



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute  
Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione**

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in  
Medicina Veterinaria

**Indicatori di stress e crescita in salmone atlantico  
(*Salmo salar*): confronto fra diploidi e triploidi  
nella fase di smoltificazione**

**Relatrice**

Prof.ssa Lisa Maccatrozzo

**Correlatrici**

Prof.ssa Daniela Bertotto

Dott.ssa Martina Bortoletti

**Laureanda**

Elisa Fonsatti

Matricola n. 1121612

Anno Accademico 2020 – 2021



## Sommario

Riassunto.....	III
Abstract.....	V
<b>1. Introduzione</b> .....	<b>1</b>
1.1 L'acquacoltura.....	1
1.2 Salmone atlantico .....	5
1.3 La smoltificazione.....	11
1.4 Allevamento del salmone .....	15
1.5 Triploidia .....	17
1.6 La crescita nei pesci.....	21
1.6.1 L'ormone della crescita (GH) e il suo recettore (GHrec).....	22
1.6.2 I fattori di crescita insulino-simili (IGFs).....	23
1.6.3 La miostatina (MSTN).....	24
1.7 Lo stress nei pesci .....	24
1.7.1 Il cortisolo.....	25
1.7.2 Le proteine da shock termico (HSP).....	26
<b>2. Obiettivo della tesi</b> .....	<b>28</b>
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	<b>30</b>
3.1 Produzione e mantenimento dei lotti sperimentali.....	30
3.2 Campionamento .....	30
3.3 Analisi tramite <i>real-time</i> PCR .....	31
3.3.1 Protocollo di estrazione RNA .....	31
3.3.2 Quantificazione dell'RNA estratto .....	31
3.3.3 Retrotrascrizione.....	31
3.3.4 Primer impiegati.....	32
3.3.5 Protocollo per la <i>real-time</i> PCR.....	32
3.4 Dosaggio del cortisolo.....	33
3.5 Ibridazione in situ.....	35
3.6 Analisi statistica.....	36
<b>4. Risultati</b> .....	<b>38</b>
4.1 Risultati PCR .....	38
4.2 Risultati RIA.....	44
4.3 Risultati ibridazione <i>in situ</i> .....	44
<b>5. Discussione</b> .....	<b>48</b>
<b>6. Conclusioni</b> .....	<b>54</b>

<b>Riferimenti</b> .....	56
Bibliografia .....	56
Sitografia .....	66
<b>Appendice: protocollo di estrazione RNA</b> .....	67

## Riassunto

Negli ultimi anni, l'acquacoltura ha assunto un ruolo sempre più importante nella produzione alimentare ed è un settore economico in continuo sviluppo. A livello mondiale, la Norvegia è il settimo produttore di pesce derivante dall'acquacoltura, con un ruolo di primo piano nell'allevamento del salmone atlantico (*Salmo salar*).

Uno dei problemi dell'allevamento è rappresentato dalle fughe in mare e la conseguente ibridazione degli individui allevati con la popolazione selvatica. Una soluzione per ovviare il problema potrebbe derivare dall'impiego di animali triploidi, notoriamente sterili. Inoltre, l'impiego di animali triploidi consente di evitare anche casi di maturazione sessuale precoce, che comportano un aumento dei costi economici. Ciò nonostante, la triploidia porta con sé anche alcuni svantaggi: diversi studi hanno riportato non solo una maggiore incidenza delle deformità scheletriche, ma anche una mortalità più elevata e una crescita più lenta rispetto agli esemplari diploidi quando si applicano le condizioni di temperatura normalmente usate per i diploidi. Tuttavia, è possibile che intervenendo sulle condizioni di allevamento e sulla formulazione della dieta, si possano migliorare le prestazioni dei triploidi, in termini di crescita e salute.

Il presente studio ha come obiettivo la valutazione di eventuali cambiamenti fisiologici significativi associati alla triploidia, cambiamenti che potrebbero avere un impatto negativo sulla crescita, sul benessere e sulla sensibilità alle malattie dei salmoni, durante la smoltificazione. La smoltificazione è una trasformazione cruciale e delicata in *Salmo salar*, che permette l'adattamento dei giovanili alla vita nell'ambiente marino.

Pertanto, sono stati analizzati indicatori dello stress e della crescita in animali diploidi e triploidi, allevati in condizioni ambientali ottimali anche per questi ultimi, e alimentati con due tipologie di dieta formulate per provare a minimizzare le differenze osservate in salmoni con diversa ploidia.

Gli animali sono stati controllati a intervalli regolari e i campioni sono stati prelevati a cadenza mensile durante il periodo di smoltificazione, da ottobre a dicembre. Diverse tecniche sono state applicate per valutare i fattori di stress e della crescita nel salmone atlantico, utilizzando il muscolo come matrice. Per valutare lo stress, è stato esaminato il cortisolo tramite saggio radioimmunologico (RIA) e le heat shock proteins (HSP70) mediante *real-time* PCR. Per la crescita sono stati considerati l'ormone della crescita (GH) ed il suo recettore (GH-rec), il fattore di crescita insulino-simile (IGF-I) I e la miostatina (MSTN)

mediante *real-time* PCR. Inoltre, la presenza di RNA messaggero di IGF-I è stata rilevata *in situ* con l'RNAscope, una tecnologia innovativa e altamente sensibile, che ha permesso di localizzare a livello cellulare l'mRNA di IGF-I nel parenchima epatico.

