGK- 1 (Fosfoglicerato kinasi 1)

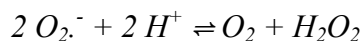
E' un enzima che interviene nella glicolisi. Esso catalizza la seguente reazione, consentendo il trasferimento del gruppo fosforico dall'1,3-bisfosfoglicerato all'ADP.



L'enzima è chiamato con questo nome per la reazione opposta a quella, esso infatti catalizza la reazione in entrambe le direzioni e agisce in quella da cui prende nome nella fissazione foto sintetica della CO₂. L'enzima è composto di due regioni collegate da un braccio flessibile. Quella superiore è preposta al legame con l'ADP; quella inferiore presenta una tasca interna per l'1,3-bisfosfoglicerato. La fosfoglicerato chinasi, concretamente, sposta il fosfato presente sull'estremità carbossilica dell'1,3-bisfosfoglicerato (in posizione 1) sull'ADP. Questo genere di processo deve avvenire in un ambiente riparato dall'esterno e dalla soluzione acquosa in cui si trova l'enzima. All'interno dell'enzima, dunque, è presente una tasca che ripara la reazione dalle eventuali interferenze delle molecole di acqua, che potrebbero portare ad un'errata idrolisi del fosfato presente sull'1,3-bisfosfoglicerato, che porterebbero ad uno spreco di molecole ad alta energia.

SOD (Superossido dismutasi)

L'enzima superossido dismutasi (SOD) appartiene alla classe delle ossidoreduttasi e catalizza la seguente reazione:

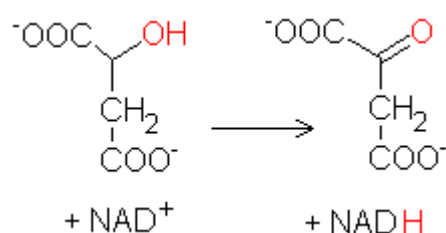


Il superossido è uno dei maggiori agenti ossidanti nella cellula e di conseguenza, la SOD ha un ruolo antiossidante chiave. Nei mammiferi l'importanza fisiologica delle SOD è visualizzabile dalle gravi patologie che si manifestano nei topi modificati geneticamente per mancanza di questi enzimi. Nei pesci viene spesso analizzato insieme ad un altro enzima antiossidante, la catalasi (CAT) per valutare lo stato di stress dei pesci, sia esso legato ad una condizione patologica infettiva o all'esposizione ad agenti inquinanti. Come suggerisce Fernandes (2008), l'attività dell'enzima SOD aumenta in modo statisticamente significativo in pesci sottoposti a stress da inquinanti più nelle branchie che nel fegato. Le analisi effettuate prima con *MicroArray Technology* e poi validate con Real-Time RT-PCR confermano che anche il freddo è una condizione stressante che induce aumento dell'espressione di questo enzima nel tessuto branchiale.

→ **Geni sottoespressi:**

MDH (Malato deidrogenasi)

Si tratta dell'enzima presente nell'ultima reazione del ciclo dell'acido citrico (ciclo di Krebs) che catalizza la reazione che porta alla produzione di ossalacetato a partire da L-malato .



Nelle condizioni termodinamiche standard questo equilibrio è molto spostato a sinistra. Nelle cellule invece, l'ossalacetato viene rimosso continuamente dalla reazione altamente esoergonica della citrato sintasi, contribuendo a mantenere estremamente bassa la concentrazione dell'ossalacetato e contemporaneamente spingendo la reazione della malato deidrogenasi verso la formazione dell'ossalacetato. In molte specie di pesci sono state isolate diverse isoforme di questo enzima caratterizzate da proprietà cinetiche e stabilità termica differenti per adattarsi a diverse condizioni termiche che si presentano nel corso dell'anno nell'ambiente acquatico (Aquino-Silva 2002).

BCR (Recettore Linfocita B)

La maggior parte dei linfociti è rappresentata da Linfociti B (*B-cell*) e linfociti T (*T-cell*). I linfociti B sono prodotti nel rene cefalico e li maturano. Ogni linfocita B è specifico per un particolare antigene. La specificità è data dal legame del *B-Cell receptor* (BCR) con l'antigene. I BCR sono proteine integrali di membrana. Sono presenti in migliaia di copie identiche esposte sulla superficie cellulare. Sono sintetizzate prima che la cellula incontri l'antigene. Il complesso BCR in genere consiste di una subunità legante l'antigene (immunoglobulina di membrana o MIg), che si compone a sua volta di due catene immunoglobuliniche pesanti (*Immunoglobulin Heavy Chains-IgHs*) e due catene immunoglobuliniche leggere (*Immunoglobulin Light Chains- IgLs*) e una subunità che trasmette il segnale, cui sono legati con ponti disolfuro eterodimeri di Ig-Alpha (CD79A) e Ig-Beta (CD79B).

Il BCR ha un unico sito di legame, esso lega una porzione antigenica: l'epitopo. Il legame dipende dalla complementarità tra la superficie del recettore e l'epitopo. Il legame che si instaura non si basa su legami covalenti. In assenza di specifici antigeni, i linfociti B maturi sopravvivono nel circolo periferico per alcuni giorni. Le cellule che non incontrano antigeni in questo periodo di vita vanno incontro ad apoptosi. Questo procedimento è necessario per mantenere una circolazione ottimale di linfociti B nel circolo periferico. Il recettore esposto sulla superficie cellulare del linfocita svolge la propria funzione trasmettendo segnali che regolano la crescita cellulare e la differenziazione e si lega all'antigene per generare una risposta immunitaria.

5.7 Caratterizzazione istologica del campione

I campioni di cute e rene cefalico sono giunti in laboratorio fissati in formalina. I campioni di cute sono stati parcellizzati, la porzione contenente cute e pinna è stata sottoposta a trattamento con decalcificante e, successivamente, tutti i campioni sono stati sottoposti ad un trattamento per l'inclusione in paraffina mediante l'utilizzo di un processatore automatico (Alessandrini Embeded 503). Il tessuto cutaneo così trattato è stato tagliato al microtomo (Leica RM 2145) per ottenere sezioni dello spessore di 4 micrometri, mentre da quello di rene cefalico sono state ottenute sezioni di 3 micrometri utili per la visione ottimale al microscopio.

6.RISULTATI

6.1 Estrazione RNA

I valori di RIN ottenuti per i campioni di fegato sono risultati compresi tra 8 e 8,5. I campioni di branchie hanno dato valori superiori a 9. La raccolta dei campioni e la procedura di estrazione sono state eseguite in modo tale da ottenere una buona integrità dell'acido ribonucleico. La qualità leggermente inferiore di RNA dei campioni di fegato è da imputare alla scarsa qualità del tessuto in partenza; il fegato delle orate, infatti, si presentava steatosico pur con vari gradi di gravità.

6.2 Quantificazione al NanoDrop®.

L'analisi al NanoDrop® (ND 1000 NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) ha permesso di valutare la quantità di acido ribonucleico dei singoli campioni. La grande variabilità espressa nei risultati ottenuti sul tessuto epatico trova spiegazione nelle grandi differenze del grado di steatosi presente nella matrice.

Tessuto	Range
Branchie	1100-1300 ng/μl
Fegato	300-3000 ng/μl

Tabella 13 : risultati della quantificazione al NanoDrop®

Rapporto qualitativo	Risultato
260/280	≈ 2
260/230	≈ 2

Tabella 14: rapporti qualitativi forniti dal NanoDrop®

Il rapporto 260/230 è il rapporto tra acidi nucleici e solventi, il valore di *optimum* è 2

Il rapporto 260/280 è il rapporto tra acidi nucleici e proteine, il valore di *optimum* è 2, esso valuta la presenza di impurità dovute alla metodica di estrazione.

6.3 MicroArray Technology

Dopo la scansione si ottiene un'immagine come in figura. I dati vengono prima normalizzati con R 2.6.1 e poi analizzati con SAM e TMeV.

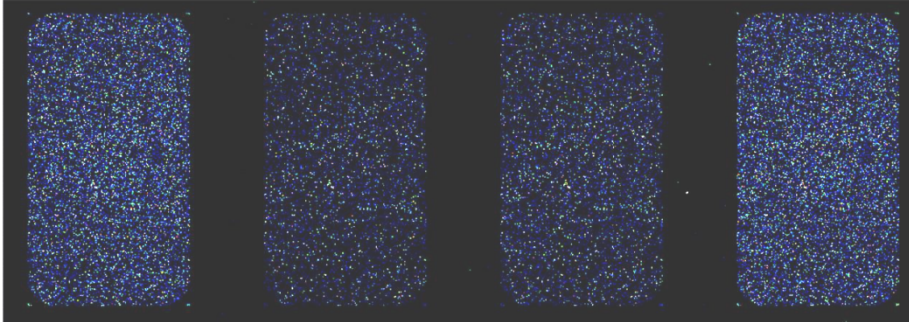


Figura 12: risultato di analisi Microarray

6.3.1 Liste dei geni differenzialmente espressi

Dall'output dell'analisi si sono ottenute le seguenti liste

Geni sovra espressi in fegato coinvolti nel metabolismo energetico	Geni sovra espressi in fegato coinvolti nel metabolismo lipidico
<i>Mitochondrial import receptor subunit</i>	<i>Putative phospholipase DDHD1</i>
<i>Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit</i>	<i>Putative palmitoyltransferase</i>
<i>Mitoferrin-1 Mitochondrial iron transporter</i>	<i>Glycerol-3-phosphate acyltransferase</i>
<i>Mitochondrial intermembrane space import and assembly protein 40</i>	<i>Lipid phosphate phosphohydrolase 1</i>
<i>[Pyruvate dehydrogenase [lipoamide]]-phosphatase 2</i>	
<i>Mitogen-activated protein kinase</i>	
<i>Isocitrate dehydrogenase 2 NADP+</i>	
<i>L-lactate dehydrogenase A chain</i>	
MDH	

Tabella 15: liste dei geni sovraespressi nel fegato coinvolti nel metabolismo lipidico ed energetico

Geni sottoespressi in fegato coinvolti nella risposta immunitaria
<i>T-cell leukemia</i>
<i>CC Chemokine</i>
<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronic acid receptor 1</i>
<i>Immediate early response 5-like protein</i>
<i>Complement C3 precursor</i>
<i>Lymphocyte cytosolic protein 2</i>

Tabella 16: lista dei geni sottoespressi nel fegato coinvolti nella risposta immunitaria

Geni sotto espressi in branchie	Geni sovra espressi in branchie
<i>T-cell surface glycoprotein CD8</i>	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45</i>
<i>Interferon regulatory factor 1 IRF-1.</i>	<i>Acyl carrier protein</i>
B-cell	<i>Phospholipase C</i>
<i>Scavenger receptor class B member 1 SRB1</i>	<i>Diphosphoinositol polyphosphate phosphohydrolase</i>
<i>Tumor necrosis factor receptor</i>	Phosphoglycerate kinase 1
<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor</i>	<i>Mitochondrial chaperone</i>
<i>Cytokine-like protein 1</i>	<i>Cardiolipin synthetase</i>
<i>Interleukin 10</i>	<i>TP53-regulating kinase</i>
<i>MHC class II beta</i>	Superoxide dismutase
<i>Macrophage expressed gene 1</i>	
<i>CC Chemokine</i>	
<i>Lymphocyte cytosolic protein 2</i>	
<i>Granulins</i>	
<i>IL-15</i>	

Tabella 17: liste dei geni sovra espressi e sottoespressi nelle branchie

6.3.2 Gene Ontology e SwissProt per i geni analizzati con Real-Time RT-PCR:

Attraverso i codici GO e SwissProt è possibile identificare un gene, reperire dati e informazioni sui suoi prodotti, sui processi biologici in cui è coinvolto, sulle componenti cellulari che va a formare sulle sue funzioni molecolari.