In generale, le analisi hanno evidenziato variazioni legate al momento del campionamento piuttosto che alla dieta somministrata o alla ploidia, differenze compatibili e quindi ascrivibili al processo di smoltificazione. Questi risultati contribuiscono a supportare l'ipotesi di utilizzo di animali triploidi nelle produzioni di salmone.

Studi come questo sono necessari al fine di migliorare la produzione del salmone atlantico, ottimizzando i protocolli di allevamento e rispettando il benessere animale e la sostenibilità ambientale.

## Abstract

Aquaculture is the world's fastest growing food-producing sector and significantly contributes to the supply of fish for human consumption. Norway is the 7<sup>th</sup> worldwide producer of farmed fish with a leading role in the farming of Atlantic salmon (*Salmo salar*).

One of the main problems of salmon rearing is represented by farmed escapees breeding with the wild population. A solution to overcome this problem could derive from the use of artificially induced triploid animals, which are notoriously sterile. Furthermore, triploidy induction represents one of the easiest and suitable methods to avoid adverse effects of pre-harvest sexual maturation, such as reduced growth and flesh quality deterioration, reducing economic costs. Nonetheless, triploidy also has some disadvantages: several studies have reported a higher incidence of spinal deformities and mortality and slower growth of triploids than diploids when the temperature is within the upper limits for the range normally used with diploid. However, triploid performances, in terms of growth and health, can be improved by adjusting farming conditions and feeding regime.

The present study aims to evaluate any significant physiological changes associated with triploidy that could negatively impact salmon growth, welfare, and sensitivity to diseases during smoltification, which is a crucial and delicate transformation in *Salmo salar*, that allows young salmonids transition from freshwater to saltwater.

In this study indicator of stress and growth were analysed in diploid and triploid animals. The fishes were kept in optimal environmental conditions and fed two types of diets formulated to try to minimize the differences in salmon with different ploidy. The animals were checked at regular intervals and the samples were taken monthly, from October to December, focusing on the smoltification period. Radioimmunoassay (RIA) and Real Time PCR were used, respectively, to evaluate muscle cortisol levels and to assess growth hormone (GH) and its receptor (GHrec), insulin-like growth factor I (IGF-I), Myostatin (MSTN) and heat shock protein (HSP70) muscle gene expression. An in-situ hybridization was performed on liver's sections using a novel and highly sensitive multiplex nucleic acid technology called RNAscope<sup>®</sup>, which allows to detect and localize at the cellular level IGF-I mRNA in formalin-fixed paraffin-embedded organs. In general, the analyses revealed variations related to the moment of sampling rather than to the diet administered or to the ploidy, differences that are compatible and therefore attributable to the smoltification process. These results help support the hypothesis of the use of triploid animals in salmon production.

This study aims to offer useful information for the optimization of Atlantic salmon production protocols, respecting animal welfare and environmental sustainability.

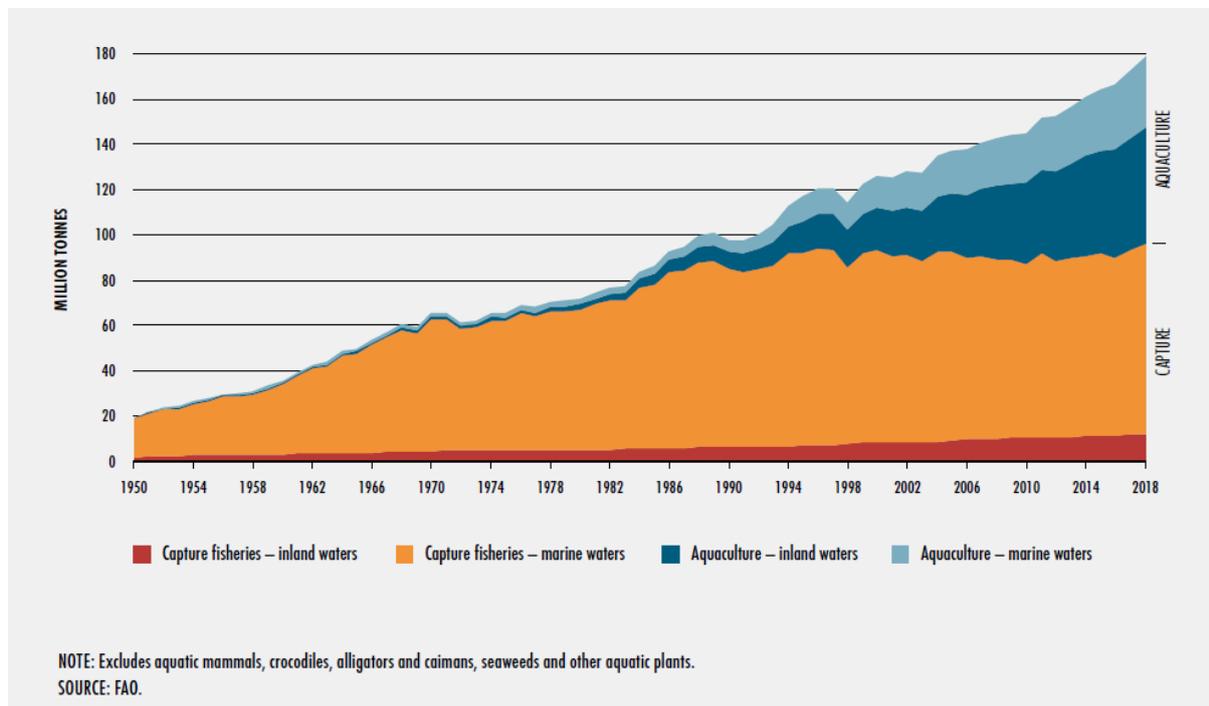
# 1. Introduzione

## 1.1 L'acquacoltura

L'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'Alimentazione e l'Agricoltura (FAO) nel 1988 diede la definizione di acquacoltura per differenziala in maniera chiara dalla pesca:

“L'acquacoltura è l'allevamento di organismi acquatici, compresi pesci, molluschi. L'allevamento implica che ci sia una qualche forma di intervento durante il processo di allevamento per migliorare la produzione, come l'alimentazione, la protezione dai predatori, ecc. L'allevamento implica che ci sia qualche forma di intervento nella gestione degli animali per migliorare la produzione come l'alimentazione, la protezione dai predatori, ecc. e implica anche la proprietà individuale o aziendale degli animali allevati.” (Edwards & Demaine, 1998)

L'acquacoltura riveste un ruolo sempre più importante nella produzione di alimento e occupazione. A livello mondiale, l'acquacoltura produce il 52% del pesce destinato al consumo umano e concorre per il 46% alla produzione ittica totale. Si stima che nel 2018 la produzione mondiale di pesce abbia raggiunto 179 milioni di tonnellate circa, delle quali 82 milioni provengono dall'acquacoltura (Fig. 1.1).

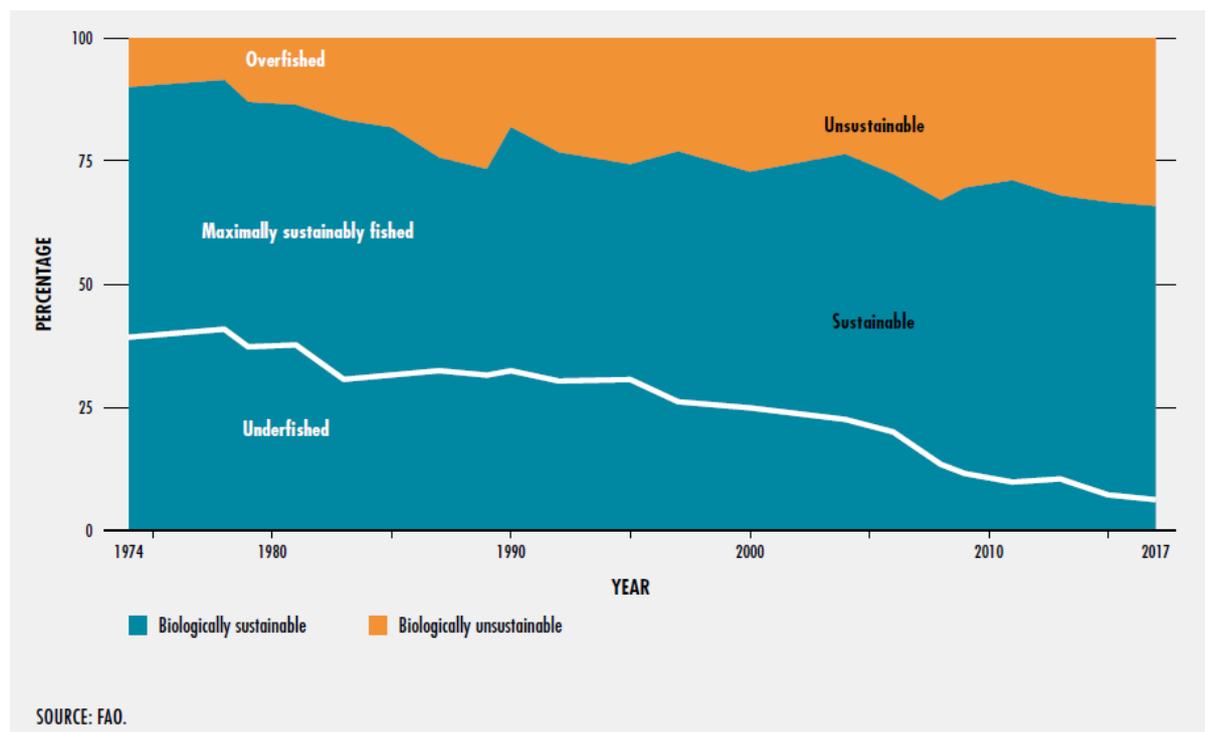


**Figura 1.1.** Produzione derivante dalle catture e dall'acquacoltura mondiali a confronto (FAO, 2020).

Dal 1961 al 2017, il consumo di pesce è aumentato con un tasso annuale del 3,1%, valore che risulta maggiore rispetto a quello di tutte le altre fonti proteiche di origine animale. Inoltre, il consumo di pesce assicura a circa 3,3 miliardi di persone l'assunzione di quasi il 20% di