Gene	GO	Funzione cellulare
SOD	0004784 0004785 0005507 0008270 0006801 0016491 0046872	Ossidoreduttasi; distrugge i radicali Lega rame e cadmio Lega zinco Coinvolto nel metabolismo del superossido Catalizza ossidoriduzione Interagisce selettivamente ma non in modo covalente con i metalli
PGK-1	0004618 0016301 0016740 0006096	Catalizza la reazione : ATP + 3-fosfo-D-glicerato = ADP + 3-fosfo-D-gliceroil-fosfato Fosfochinasi Transferasi Coinvolto nella glicolisi

Tabella 18: GO e funzione cellulare dei geni SOD e PGK-1

Gene	SWISSPROT	Funzione cellulare
B-cell CLL (<i>lymphoma7 protein family</i>)	SWISSPROT: Q9BQE9	Recettore di superficie dei linfociti B
MDH	SWISSPROT: P40925	Enzima citoplasmatico, ligando del NAD, coinvolto nel ciclo degli acidi tricarbossilici

Tabella 19: SWISSPROT e funzione cellulare dei geni B-cell e MDH

6.4 REAL TIME RT- PCR

6.4.1 Curva standard.

Sono state ottenute le curve standard per le seguenti coppie di primer: RPL13a, SOD, B-Cell. È stata valutata efficienza, coefficiente angolare (*slope*) ed errore per ogni test.

Gene	Efficienza	Coefficiente angolare	Errore
RPL13-a	2,028	- 3,257	0,00968
B-cell	2,068	- 3,169	0,00674
SOD	1,975	- 3,389	0,0126

Tabella 20: efficienza, coefficiente angolare ed errore delle curve standard dei geni RPL13-a, B-cell e SOD

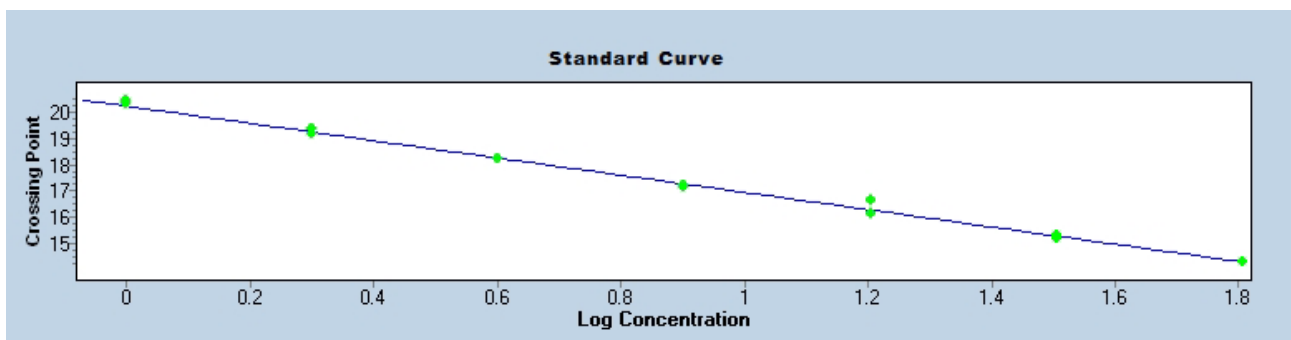


Figura 13: RPL13a standard curve

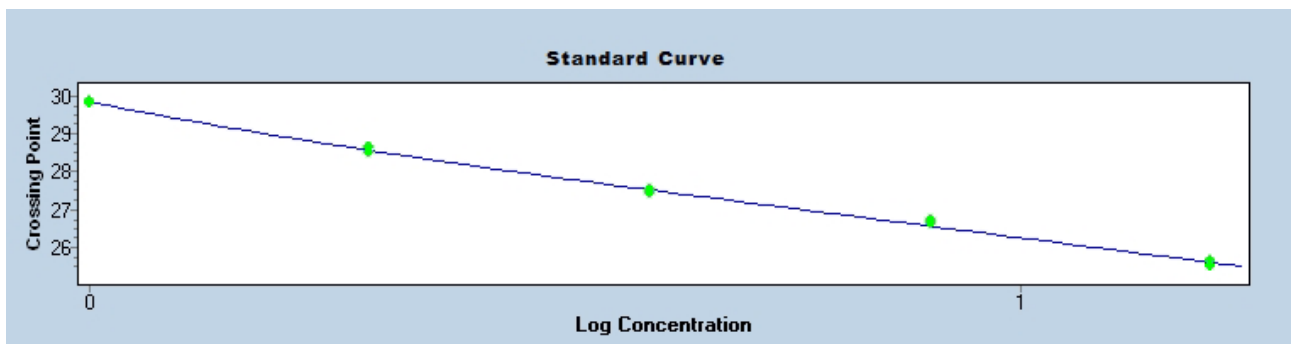


Figura 14: B-cell standard curve

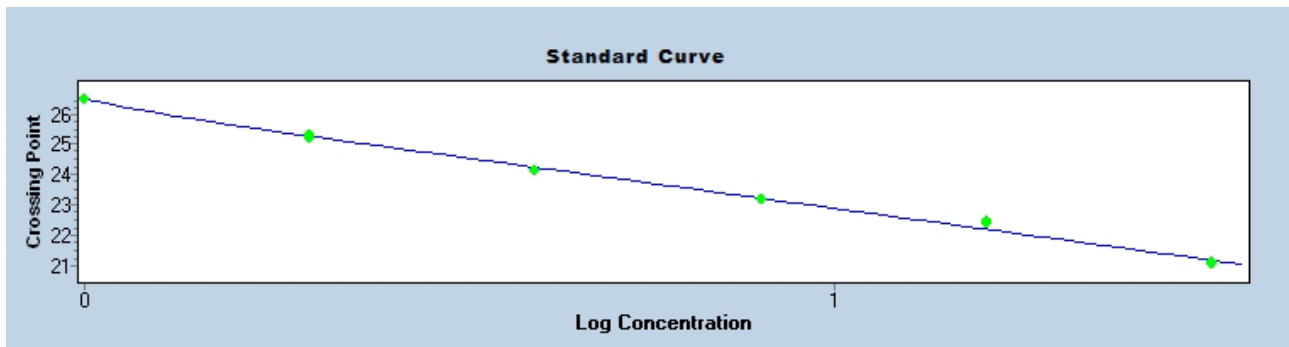


Figura 15: *SOD standard curve*

6.4.2 Amplification plot :

Sono stati ottenuti i grafici rappresentanti le curve di amplificazione dei vari campioni, che mostrano buona corrispondenza tra i duplicati :

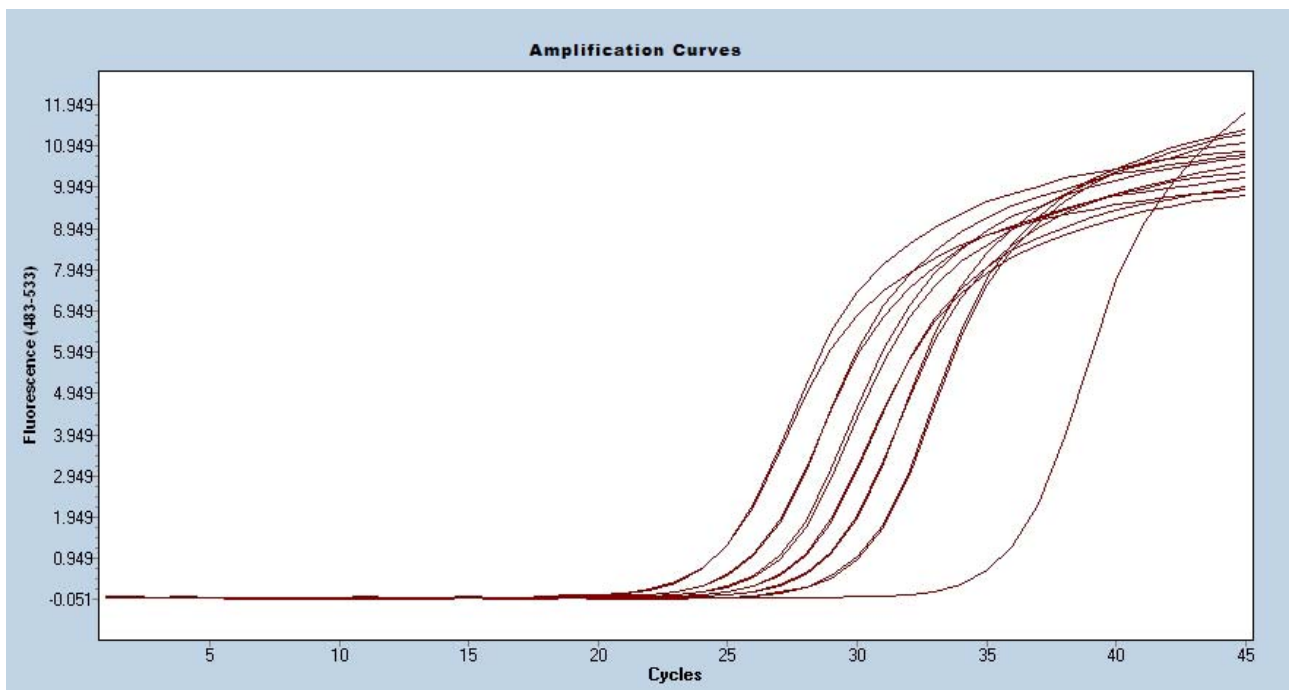


Figura 16: *B-cell amplification plot*

6.4.3 Analisi della curva di melting:

Le curve di melting hanno mostrato la buona qualità dell'esperimento, dimostrando come le temperature di melting dei singoli campioni siano le stesse, e provando l'assenza di doppi filamenti diversi da quelli del campione.