proteine animali ed è in continuo aumento nella popolazione mondiale. Il pesce e i suoi derivati vengono apprezzati perché contengono proteine di alta qualità e amminoacidi essenziali, acidi grassi polinsaturi e micronutrienti. Il contributo del pesce in una dieta sana e diversificata assume una fondamentale importanza, soprattutto in paesi densamente popolati dove l'assunzione di proteine è bassa. In particolare, se si tratta di piccole isole di paesi in via di sviluppo, il pesce non solo rappresenta una fonte di proteine animali più economica, ma è anche preferito come sapore ad altre fonti proteiche e fa parte della tradizione di molti popoli (FAO, 2020).

Assieme al ruolo che il pesce ha nel fornire nutrimento, è importante considerare anche che le risorse ittiche marine sono in continua decrescita: infatti la percentuale di riserve ittiche il cui prelievo rientra nei limiti di sostenibilità biologica è scesa dal 90% (1974) al 65,8% (2017). La massima decrescita è avvenuta dal 1974 al 1989, per poi incrementare, condizione che riflette in parte le migliori misure gestionali. Tuttavia, da sola la pesca non può garantire il fabbisogno ittico, in continua crescita, senza danneggiare le riserve ittiche (Fig. 1.2).



**Figura 1.2.** Andamento mondiale dello stato di riserve marine di pesce, 1974-2017. Nel grafico sono rappresentate le percentuali degli stock marini in relazione alla sostenibilità nel passare degli anni (FAO, 2020).

L'acquacoltura ha assunto un ruolo rilevante nella produzione ittica, tanto che è giunta a fornire il 50% circa dei prodotti della pesca a livello mondiale, con un incremento annuo pari

al 7,5% dal 1970. Per di più, bisogna prevedere la possibilità di un'ulteriore crescita nei prossimi anni.

In acquacoltura si allevano pesci, crostacei e molluschi ed è presente un'importante produzione di alghe, per la maggior parte marine; in misura minore sono allevati anche altri animali, tra i quali rane, tartarughe e invertebrati acquatici. A tal fine, i sistemi di allevamento differiscono molto tra loro in termini di metodi, pratiche e strutture; le specie allevate sono sia d'acqua dolce che salate e gli impianti si possono trovare sia in terra ferma che in acque libere, delle quali quelle marine sono le più rappresentate. È possibile suddividere i vari sistemi in tre tipologie principali: acquacoltura in terra ferma, sulle coste e maricoltura. A livello mondiale la produzione in terra ferma supera quella della maricoltura e delle coste, mentre in Europa l'andamento è inverso, ovvero l'acquacoltura totale riceve un apporto maggiore dalla maricoltura e dall'acquacoltura costiera. Nel mondo sono allevate più di 466 specie differenti che comprendono anche altri animali oltre ai pesci. Non sono incluse le specie allevate per ricerca, cibo vivo per le avannotterie o animali a scopo ornamentale. Anche se c'è una grande varietà di specie allevate l'86,6% della produzione di pesce allevato deriva da 20 specie principali (Tabella 1.1).

	2010	2012	2014	2016	2018	2018 share
	(thousand tonnes)					(percentage)
<b>Finfish</b>						
Grass carp, <i>Ctenopharyngodon idellus</i>	4 213.1	4 590.9	5 039.8	5 444.5	5 704.0	10.5
Silver carp, <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	3 972.0	3 863.8	4 575.4	4 717.0	4 788.5	8.8
Nile tilapia, <i>Oreochromis niloticus</i>	2 657.7	3 342.2	3 758.4	4 165.0	4 525.4	8.3
Common carp, <i>Cyprinus carpio</i>	3 331.0	3 493.9	3 866.3	4 054.7	4 189.5	7.7
Bighead carp, <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	2 496.9	2 646.4	2 957.6	3 161.5	3 143.7	5.8
Catla, <i>Catla catla</i>	2 526.4	2 260.6	2 269.4	2 509.4	3 041.3	5.6
<i>Carassius</i> spp.	2 137.8	2 232.6	2 511.9	2 726.7	2 772.3	5.1
Freshwater fishes nei, <sup>1</sup> Osteichthyes	1 355.9	1 857.4	1 983.5	2 582.0	2 545.1	4.7
Atlantic salmon, <i>Salmo salar</i>	1 437.1	2 074.4	2 348.1	2 247.3	2 435.9	4.5
Striped catfish, <i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	1 749.4	1 985.4	2 036.8	2 191.7	2 359.5	4.3
Roho labeo, <i>Labeo rohita</i>	1 133.2	1 566.0	1 670.2	1 842.7	2 016.8	3.7
Milkfish, <i>Chanos chanos</i>	808.6	943.3	1 041.4	1 194.8	1 327.2	2.4
Torpedo-shaped catfishes nei, <i>Clarias</i> spp.	343.3	540.8	867.0	961.7	1 245.3	2.3
Tilapias nei, <i>Oreochromis</i> (=Tilapia) spp.	472.5	693.4	960.8	972.6	1 030.0	1.9
Rainbow trout, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	752.4	882.1	794.9	832.1	848.1	1.6
Wuchang bream, <i>Megalobrama amblycephala</i>	629.2	642.8	710.3	858.4	783.5	1.4
Marine fishes nei, Osteichthyes	467.7	567.2	661.0	688.3	767.5	1.4
Black carp, <i>Mylopharyngodon piceus</i>	409.5	450.9	505.7	680.0	691.5	1.3
Cyprinids nei, Cyprinidae	639.8	601.1	628.0	596.1	654.1	1.2
Yellow catfish, <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	177.8	233.7	302.7	434.4	509.6	0.9
Other finfishes	6 033.9	6 869.3	7 730.0	8 217.1	8 900.2	16.4
<b>Finfish total</b>	<b>37 745.1</b>	<b>42 338.2</b>	<b>47 219.1</b>	<b>51 078.0</b>	<b>54 279.0</b>	<b>100</b>

**Tabella 1.1.** Principali specie di pesci prodotte in acquacoltura a livello mondiale (FAO, 2020).

Il numero di specie di crostacei, molluschi e altri animali acquatici è inferiore rispetto alle specie di pesce allevate.

A livello mondiale la produzione di acquacoltura è dominata dall'Asia e, dal 1991, la sola Repubblica Popolare Cinese (di seguito Cina) produce più alimenti derivanti dall'acquacoltura rispetto a tutto il resto del mondo. La produzione in terra ferma è dominata da paesi come Cina, India e Indonesia con pesci di acqua dolce, tra cui diverse specie appartenenti alle famiglie dei Ciprinidi e dei Ciclidi. Invece, un piccolo numero di paesi membri dell'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OECD) come Norvegia, Cile, Giappone, Regno Unito e Nord Irlanda, Canada e Grecia sono i principali produttori di specie marine allevate in maricoltura, in particolare di salmonidi (FAO, 2020).

La produzione derivante dall'acquacoltura in Unione Europea, considerando i 27 Stati membri (EU-27) è incentrata soprattutto su mitili, trote, ostriche, orate, spigole, carpe, vongole, tonni salmone e rombi. La trota iridea è la prima per valore economico apportando il 17% del totale

in EU-27, seguita da spigola, orata, ostriche e tonno. Considerare unicamente l'EU-27 però non offre una visione completa della situazione in Europa, infatti, la Norvegia da sola nel 2018 ha prodotto più dell'intera Unione Europea ovvero ha prodotto 1,4 milioni di tonnellate di organismi acquatici, rappresentati quasi unicamente da salmone atlantico. Dal 2008 al 2018 il volume derivante dall'acquacoltura in Unione Europea è rimasto relativamente stabile, mentre la Norvegia ha visto un incremento sia nella produzione che nel valore della sua produzione di acquacoltura (dati Eurostat 2018-2019).

## 1.2 Salmone atlantico

*Salmo salar* (Linnaeus, 1758), conosciuto in italiano con il nome di salmone atlantico, è un pesce teleosteo appartenente alla classe degli Actinopterygii, ordine Salmoniformes, famiglia Salmonidae. È una specie anadroma, ovvero passa la sua vita da adulto nelle acque salate ma, una volta raggiunta la maturità sessuale, migra verso le acque dolci dove si riproduce, nasce e trascorre la prima fase della sua vita. Il salmone atlantico presenta otto pinne: le due ventrali in posizione addominale, due pinne dorsali di cui una è un piccolo peduncolo adiposo (caratteristica in comune con gli altri salmonidi), due pinne pettorali sono di piccole dimensioni e la pinna anale di dimensioni analoghe alla prima pinna dorsale. La pinna caudale è forcuta con i due lobi appuntiti, la biforcazione è particolarmente evidente negli individui giovani e tale carattere in animali minori di 20 cm è un fattore che lo differenzia da altri salmonidi. Il corpo è allungato e appiattito in senso latero-laterale ed è ricoperto da piccole scaglie. Nel maschio adulto è presente il rostro, un prolungamento della mascella inferiore che lo rende distinguibile dalle femmine. La livrea cambia tra acqua dolce e salata, in acqua dolce il salmone presenta fianchi verdastro-marrone, con piccole macchie di color di rosso-arancione e con grandi macchie scure con bordi più chiari. In acqua salata, a seguito del processo di smoltificazione, i fianchi diventano argentei, il ventre bianco. Al di sopra della linea laterale sui fianchi sono visibili delle macchie scure. Per distinguere gli adulti da altri salmonidi marini si può guardare la parte posteriore del vomero, ovvero l'osso che forma la parte anteriore della cavità orale superiore, che si presenta in questa specie privo di denti. (Kottelat & Freyhof, 2007).