6.4.4 Istogrammi di quantificazione relativa:

Sono stati analizzati i risultati delle piastre, è già possibile apprezzare la sovra e sottoespressione dei geni indagati.

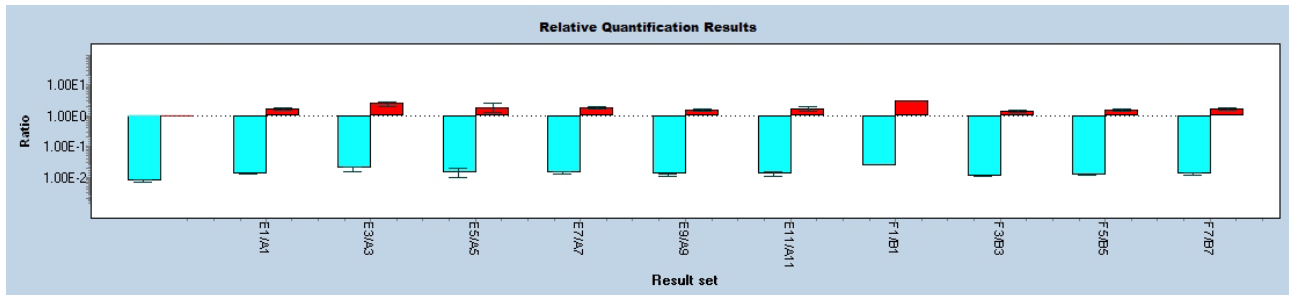


Figura 17: istogramma della quantificazione relativa del gene PGK-1 a T1 in V4 (pesci sottoposti a basse temperature). Il gene *target* (colone rosse) risulta sovra espresso, rispetto al *reference* (colonne azzurre)

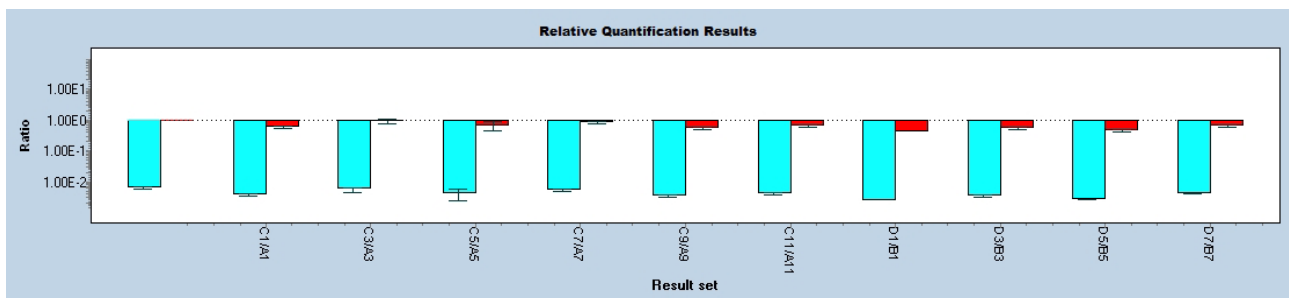


Figura 18: istogramma della quantificazione relativa del gene MDH a T1 in V4 (pesci sottoposti alle basse temperature). Il gene *target* risulta sottoespresso (colonne rosse) rispetto al *reference* (colonne azzurre)

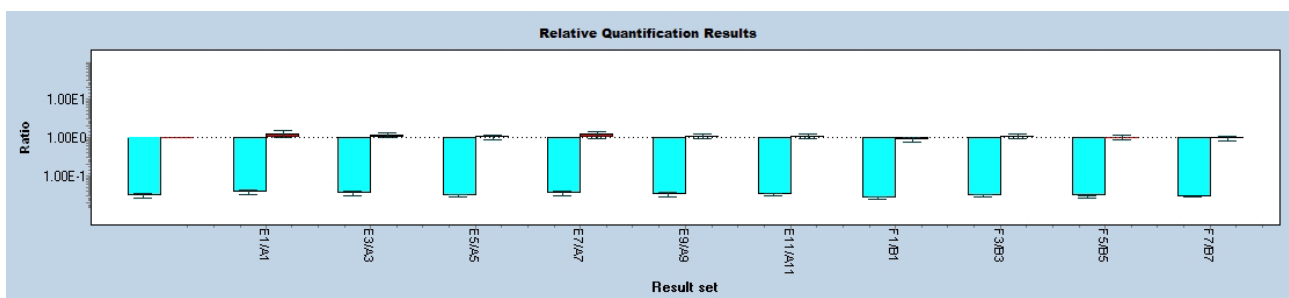


Figura 19: istogramma della quantificazione relativa del gene SOD a T1 in V4(pesci sottoposti alle basse temperature). Non sembrano esserci differenze tra *target* e *reference*.

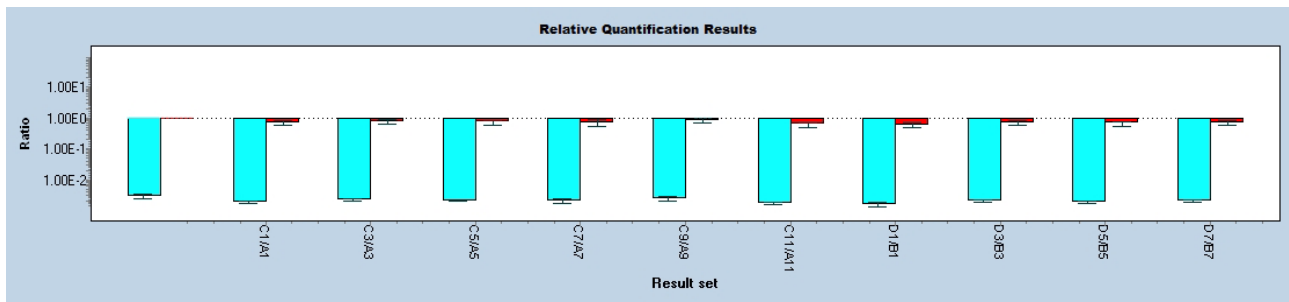


Figura 20: istogramma della quantificazione relativa del gene B-cell a T1 in V4(pesci sottoposti alle basse temperature). Non sembrano esserci differenze tra *target* e *reference*.

6.4.5 Analisi dei dati di Real-Time RT-PCR:

Nella tabella 20 è possibile osservare i dati di *Normalized Ratio* ottenuti tramite la formula descritta in materiali e metodi (paragrafo 3.6.5). Sono stati analizzati i campioni di branchie al tempo T1 e al tempo T7 di tutti gli individui singolarmente per i 4 geni . MDH e PGK1 sono geni del metabolismo energetico coinvolti nel ciclo di Krebs, mentre B-cell e SOD sono due geni della risposta immunitaria che risultano sotto espressi.

	CAMPIONI									
GENI	16v4	17v4	18v4	19v4	20v4	21v4	22v4	23v4	24v4	25v4
MDH	1,062	0,9087	1,014	1,248	0,7802	0,8235	0,5565	1,192	0,8794	0,9756
PGK1	0,8136	1,297	0,9522	1,711	0,9171	0,7706	0,4544	0,8788	0,6727	0,7853
B-cell	0,6805	0,7769	0,731	0,7183	0,8394	0,6146	0,5793	0,697	0,6719	0,7161
SOD	1,244	1,176	1,041	1,205	1,1	1,064	0,869	1,048	0,9891	0,9382
	16v6	17v6	18v6	19v6	20v6	21v6	22v6	23v6	24v6	25v6
MDH	1,392	1,639	1,615	1,146	1,286	1,079	1,145	1,065	0,8987	1,848
PGK1	0,7328	1,326	1,003	0,7753	1,252	1,132	1,404	1,256	0,9506	1,37
B-cell	1,862	2,725	1,551	1,65	1,674	1,907	1,941	1,9	1,634	0,7098
SOD	1,244	1,672	0,9252	0,593	1,12	1,03	0,8269	0,8624	0,9066	1,121
	76v4	77v4	78v4	79v4	80v4	81v4	82v4	83v4	84v4	85v4
MDH	0,6008	0,8934	0,653	0,8242	0,5493	0,6588	0,3944	0,5531	0,4334	0,6229
PGK1	1,64	2,482	1,838	1,842	1,577	1,7	2,985	1,408	1,545	1,636
B-cell	0,8935	0,8732	0,9909	0,9265	0,8967	0,8151	1,081	0,8714	0,6589	0,8874
SOD	1,974	2,168	1,707	1,927	1,686	1,356	2,898	2,252	1,461	0,2599
	76v6	77v6	78v6	79v6	80v6	81v6	82v6	83v6	84v6	85v6
MDH	0,9458	1,054	1,061	1,281	1,129	1,33	1,726	1,779	1,928	1,463
PGK1	2,368	1,188	1,369	1,916	1,304	1,041	1,213	0,6707	1,15	0,7658
B-cell	1,688	1,421	1,601	1,824	1,606	1,639	1,453	2,103	1,749	1,778
SOD	1,295	0,835	0,7905	0,9948	0,8674	0,8548	0,7331	0,9244	0,9711	0,9055

Tabella 21: dati di Normalized Ratio per i geni MDH PGK-1 B-cell e SOD dei singoli individui prelevati a T1 e T7 da V4 e V6

6.4.6 Analisi statistica

Attraverso t-test sono stati valutati i risultati dei singoli geni:

t-test	
0,005247801	p-value per MDH in T1
0,165088157	p-value per PGK1 in T1
2,98359E-06	p-value per B-cell in T1
0,711383489	p-value per SOD in T1
5,87582E-06	p-value per MDH in T7
0,020474667	p-value per PGK1 in T7
1,46675E-09	p-value per B-cell in T7
0,001288347	p-value per SOD in T7

Tabella 22: p-value ottenuto tramite t-test dei geni MDH, PGK-1, B-cell, SOD al tempo T1 e al tempo T7 confrontando le normalized ratio di animali sperimentali e controlli della tabella 20

Il t-test permette di confrontare i valori di *normalized ratio* tra gruppi di individui trattati e individui controllo e affermare se la differenza tra i due gruppi è statisticamente significativa. Il risultato del t-test è il p-value, se esso è $< 0,05$ i valori ottenuti dai due gruppi sono statisticamente significativi. Il test è stato applicato per i singoli geni tra gruppi controllo e trattati all'interno dei tempi T1 e T7. Nella tabella sopra riportata è possibile notare come a T1 il valore p-value per i geni PGK-1 e SOD sia $> 0,05$ mentre a T7 esso sia inferiore. Questo significa che in fase acuta l'espressione di questi geni non viene condizionata dalla bassa temperatura mentre in fase cronica essa viene modificata. Al contrario l'espressione dei geni MDH e B-cell risente precocemente della condizione di bassa temperatura, per questo motivo si possono definire questi geni "early".