L'Oceano Atlantico è l'areale principale di distribuzione del salmone atlantico. Nell'Oceano Atlantico settentrionale la specie occupa zone temperate e artiche dell'emisfero settentrionale (Rochard & Elie, 1994). Nell'Atlantico occidentale si ritrova dal Québec settentrionale, Canada, al Connecticut e New York, USA, era presente anche nell'entroterra,

nel Lago Ontario, dove ora però è stato eradicato (Page & Burr, 1991). Nell'Atlantico orientale si ritrova nei bacini del Mar Bianco e del Mare di Barents attraverso l'Europa nord-orientale fino ai bacini del Mar Baltico e del Mare del Nord, compresa l'Islanda. È stato introdotto in Nuova Zelanda, Cile, Argentina meridionale (Kottelat & Freyhof, 2007).

Per parte della sua vita il salmone atlantico vive in acque dolci (Rochard & Elie, 1994) in particolare in fiumi e laghi dove la temperatura supera i 10°C per tre mesi l'anno e non supera i 20°C se non per poche settimane, la temperatura ideale è di 4-12°C (Kottelat & Freyhof, 2007). I giovanili rimangono nelle acque dolci per almeno un anno, ma alcuni non iniziano la migrazione prima di tre. Raggiungono le coste marine o l'oceano e, una volta raggiunta la maturità sessuale, tornano a deporre le uova in acqua dolce; perché questo si realizzi possono passare da uno a cinque anni (Rochard & Elie, 1994).

Il salmone atlantico è una specie iteropara, si tratta dunque di un animale che si riproduce più volte durante il corso della sua vita (Hansen & Quinn, 1998). Gli adulti depongono le uova in acqua dolce in autunno; le uova sono demersali e vengono ricoperte con ghiaia del fondale per essere protette nel lungo periodo di incubazione invernale, mentre gli avannotti (*fry*) emergono in primavera (Fleming, 1996) (Fig. 1.3). Per la deposizione è stata notata una preferenza per i luoghi in cui la profondità è decrescente e la corrente aumenta; la femmina scava un nido dove deporre le uova e per la sopravvivenza degli embrioni è fondamentale la porosità del substrato affinché sia garantito un flusso di ossigeno adeguato per rimuovere i cataboliti (Gibson, 1993). Alla schiusa, le larve prendono il nome di *aleveins* e quando il sacco vitellino è stato completamente assorbito vengono denominati *fry* ed emergono dal fondale, soprattutto di notte, per cercare acque che scorrono lente e fino alla prima estate sembra che non si allontanino molto e compiano solo minimi movimenti (McCormick et al., 1998).



**Figura 1.3.** Fry di *Salmo salar*. Fonte: Peter Steenstra at the Green Lake National Fish Hatchery, Public domain, tramite Wikimedia Commons.

Gli avannotti crescono in acqua dolce raggiungendo lo stadio di *parr* (fig. 1.4) fino a quando non iniziano la trasformazione necessaria per adattarsi alla vita in acqua salata e che segna l'inizio della migrazione verso il mare (Hansen & Quinn, 1998).



**Figura 1.4.** Parr di *Salmo salar*. Fonte: Per Harald Olsen/NTNU 2012. Da Wikipedia. Creative Commons, CC-BY-SA.

Nel loro secondo anno i *parr* si ritrovano anche in zone con correnti più rapide e substrati più grossolani (Gibson, 1993) inoltre, pare che sviluppino una tendenza a difendere il proprio territorio (McCormick et al., 1998). Spesso si spostano in piccoli affluenti durante l'estate e possono rimanervi finché non diventano *smolt* un anno più tardi. Queste zone hanno substrati più grossolani rispetto a dove vengono scavati i nidi per la deposizione e fecondazione delle uova e presentano maggiori fonti di cibo e un habitat invernale migliore; per evitare il caldo possono spostarsi in affluenti più freddi (McCormick et al., 1998). Si è visto che qualche *parr* raggiunge la maturità sessuale e si sposta anche verso i siti dove le femmine adulte deporranno le uova e sono in grado di fecondare le uova (Buck & Youngson, 1982). I *parr* di solito sfruttano gli spazi tra o sotto le rocce per proteggersi, in particolare questo comportamento si vede durante il giorno. In alcuni affluenti di acque sorgive i *parr*, destinati a diventare *smolt* la primavera successiva, possono iniziare a muoversi spostandosi a valle, senza necessariamente giungere agli estuari (McCormick et al., 1998).

La fase di trasformazione da *parr* a *smolt*, chiamata appunto smoltificazione, e la fase successiva, quando gli *smolt* lasciano i fiumi, sono periodi critici per la sopravvivenza in mare e pertanto sono fasi a cui prestare particolare attenzione (Hansen & Quinn, 1998). È stato evidenziato che le dimensioni degli *smolt* possono variare molto all'interno delle popolazioni

e dipendono anche dal tasso di crescita; i più grandi possono superare i 20 cm di lunghezza (Klemetsen et al., 2003) (Fig. 1.5).



**Figura 1.5.** *Smolt* di *Salmo salar*. Fonte: Nicolás from seno de reloncaví, Chile. Wikimedia Commons. CC BY-SA 2.0.

Gli *smolt* lasciano le acque dolci e i *post-smolt* migrano nell'oceano durante la tarda primavera e l'inizio dell'estate. Fino all'entrata nelle acque marine i movimenti sembrano dipendere dalla velocità e direzione delle correnti della superficie; i *post-smolt* entrano rapidamente nell'oceano dopo una fase di movimenti passivi guidati dalle correnti tidali, la permanenza a livello di estuario sembra essere relativamente breve (Hansen & Quinn, 1998). Durante il periodo trascorso in acqua dolce e la migrazione imparano odori specifici di quei luoghi, che poi ricercheranno anni dopo da individui maturi (Fig. 1.6).