6.5 Analisi Istologica

L'analisi istologica dei campioni di rene cefalico è stata focalizzata sulla conta differenziale dei centri melanomacrofagici, dividendoli in tre categorie secondo la metodologia di Manera (2000). Nella milza e nel rene è infatti possibile individuare principalmente 3 categorie di macrofagi aggregati pigmentati :

1-non strutturati: consiste in un gruppo di almeno due macrofagi, non aggregati, e non delimitati da alcuna capsula.

2- parzialmente strutturati: gruppo che comprende un numero elevato di macrofagi pigmentati, fortemente addensati con bordi irregolari

3- completamente strutturati: gruppo che comprende un numero elevato di macrofagi pigmentati, fortemente addensati con bordi regolari e delimitati da una capsula composta da cellule simil fibroblasti che con fibre reticolari.

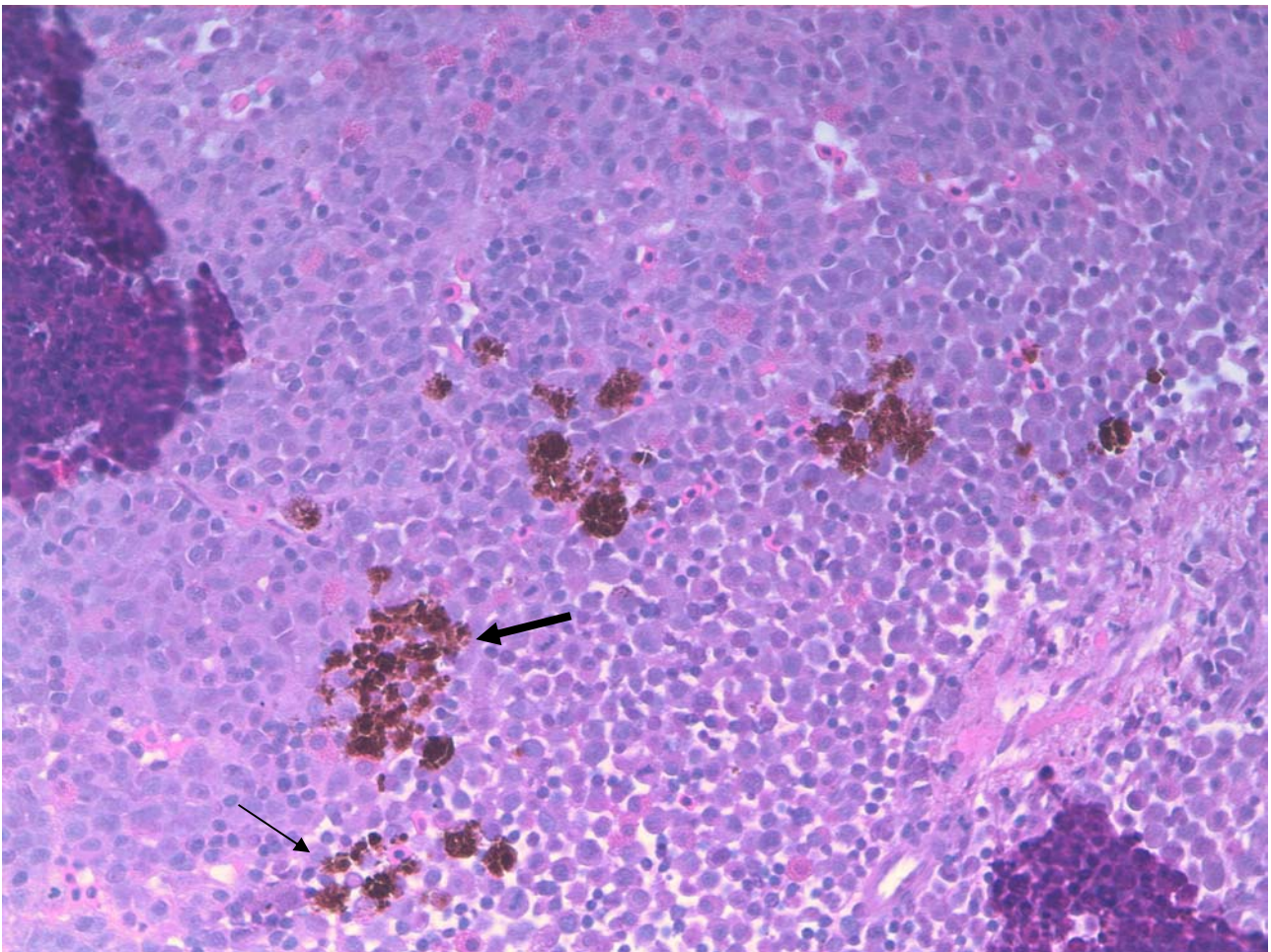


Figura 21: Sezione di rene cefalico di orata con ingrandimento 40X. Centri melanomacrofagici tipo 1-non strutturati (freccia piccola) e tipo 2-parzialmente strutturati (freccia grande)

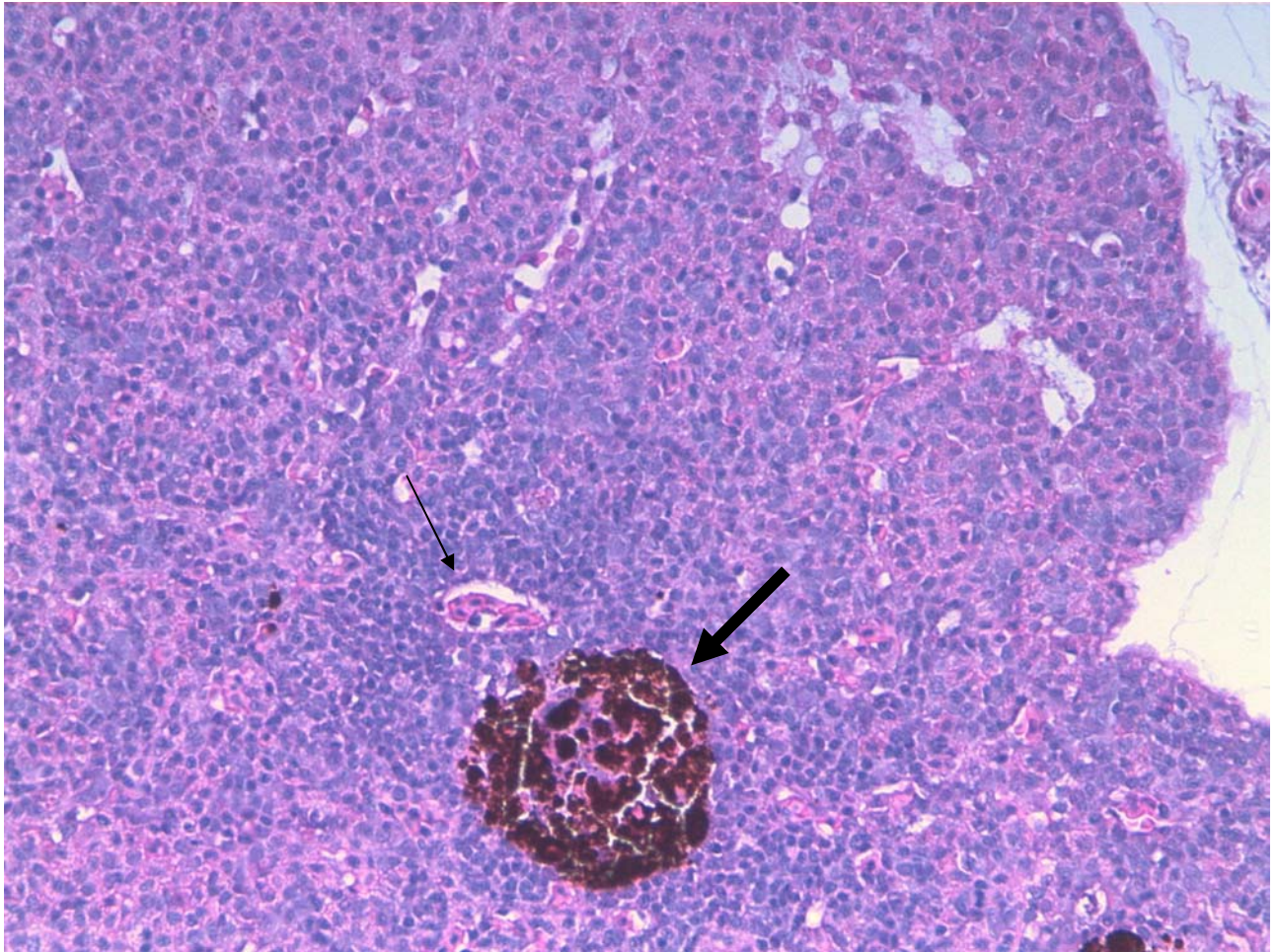


Figura 22: sezione di rene cefalico di orata con ingrandimento 40X. Centro melanomacrogico tipo3-completamente strutturato(freccia grande) vicino a un vaso (freccia piccola)

Campionamento T3

V4	I tipo	II tipo	III tipo	V6	I tipo	II tipo	III tipo
A	21	17	9	A	8	9	12
B	28	15	5	B	4	17	6
C	22	16	2	C	14	23	25
D	26	3	0	D	7	15	15
E	21	12	1	E	7	13	10

Tabella 23: conte differenziali dei centri melanomacrogici nel rene cefalico di orata a T3 24 ore)

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

A-E: singoli individui campionati

I tipo: centri Melanomacrogici non strutturati

II tipo: centri Melanomacrogici parzialmente strutturati

III tipo: centri Melanomacrogici completamente strutturati

Campionamento T6

V4	I tipo	II tipo	III tipo	V6	I tipo	II tipo	III tipo
A	17	19	8	A	14	15	9
B	32	19	3	B	13	15	11
C	28	11	1	C	17	17	4
D	37	9	1	D	10	16	3
E	24	7	2	E	12	13	12

Tabella 24: conte differenziali dei centri melanomacrofagici nel rene cefalico di orata a T6 (14gg)

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

A-E: singoli individui campionati

I tipo: centri Melanomacrofagici non strutturati

II tipo: centri Melanomacrofagici parzialmente strutturati

III tipo: centri Melanomacrofagici completamente strutturati

Campionamento T7

V4	I tipo	II tipo	III tipo	V6	I tipo	II tipo	III tipo
A	37	13	2	A	15	10	13
B	45	12	8	B	15	15	15
C	40	21	7	C	11	18	12
D	25	20	5	D	-	-	-
E	40	15	2	E	-	-	-

Tabella 25: conte differenziali dei centri melanomacrofagici nel rene cefalico di orata a T7 (21gg)

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

A-E: singoli individui campionati

I tipo: centri Melanomacrofagici non strutturati

II tipo: centri Melanomacrofagici parzialmente strutturati

III tipo: centri Melanomacrofagici completamente strutturati

Campionamento T8

V4	I tipo	II tipo	III tipo	V6	I tipo	II tipo	III tipo
A	32	11	2	A	20	18	25
B	18	17	3	B	5	12	13
C	28	17	1	C	9	18	13
D	19	12	0	D	17	20	24
E	39	13	4	E	5	18	21

Tabella 26: conte differenziali dei centri melanomacrofagici nel rene cefalico di orata a T8 (dopo recovery 28gg)

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

A-E: singoli individui campionati

I tipo: centri Melanomacrofagici non strutturati

II tipo: centri Melanomacrofagici parzialmente strutturati

III tipo: centri Melanomacrofagici completamente strutturati

6.5.1 Analisi statistica dei dati :

T3

v4	a	b	c	d	e	P-VALUE I tipo		
I tipo	21	28	22	26	21	P-VALUE II tipo		9,71E-05
II tipo	17	15	16	3	12	P-VALUE III tipo		0,438972
III tipo	9	5	2	0	1			0,021889
						P-VALUE numero totale centri MM		0,766981
v6	a	b	c	d	e			
I tipo	8	4	14	7	7			
II tipo	9	17	23	15	13			
III tipo	12	6	25	15	10			

Tabella 27: t-test e p-value per la conta differenziale dei centri melanomacrogici riferita alla tabella 22

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

A-E: singoli individui campionati

I tipo: centri Melanomacrogici non strutturati

II tipo: centri Melanomacrogici parzialmente strutturati

III tipo: centri Melanomacrogici completamente strutturati

T6

v4	a	b	c	d	e	P-VALUE I tipo		
I tipo	17	32	28	37	24	P-VALUE II tipo		0,003984
II tipo	19	19	11	9	7	P-VALUE III tipo		0,424669
III tipo	8	3	1	1	2			0,064969
						P-VALUE numero totale centri MM		0,449781
v6	a	b	c	d	e			
I tipo	14	13	17	10	12			
II tipo	15	15	17	16	13			
III tipo	9	11	4	3	12			

Tabella 28: t-test e p-value per la conta differenziale dei centri melanomacrogici riferita alla tabella 23

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

A-E: singoli individui campionati

I tipo: centri Melanomacrogici non strutturati

II tipo: centri Melanomacrogici parzialmente strutturati

III tipo: centri Melanomacrogici completamente strutturati

T7

v4	a	b	c	d	e	P-VALUE I tipo		
I tipo	37	45	40	25	40	P-VALUE II tipo		0,799366
II tipo	13	12	21	20	15	P-VALUE III tipo		0,020278
III tipo	2	8	7	5	2			
						P-VALUE numero totale centri MM		0,228743
v6	a	b	c	d	e			
I tipo	15	15	11	/	/			
II tipo	10	15	18	/	/			
III tipo	13	15	12	/	/			

Tabella 29: t-test e p-value per la conta differenziale dei centri melanomacrofagici riferita alla tabella 24. Sui campioni "d" ed "e" di V6 non è stato possibile eseguire le analisi istologiche

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

A-E: singoli individui campionati

I tipo: centri Melanomacrofagici non strutturati

II tipo: centri Melanomacrofagici parzialmente strutturati

III tipo: centri Melanomacrofagici completamente strutturati

T8

v4	a	b	c	d	e	P-VALUE I tipo		
I tipo	32	18	28	19	39	P-VALUE II tipo		0,12275
II tipo	11	17	17	12	13	P-VALUE III tipo		0,000221
III tipo	2	3	1	0	4			
						P-VALUE numero totale centri MM		0,673125
v6	a	b	c	d	e			
I tipo	20	5	9	17	5			
II tipo	18	12	18	20	18			
III tipo	25	13	13	24	21			

Tabella 30: t-test e p-value per la conta differenziale dei centri melanomacrofagici riferita alla tabella 24

V4: individui sottoposti a basse temperature

V6: individui controllo

A-E: singoli individui campionati

I tipo: centri Melanomacrofagici non strutturati

II tipo: centri Melanomacrofagici parzialmente strutturati

III tipo: centri Melanomacrofagici completamente strutturati

I valori evidenziati in giallo rappresentano le sottopopolazioni di centri melanomacrofagici dei campioni che risultano essere diverse in modo statisticamente significativo :

Le sottopopolazioni di tipo I a T3, T7, T8 ; le sottopopolazioni di tipo III a T7 e T8

6.6 Risultati esami istopatologici dei campioni prelevati a T8

I prelievi sono stati effettuati dopo un periodo di *recovery* della durata di 7 giorni alla temperatura di 16°C. Sono stati raccolti campioni appartenenti sia a pesci di origine Sicilia che a pesci autoctoni di valle Bonello, sia per Sicilia che per Bonello sono stati collezionati campioni da 3 pesci sottoposti al periodo di progressivo raffreddamento dell'acqua che 3 pesci controllo, mantenuti a temperatura mite per l'intera durata dell'esperimento. I tessuti raccolti da ogni pesce appartengono a branchie, milza, epatopancreas, rene cefalico e caudale.

- Per quanto riguarda i pesci provenienti dalla Sicilia all'esame istopatologico si sono presentate le seguenti evidenze.

Pesci sottoposti a refrigerazione appartenenti alla vasca V3.

Branchie:

I – lieve iperplasia dell'epitelio branchiale, con fusione delle lamelle branchiali. Lieve aumento delle cellule granulari eosinofile. Distribuzione multifocale delle lesioni.

Ia – lieve fusione dei filamenti, ipertrofia. Abnorme ispessimento dell'epitelio branchiale con teleangiectasia. Presenza di fusione a livello basale delle lamelle, tipica di una risposta irritativa aspecifica di tipo cronico. Vedi figura 23



Figura 23: sezione di branchia di orata con ingrandimento a 40X, Fusione delle lamelle secondarie. (freccia)

Ib- lieve infiltrato infiammatorio mononucleato, reperto cronico. Lesione focale, con fusione dei filamenti. Lesione di entità lieve-moderata. Possibile infestazione da digenei, iperplasia epiteliale, fusione multifocale, moderato aumento delle cellule granulari eosinofile. *Branchitis* cronica multifocale, lieve mononucleata.

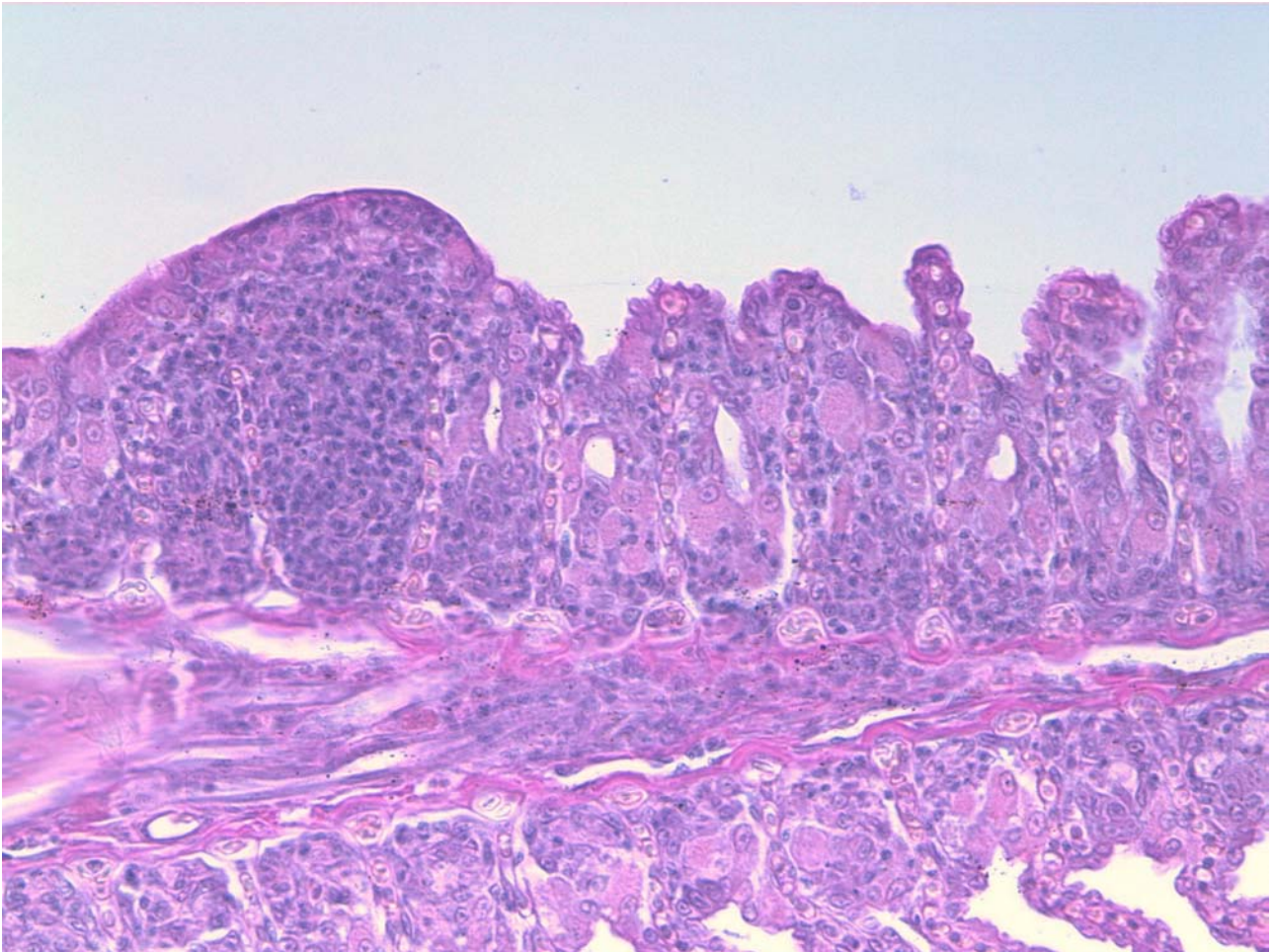


Figura 24: sezione di branchie di orata con ingrandimento 40X. Fusione dei filamenti e *branchitis* con infiltrato mononucleato

Milza; tessuto poco conservato. Lieve stato congestizio in tutti e 3 i campioni.

Epatopancreas:

I – grave steatosi. Presenza di piccoli vacuoli può essere glicogenosi .

Ia – grave steatosi. Presenza di piccoli vacuoli può essere glicogenosi .

Ib- gravissima steatosi.