**Figura 1.6.** Maschio adulto di *Salmo salar*. Fonte: Hans-Petter Fjeld. Da Wikimedia. CC BY-SA.

Nella fase di smoltificazione sono particolarmente sensibili all'apprendimento di odori (McCormick et al., 1998). Potrebbe essere l'atto stesso della migrazione a incentivare l'apprendimento olfattivo, poiché l'esposizione a nuovi odori può stimolare gli ormoni tiroidei associati alla smoltificazione e all'imprinting (Dittman & Quinn, 1996). La sopravvivenza in acqua salata è molto variabile in quanto diversi fattori possono influenzare la mortalità dei salmoni in questa fase, tra cui malattie, predazione e la possibile scarsità di risorse alimentari. I salmoni lasciano l'oceano dopo 1-4 anni, non si conoscono i fattori che danno inizio alla migrazione verso il fiume d'origine, ma è noto che i salmoni hanno ritmi ciclici di ormoni riproduttivi che vengono sincronizzati dal fotoperiodo (Hansen & Quinn, 1998). Esiste una relazione tra l'età dell'animale e l'inizio della migrazione, i gruppi con gli animali più anziani tendono a fare ritorno prima nell'anno (Struthers et al., 1987). L'olfatto in mare aperto probabilmente ha un ruolo minore nell'orientamento del salmone, mentre nella fase finale in acqua dolce è importante per guidare l'animale (Hansen & Quinn, 1998). Nella fase di ritorno al fiume di nascita e di riproduzione i salmoni usano una parte importante di riserve energetiche. Il tasso di sopravvivenza dopo la riproduzione varia tra le diverse popolazioni di salmone atlantico (Jonsson et al., 1997). Una volta giunti al fiume dove sono nati, le femmine deporranno le uova che verranno fecondate dai maschi e il ciclo riparte (Gibson, 1993).

Esistono anche degli individui non anadromi e che per tanto non migreranno mai durante l'intera durata della loro vita. Sono state trovate popolazioni di questo tipo in entrambi i versanti dell'Oceano Atlantico. Tali individui possono essere stabili in acqua dolce perché bloccati da barriere fisiche, ma esistono anche casi di popolazioni simpatriche con salmoni anadromi che condividono un areale fluviale con libero accesso al mare. Altri tratti che presentano notevole variazione sono il tempo di permanenza in acqua dolce, l'età e la dimensione al momento della smoltificazione e l'età in cui raggiungono la maturità sessuale (Klemetsen et al., 2003). La smoltificazione, la sopravvivenza invernale e la maturazione richiedono alti livelli di energia e pertanto il nutrimento e la crescita sono di primaria importanza durante la vita in acqua dolce; i movimenti effettuati dai giovanili sono soprattutto associati al massimo ottenimento di cibo e a trovare un habitat che gli permetta di evitare i predatori (McCormick et al., 1998).

### 1.3 La smoltificazione

La smoltificazione è un delicato e complesso processo di cambiamenti fisiologici, morfologici e comportamentali che permette la transizione dei giovani salmoni dall'acqua dolce all'acqua salata. Questi cambiamenti, fondamentali per la migrazione e la successiva fase di vita marina, sarebbero dannosi per la vita in acqua dolce, pertanto se l'animale non dovesse completare il viaggio verso il mare le modificazioni fatte verranno parzialmente invertite; tale processo viene definito desmoltificazione (Stefansson et al., 2008). Ci sono prove che la smoltificazione e la sua stagionalità siano un processo con un importante ritmo endogeno, ma si è evidenziato che anche fattori ambientali hanno rilevanza per completare la smoltificazione (Stefansson et al., 2008). Tra i parametri ambientali il fotoperiodo è molto importante (Stefansson et al., 1991), in particolare il cambiamento sembra essere stimolato dall'aumento della durata del giorno (Berrill et al., 2003). Anche la temperatura ha un'influenza per la buona riuscita della trasformazione; si è visto che la durata del periodo di smoltificazione ottimale, determinato tramite la misurazione dell'attività  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPasi a livello branchiale, è approssimativamente di 30 giorni, tra i 12 e 10°C (Stefansson et al. 1998). L'interazione tra parametri ambientali e caratteri endogeni che controllano la smoltificazione è regolata dal sistema neuroendocrino. (Stefansson et al., 2008).

È stato evidenziato come l'inizio della smoltificazione e l'aumento del tasso di crescita siano collegati al raggiungimento della lunghezza soglia del *parr* al momento dello stimolo di luce invernale. Questo valore si aggira intorno ai 75 mm, ma può variare tra le diverse popolazioni

di salmoni. I giovani salmoni che raggiungono questa taglia critica avranno un tasso di crescita maggiore e la loro trasformazione inizierà la primavera seguente (Skilbrei, 1991).