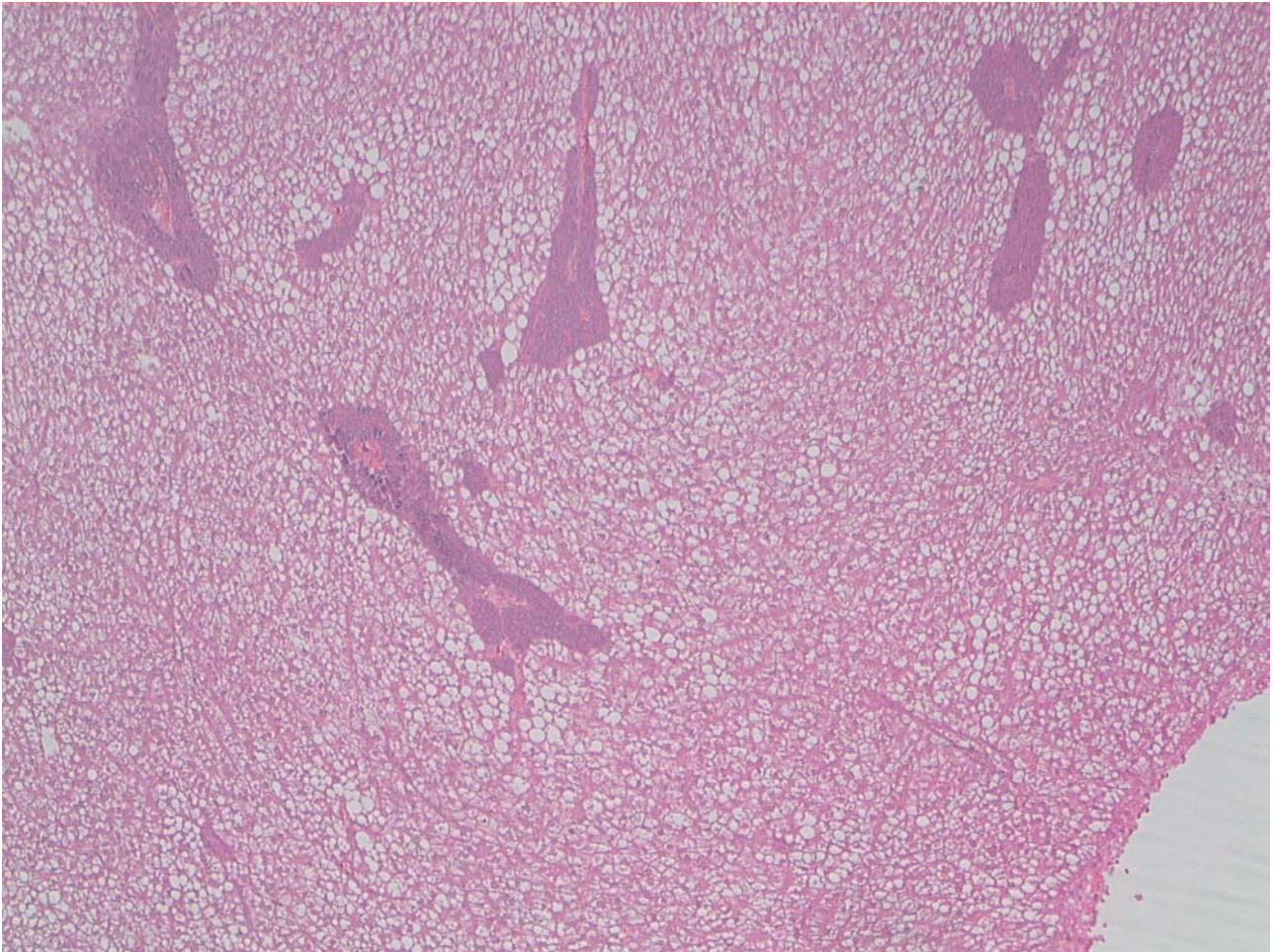


Figura 25: Sezione di fegato di orata con ingrandimento a 40X. Grave quadro di steatosi

Rene :

I assenza di lesioni.

Ia presenza di due piccole lesioni circolari a carattere granulomatoso nel rene posteriore.

Ib assenza di lesioni

Pesci di provenienza Sicilia mantenuti in vasca 1

Nei pesci controllo nelle branchie livello di fusione delle lamelle appare più lieve, presente l'infestazione da digenei (freccia).

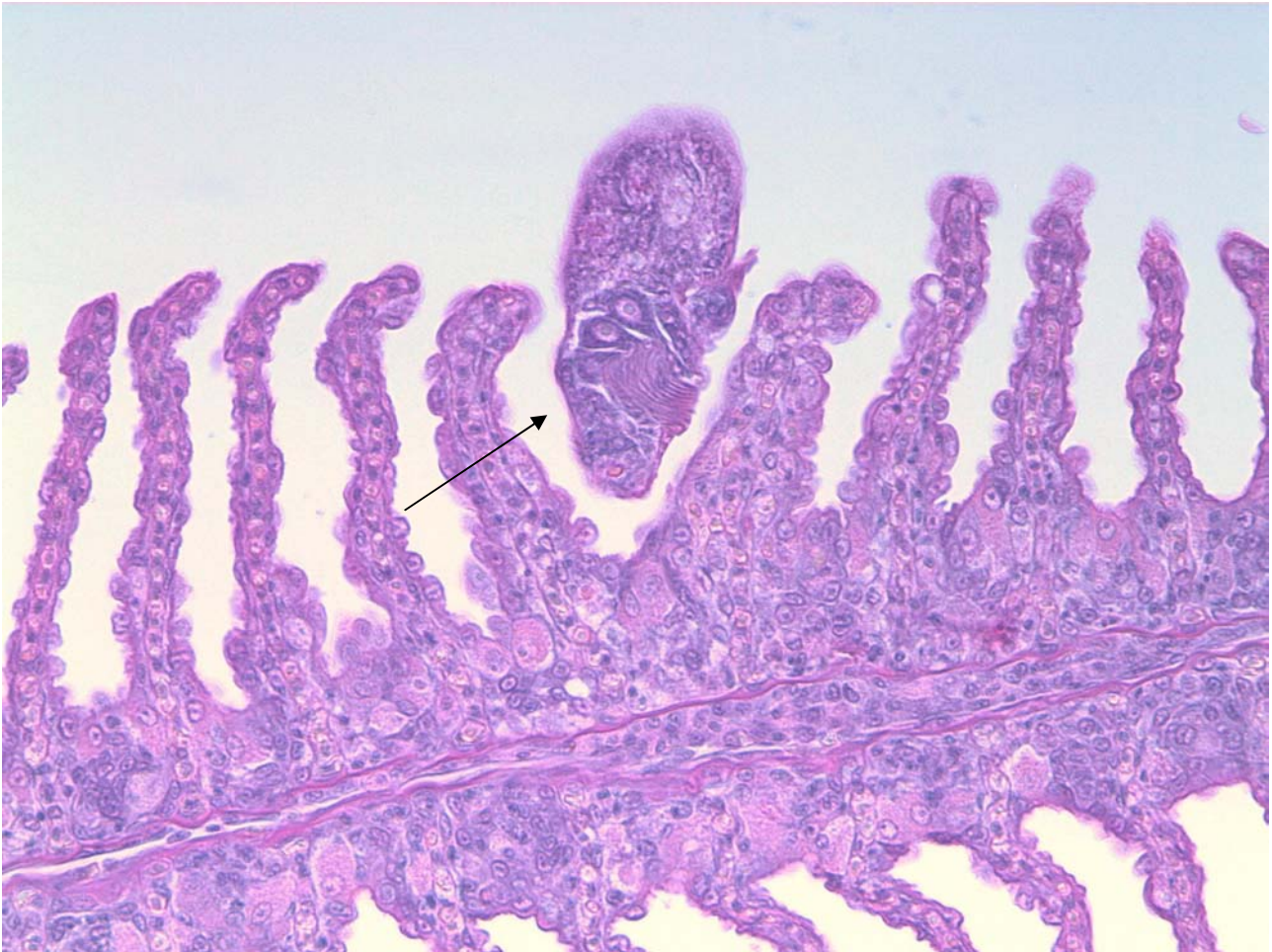


Figura 26: Sezione di branchie di orata con ingrandimento a 40X. Presenza di ectoparassita

Pesci autoctoni di provenienza Bonello :

Pesci mantenuti in vasca 4 trattati con processo di refrigerazione.

Branchie :

lieve ispessimento epiteliale

I a . lieve ispessimento epiteliale multifocale

I b. Lacune tra i filamenti, ispessimento grave dell'epitelio respiratorio nel tratto più apicale della lamella. Possibile colonia basofila . Sospetto di epitelio cisti o *Aeromonas*. Presenza di grosso ectoparassita.

Milza, nulla da segnalare nei 3 preparati.

Fegato :

I lieve degenerazione

I a steatosi glicogenosi

I b lieve glicogenosi.

Rene :

I nel rene cefalico lieve aumento della dispersione della melanina. Nel rene caudale ok

I a cefalico ,dispersione di melanina.

I b aumento dispersione della melanina.

Nei campioni degli esemplari di orata mantenuti a temperatura di controllo non si sono rinvenute lesioni.

7.DISCUSSIONE

7.1 *Microarray technology.*

Dalle analisi effettuate su *Sparus aurata* con *Microarray technology* è stato possibile individuare delle liste di geni sovra e sottoespressi nei tessuti di branchie e fegato di orate sottoposte alle basse temperature.

Per quanto riguarda il tessuto epatico, i geni di maggior interesse sovra espressi sembrano essere coinvolti in due differenti *pathway* metabolici. In particolare con riferimento alla tabella 15, un gruppo di 9 geni è coinvolto nel metabolismo energetico, stante la necessità dell'orata di contrastare la bassa temperatura. Mentre un gruppo di 4 geni è coinvolto nel metabolismo lipidico. In particolare questo gruppo di geni potrebbe essere coinvolto nel processo di adattamento omeoviscoso delle membrane cellulari alle basse temperature, un processo che si basa sull'aumento dei fosfolipidi con acidi grassi insaturi nel doppio strato fosfolipidico per mantenere la fluidità della membrana stessa e consentire lo svolgersi di numerose reazioni.

Analizzando poi la lista dei geni sottoespressi nel fegato, un gruppo di 7 geni (tabella 16) è coinvolto nella risposta immunitaria, questo potrebbe essere correlato con lo stato di immunodepressione caratteristico della *Winter Disease* (Tort et al. 1998).

Anche nel tessuto branchiale (tabella 17) i geni sottoespressi sono coinvolti nella risposta immunitaria, mentre quelli sovra espressi sono in parte coinvolti nel metabolismo lipidico, in parte nei sistemi riparativi del DNA e antiossidanti (*Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45* e SOD).

L'ipotesi che spiega lo stato di immunodepressione che affligge gli esemplari colpiti da *Winter Stress Syndrome* proposta da Bly e Clem (1998) che prevede un'alterazione della capacità di adattamento omeoviscoso delle membrane linfocitarie sembra trovare un significativo riscontro nei risultati forniti dall'analisi con *Microarray technology*. L'adattamento omeoviscoso delle membrane cellulari è un meccanismo adattativo di risposta al freddo attuato dai pesci, che consiste nell'aumentare la quota di acidi grassi insaturi che compongono le membrane biologiche. Il risultato della modificazione strutturale dei fosfolipidi di membrana è un aumento della fluidità. La caratteristica della fluidità può regolare molte attività enzimatiche che avvengono a livello della membrana stessa. Nella lista dei geni sovraespressi nel tessuto epatico ritroviamo geni quali *Glycerol-3-phosphate acyltransferase*, *Lipid phosphate phosphohydrolase 1*, si tratta di geni che codificano per enzimi coinvolte nella biosintesi dei fosfolipidi di membrana.

Anche nei geni sovraespressi nel tessuto branchiale ritroviamo alcuni geni coinvolti nel metabolismo lipidico *Acyl carrier protein*, *Cardiolipin synthetase*, *Diphosphoinositol-polyphosphate phosphohydrolase*, *Phospholipase C*. L'*Acyl carrier protein* è una proteina che lega l'acile con legame tioestere ad elevata energia; l'energia rilasciata dalla rottura del legame consente la prima reazione di sintesi degli acidi grassi.

Altri due geni presenti nelle liste dei geni sovra espressi suscitano particolare interesse: *Phospholipase C*, *Lipid phosphate phosphohydrolase*.

Secondo quanto asserito da Marshall (2000), la fosfolipasi C sarebbe coinvolta in un *pathway* della risposta immunitaria. Essa sarebbe implicata come mediatore critico nei segnali di attivazione e differenziazione dei linfociti B. L'attivazione di questo enzima ubiquitario sarebbe regolata da proteine che agiscono come segnali di trasduzione specifici dei linfociti B. L'enzima fosfolipasi C genererebbe sia secondi messaggeri solubili che mediatori ancorati alla membrana plasmatica dei linfociti; entrambi questi tipi di mediatori regolano l'attività delle proteine che trasmettono il segnale a valle. La fosfolipasi C produce inositolo-1,4,5-trifosfato (IP3 mediatore solubile), che regola la mobilizzazione degli ioni Ca^{++} , e diacilglicerolo (DAG) che si ancora alla membrana.

Il legame tra le subunità BCR stimola l'attività delle chinasi che fosforilano le tirosine della fosfolipasi C, rendendola un enzima attivo.

L'IP3 stimola l'aumento del calcio citosolico sia tramite il rilascio delle riserve di calcio del reticolo endoplasmatico sia aprendo i canali della membrana plasmatica.

Il DAG agisce come messaggero legandosi ed attivando molte chinasi.

L'enzima fosfolipasi C, infine, interviene nei passaggi di maturazione del linfocita B, da ProB a PreB e nella differenziazione guidata da BCR

La fosfolipasi lipidica invece è un'esofosfatasi integrale di membrana. Secondo L.Tomsig (2009) essa sarebbe deputata a degradare l'acido lisofosfatidico, una molecola lipidica coinvolta come mediatore che stimola la crescita e proliferazione cellulare, ed è coinvolta in processi patologici e fisiologici come la guarigione delle ferite, l'attivazione piastrinica, l'angiogenesi e la crescita tumorale.

Nella letteratura scientifica sono presenti altri studi che hanno utilizzato Microarray technology nello studio dell'espressione genica nei pesci alle basse temperature. In particolare i risultati degli studi condotti da Chen e i suoi collaboratori (2008) su *Dissostichus mawsoni* hanno messo in evidenza ben 3114 famiglie di geni non ridondanti differenzialmente espressi, rispetto a un *pool* di tessuti provenienti da 5 teleostei di acqua temperata o tropicale (*Danio rerio*, *Salmo salar*, *Gasterosteus aculeatus*, *Fundulus heteroclitus*, e *Oryzias latipes*).

In questo studio i geni differenzialmente espressi sono raggruppati in 15 principali gruppi funzionali.

E' interessante notare come alcuni dei geni sovraespressi in *Sparus aurata* alle basse temperature appartengano agli stessi gruppo o siano esattamente gli stessi geni che *Dissostichus mawsoni* sovra esprime rispetto ai pesci di acque tropicali e temperate. In particolare nel tessuto branchiale è presente *Mitochondrial chaperone* (primo gruppo). Per quanto riguarda il metabolismo lipidico (quarto gruppo) sono sovra espressi nel fegato *Putative phospholipase DDHD1*, *Putative palmitoyltransferase*, *Glycerol-3-phosphate acyltransferase*, *Lipid phosphate phosphohydrolase 1*. Un altro gene sovraespresso da entrambi è SOD (quinto gruppo), vista la maggior presenza di ossigeno disciolto nell'acqua a bassa temperatura.

Infine per quanto riguarda i regolatori dell'apoptosi (sesto gruppo) *Sparus aurata* sovra esprime TP53 e GADD 45, entrambi regolatori del ciclo cellulare, sebbene sia importante sottolineare come in *Dissostichus mawsoni* siano sovraespressi principalmente geni con funzione antiapoptotica, mentre quelli citati per *Sparus aurata* assolvano a un ruolo proapoptotico.

Un altro lavoro con il quale è interessante confrontare i risultati è quello di Gracey (2004) che ha analizzato la risposta adattativa alle alte e basse temperature in *Cyprinus carpio* con *Microarray technology*. E' interessante notare in particolare la sovraespressione dei geni coinvolti nel metabolismo lipidico che si manifesta nel tessuto epatico. Allo stesso modo alcuni dei geni sovraespressi nel metabolismo energetico sono i medesimi di *Cyprinus carpio* (MDH, *Pyruvate dehydrogenase*, *Isocitrate dehydrogenase 2 NADP+*)

7.2 Real Time RT-PCR

Le analisi condotte in Real Time RT-PCR offrono dei riscontri importanti nell'ambito di questo esperimento.

In primo luogo è stato dimostrato che l'espressione dei geni nell'esperimento condotto non ha risentito in modo significativo della variabilità individuale, pertanto si è rivelato corretto l'approccio basato sull'allestimento e l'analisi dei *pool* con *Microarray technology* ed i risultati ottenuti con questa metodica sono stati validati.

In secondo luogo i risultati delle analisi statistiche ottenuti dimostrano come i geni presi in considerazione siano espressi in modo diverso con certezza statistica tra i gruppi sperimentali e quelli controllo. Inoltre è possibile notare come i geni cambino espressione non solo nel raffronto tra gruppi di individui sperimentali e controllo ma anche nel tempo, se ne può pertanto desumere che nella risposta adattativa al freddo alcuni geni rispondono in modo precoce (*early*) mentre altri aumentano o diminuiscono la loro espressione più tardivamente.

Tra i geni sovra espressi nel tessuto branchiale e presi in esame con questa tecnica vi è il gene SOD. L'aumento dell'attività di questo enzima nel tessuto branchiale è documentato sia in *Liza saliens* (cefalo verzellata) in condizioni di inquinanti presenti nell'acqua (Fernandes 2008), sia in *Heteropneustes fossilis* (pesce gatto americano) in condizioni di stress da caldo (Parihar 1997).

Secondo Fernandes (2008) l'attività di questo enzima aumenta in *Liza saliens* insieme ad altri geni coinvolti nel metabolismo delle specie reattive dell'ossigeno come CAT (catalasi) e GST (glutathione-s-transferasi) nella risposta tessuto-specifica ad un aumentato stress ossidativo. E' interessante notare come il cefalo verzellata sia un pesce affine dal punto di vista ecologico all'orata, anch'esso infatti frequenta i bacini costieri e le lagune e viene allevato nelle valli da pesca. E' possibile quindi che anche l'abbassamento di temperatura determini un aumento dello stress ossidativo che tenta di essere compensato dall'aumento dell'espressione e dell'attività dei sistemi antiossidanti.

7.3 Analisi istologica

L'analisi istologica del tessuto cutaneo conferma i risultati dell'esame autoptico macroscopico effettuato durante il campionamento condotto dai ricercatori ISPRA (2009). In effetti non si sono riscontrate lesioni per questo tessuto.

L'analisi istologica del rene cefalico ha messo in evidenza una diversa rappresentazione delle popolazioni di aggregati macrofagici tra i gruppi di animali sperimentali e controllo. Dopo analisi statistica con t-test le popolazioni rappresentate in modo diverso sono quelle di tipo 1 (centri melanomacrofagici non strutturati) in tutti i tempi in cui è stato effettuato il campionamento (T3, T6, T7, T8) e di tipo 3 (centri melanomacrofagici completamente strutturati) in tre tempi di campionamento (T3, T7, T8). Sul significato di questi risultati ad oggi è possibile solo fare delle ipotesi, dal momento che i fattori che possono influire sulle caratteristiche morfometriche di questi aggregati sono specie, età e stato di salute Russo (2007). Le indicazioni di De Vico (2008) sembrano attestare come in corso di infestazione parassitaria, le caratteristiche morfometriche dei centri cambiano profondamente rispetto ad esemplari di controllo, in particolare sarebbero molto maggiori le dimensioni medie dei centri MM e la densità nei pesci infestati. Nell'esperimento condotto sulla risposta adattativa al freddo i risultati sono contrastanti, infatti il numero totale di centri non differisce tra animali controllo e sperimentali, e per di più le sottopopolazioni maggiormente rappresentate sono quelle di piccole dimensioni.

Per quanto riguarda l'analisi istologica condotta sui campioni al termine dell'esperimento (T8) è soprattutto lo stato di salute branchiale quello che mostra le maggiori differenze. Un livello di sofferenza di base, rappresentato da uno stato di fusione delle lamelle è presente in entrambe le categorie di pesci, ma la presenza di infestazioni parassitarie, o forme infiammatorie (*branchitis*) caratterizza i pesci sottoposti alle basse temperature.

Riguardo al tessuto epatico le evidenze istologiche confermano le osservazioni macroscopiche effettuate dai ricercatori ISPRA (2009), sottolineando la presenza di gravi quadri di vacuolizzazione nel parenchima epatico nei pesci sperimentali, presente altresì ma con grado di gravità decisamente inferiore nei pesci controllo.

8.CONCLUSIONI

Sinora sono stati condotti numerosi studi sulla *Winter Disease* ma non è stato possibile identificare un agente eziologico. L'unico comune denominatore a tutti gli episodi di *Winter Stress Syndrome* è la bassa temperatura, ecco perché studiare le risposte adattative di *Sparus aurata* alle basse temperature può rappresentare l'approccio più efficace per individuare l'eziopatogenesi di questa sindrome metabolica e poter quindi suggerire soluzioni efficaci. Per la prima volta nello studio di questa patologia sono state eseguite analisi di biologia molecolare con due tecniche differenti: *Microarray technology* per identificare i geni differenzialmente espressi alle basse temperature e Real Time RT-PCR per validarne i risultati. Attraverso queste analisi è stato possibile valutare una sovraespressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico ed energetico del tessuto epatico, mentre appare evidente una sottoespressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria. Le stesse analisi condotte sul tessuto branchiale hanno evidenziato una sottoespressione di geni coinvolti nella risposta immunitaria, e una sovraespressione di geni che ricoprono funzioni diverse come proapoptotici, enzimi antiossidanti e geni coinvolti nel metabolismo lipidico.

Talune risposte adattative sono presenti anche nei nototenoidi, pesci che hanno seguito un processo evolutivo che gli consente di vivere nelle acque antartiche (Chen 2008).

Le analisi condotte in Real Time RT-PCR hanno fornito interessanti informazioni non solo validando i risultati ottenuti con *Microarray technology* ma anche mettendo in luce il fatto che la risposta adattativa biologica varia nel tempo ed i geni sovraespressi o sottoespressi cambiano a seconda che ci si trovi in una fase acuta, ovvero poche ore dopo un deciso abbassamento della temperatura (6 ore) o cronica, ovvero dopo che la bassa temperatura è stata mantenuta per 21 giorni. Le analisi istologiche hanno messo in luce una diversa conformazione dei centri melanomacrofagici nei campioni di rene cefalico prelevati, mentre non sono state rilevate lesioni a livello cutaneo. A livello branchiale sono state riscontrate differenze sulla gravità delle lesioni tra individui appartenenti ai gruppi di animali trattati e controllo, così come a livello epatico la gravità della steatosi è risultato essere maggiore negli individui sottoposti alle basse temperature.

Grazie agli studi di genomica funzionale e istopatologia è stato possibile ottenere nuovi dati che meglio chiariscono il processo eziopatogenetico della *Winter Disease* e confermano i risultati della letteratura scientifica sulla risposta adattativa al freddo dei pesci.

9.BIBLIOGRAFIA

1. Andrew Y. Gracey, E. Jane Fraser, Weizhong Li, Yongxiang Fang, Ruth R. Taylor, Jane Rogers, Andrew Brass, and Andrew R. Cossins
Coping with cold: An integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate
PNAS 2004 101: 16970-16975.
2. Aquino-Silva, M. R.- Schwantes, M. L. B. -Schwantes, A. R. (2002) *Isoform expression in the multiple soluble malate dehydrogenase of Hoplias malabaricus (Erythrinidae, Characiformes) Braz. J. Biol., 63(1): 7-15, 2003*
3. Barnabè,G. 1990. Rearing Bass and Gilthead Sea Bream. In: Acquaculture,vol. 2. (ed. G. Barnabè), Ellis Horwood, London, pp. 647-686
4. Bly J.E.- Clem L.W. (1988), *Temperature-mediated processes in teleost immunity. Homeoviscous adaptation by channel catfish peripheral blood cells, Comparativa Biochemistry and Physiology 91A, 481-485*
5. Bovo Bovo, G., Borghesan, F., Comuzzi, M., Ceschias, G., Giorgetti, G., 1995. "Winter disease" in orata di allevamento: osservazioni preliminari. Boll. Soc. Ital. Patol. 17: 2-11.
6. Bullo G."Le valli salse da pesca e la vallicultura", Officine Grafiche Carlo Ferrari, Venezia, 1940.
7. C. Fernandes - A. Fontai´nhas-Fernandes - M. Ferreira - M. A. Salgado (2008) *Oxidative Stress Response in Gill and Liver of Liza saliens, from the Esmoriz-Paramos Coastal Lagoon, Portugal Arch Environ Contam Toxicol 55:262-269*

8. Coutteau P. - Robles R. - De Nigris G. - Cirillo A. - Verstraete P. - Tort L. (2001), *Update on Nutritional Solutions to Winter Syndrome in Gilthead Seabream - Verification at a land based farm*, *Aquafeed International* 2, 30-33.
9. Coutteau P. - Tort L. - Padrós F. - De Nigris P. - Van Hauwaert A. - Verstraete P. (2000), *Cultivation of Gilthead seabream Sparus aurata during winter: feed effects on immune indicators after a simulated winter in the laboratory and on performance in land-based production*, in *"Responsible Aquaculture in the New Millenium"* (R. Flos and L. Creswell compilers), European Aquaculture Society Special Publication n. 28, pp. 154.
10. Domenech A- Fernandez-Garayzabal J.F.- Lawson P. – Garcia J.A.- Moreno M.T. – Collins M. D.- Dominguez L. (1997), *Winter disease outbreak in seabream (Sparus aurata) associated with Pseudomonas anguilliseptica infection*, *Acquaculture* 156, 317-326.
11. Donaldson M.R., S.L. Cooke, D.A. Patterson, MacDonald J.S., 2008. Cold shock and fish. *J. Fish Biol.*, 73: 1491-1530.
12. FAO. © 2005-2009. - . Cultured Aquatic Species Information Programme. Text by Colloca, F.; Cerasi, S. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department [online]. Rome. Updated 17 May 2005. [Cited 28 April 2009].
13. G.Ravagnan-Allevamento dell'orata. In:la vallicoltura moderna. Edagricole, pp 81 03/1988
14. G.Ravagnan-considerazioni di carattere generale. In:la vallicoltura moderna. Edagricole, pp 1 03/1988

15. G.Ravagnan-considerazioni di carattere generale. In:la vallicoltura moderna. Edagricole, pp 1 03/1988
16. G.Ravagnan-Possibilità e limiti della produttività. In:la vallicoltura moderna. Edagricole, pp 103/1988)
17. G.Ravagnan-Tecnica di svernamento del pesce. In:la vallicoltura moderna. Edagricole, pp 48 03/1988
18. Gatlin D. M. (2002), *Nutrition and fish health* , in “ *fish nutrition* ”, *third edition* . *Academic Press*, San Diego, CA, Usa, pp 672-703.
19. Hurst T.P. 2007 Causes and consequences of winter mortality in fishes. *J. Fish Biology*, 71: 315-345
20. Jose L. Tomsig, Ashley H. Snyder, Evgeny V. Berdyshev, Anastasia Skobeleva, Chifundo Mataya, Viswanathan Natarajan, David N. Brindley and Kevin R. Lynch *Lipid phosphate phosphohydrolase type 1 (LPP1) degrades extracellular lysophosphatidic acid in vivo* *Biochem. J.* (2009) 419 (611–618)
21. Licia Ravarotto*, Alessandra Marin, Daniela Pagan, Fabio Borghesan, Amedeo Manfrin, Lucia Selli, Giuseppe Bovo -Caratteristiche chimico-cliniche in siero di orata (*Sparus aurata*) durante un episodio di “Winter disease” *ITTIOPATOLOGIA*, 2005, 2: 53-61

22. Licinio Corbari, Andrea Fabris Associazione Piscicoltori Italiani Gianluca Bertoja “Stato Sanitario della Maricoltura in Italia, Progresso Veterinario dicembre 2005
23. M. S. Parihar, Tarangini Javeri, Taruna Hemnani, A. K. Dubey and Prem Prakash *Responses of Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase and Reduced Glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (Heteropneustes fossilis) to short-term elevated temperature J. rhcrm. Eiol. Vol. 22, No. 2, pp. 151-156, 1997*
24. Marshall, Aaron J; Niuro, Hiroaki; Yun, Theodore J; Clark, Edward A (2000) *Regulation of B-cell activation and differentiation by the phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase C[gamma] pathways. Immunological Reviews. 176:30-46, August 2000.*
25. Moretti, A., Pedini Fernandez-Criado, M., Cittolin, G. & Guidastrri, R. 1999. Manual on hatchery production of seabass and gilthead seabream , Vol.1. FAO, Rome, Italy. 194 pp.
26. P. di Marco, A. Priori, T. Petochi, S. Livi, M.G. Finoia and G. Marino *Stress response and adaptability to low temperature in gilthead sea bream January 2009*
27. Padros F. – Tort L.- Crespo S. (1996), *Winter disease in the gilthead seabream: Some evidences of a multifactorial etiology*, Europ. Acquac. Soc. Verona, pp 305-307.
28. G.Ravagnan, 1992. Vallicoltura integrata. Ed. Edagricole, Bologna, Italy. 502 pp.
29. Riccardo Russo, Roy P. E. Yanong *Preliminary Morphometrics of Spleen and Kidney Macrophage Aggregates in Clinically Normal Blue Gourami Trichogaster trichopterus and Freshwater Angelfish Pterophyllum scalare Journal of Aquatic Animal Health 19:60–67, 2007*

30. Rongying TANG, Andrew DODD, Daniel LAI, Warren C. MCNABB, and Donald R. LOVE Validation of Zebrafish (*Danio rerio*) Reference Genes for Quantitative Real-time RT-PCR Normalization *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 2007, 39(5): 384–390

31. Sascha Hibbeler, Joern P Scharsack and Sven Becker
Housekeeping genes for quantitative expression studies in the three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus* 29 January 2008 *BMC Molecular Biology* 2008, 9:18

32. Sunyer J.O.- Tort L. (1995), *Natural hemolytic and bactericidal activities of seabream Sparus aurata serum are affected by the alternative complement pathway, Veterinary Immunology and Immunopathology* 45, 333-345.

33. Tort L. – Padros F. – Rotllant J. – Crespo S. (1998), Winter syndrome in the gilthead seabream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features, *Fish & Shellfish Immunology* 8, 37-47.

34. Verstraete P. – Coutteau P.- De Nigris G. – Tort L. (2000), *nutritional solutions to winter syndrome in gilthead seabream, Acquafed International* 2, 2-5.

35. Wedemeyer G. A. (1996), *Physiology of Fish in Intensive Culture Sistema*, Chapman & Hall, New york, NY, USA, 232 pp

36. Zuo Zhou Chen, C.-H. Christina Cheng, Junfang Zhang, Lixue Cao, Lei Chen, Longhai Zhou, Yudong Jin, Hua Ye, Cheng Deng, Zhonghua Dai, Qianghua Xu, Peng Hu, Shouhong Sun, Yu Shen, and Liangbiao Chen
Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish
PNAS 2008 105: 12944-12949.

Ringraziamenti :

Tutta la mia famiglia che mi ha pazientemente supportato in questi anni di studio

Prof. Tomaso Patarnello per gli interessanti spunti di discussione sui risultati delle analisi svolte.

Dottoressa Alba Mininni per la pazienza, la costanza e le sveglie antelucane.

Prof.ssa Valentina Zappulli per la visione e il commento dei vetrini.

Prof. Luca Bargelloni per lo spirito critico nella lettura della bibliografia.

Prof. F. Quaglio per il materiale bibliografico.