Durante il periodo di smoltificazione avvengono dei cambiamenti morfologici. Il corpo esternamente diventa argentato e il margine delle pinne si incurisce. Questo cambiamento di colorazione è mediato dagli ormoni tiroidei (Björnsson et al., 2011). Il colore argenteo deriva dalla deposizione di cristalli di guanina e ipoxantina sulla cute e sulle scaglie. Questi cristalli sono un prodotto del catabolismo proteico e per questo riflettono il cambio del metabolismo proteico che avviene stagionalmente (Wedemeyer et al., 1980). La diversa colorazione è una delle caratteristiche più usate per distinguere gli *smolt* dai *parr* (Wedemeyer et al. 1980). L'argentatura riflettente è comune a molti pesci pelagici ed è presumibilmente un adattamento per evitare i predatori (McCormick et al., 1998).

Con la smoltificazione avvengono anche dei cambiamenti comportamentali. Gli *smolt* sviluppano reotassi negativa per cui si orienteranno verso valle, diminuisce il comportamento agonistico e territoriale e mostrano maggiore preferenza per un ambiente salino (McCormick et al., 1998). Esiste un'interazione tra i meccanismi fisiologici e comportamentali: lo stress osmotico dovuto al cambiamento di ambiente da dolce a salino è stato correlato al comportamento anti-predatorio degli *smolt* (Handeland et al., 1996). Inoltre, rispetto ai *parr*, che hanno un comportamento bentonico e territoriale, gli *smolt* hanno un atteggiamento pelagico e hanno la tendenza a nuotare in banchi (Handeland et al., 1996). Anche se si è visto che la risposta osmoregolatoria varia in ogni individuo, *smolt* più stressati hanno una tendenza minore a nuotare in banchi, perché i vantaggi, per esempio la maggiore vigilanza, diventano minori rispetto agli svantaggi, come la costante attività natatoria (Handeland et al., 1996).

I pesci d'acqua dolce sono iperosmoregolatori, poiché i liquidi corporei sono più concentrati rispetto a quelli dell'ambiente circostante, devono affrontare l'assorbimento osmotico passivo di acqua e la perdita di ioni attraverso l'epitelio branchiale che è permeabile. Questi movimenti osmotici e ionici potenzialmente dannosi vengono compensati dall'escrezione di volumi relativamente grandi di urina diluita e dall'assorbimento attivo di ioni attraverso l'epitelio branchiale. I pesci marini sono ipoosmoregolatori perché l'acqua di mare è più concentrata rispetto ai liquidi corporei, devono affrontare la perdita osmotica di acqua e l'entrata per diffusione di ioni tramite le branchie. I meccanismi di compensazione in questo caso comprendono l'ingestione di acqua marina, l'assorbimento intestinale di ioni e acqua,

l'escrezione di piccoli volumi di urina isotonica (dopo il riassorbimento intestinale di Na, Cl e acqua) e la secrezione attiva di sali attraverso l'epitelio delle branchie (Evans, 2008) e l'escrezione di cationi bivalenti, come il magnesio e il solfato, per via renale (Takvam et al., 2021). Il salmone, che vive per la prima parte della sua vita in acqua dolce e poi migra verso il mare dovrà affrontare anche un cambiamento nella sua capacità di osmoregolazione. Prima della trasformazione in *smolt*, i *parr* hanno una tolleranza relativamente scarsa all'acqua marina e il trasferimento diretto di un *parr* in acqua salata risulta in una perturbazione osmotica che aumenta la mortalità e riduce la crescita (Stefansson et al., 2008).

Le branchie assumono un ruolo fondamentale nell'osmoregolazione poiché sono l'organo primario per il trasporto attivo di ioni monovalenti. Durante l'entrata in acqua marina aumenta l'attività delle  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasi branchiali, coinvolte nell'escrezione di ioni monovalenti dal sangue, che contribuiscono ad aumentare l'aumento di trasporto di fluido a livello intestinale (Stefansson et al., 2008). Inoltre, c'è un incremento delle cellule a cloruri nell'epitelio branchiale e sotto-opercolare (Breves et al., 2017). Le cellule a cloruri, o ionociti branchiali, sono caratterizzate da numerosi mitocondri e un sistema tubulare esteso che si continua con la membrana basolaterale. Quando il salmone si trova in acqua salata, le cellule a cloruri di solito sono più grandi e presentano una cripta apicale profonda, mentre quando si trova in acqua dolce le stesse cellule presentano una vasta superficie apicale e numerosi microvilli (Stefansson et al., 2008).

La smoltificazione è coordinata dal sistema endocrino e include, oltre alla capacità di ipoosmoregolare, una serie di cambiamenti morfologici, biochimici, fisiologici e comportamentali, che migliorano l'adattamento allo stadio di vita pelagico e marino (Björnsson et al., 2011). L'inizio della smoltificazione viene stimolato dall'aumento della durata del giorno che genera una risposta neuroendocrina attivando l'asse luce-cervello-ipofisi nei giovanili (Nisembaum et al., 2021). Diversi ormoni sono coinvolti nel processo di adattamento alle diverse salinità. I principali sembrano essere l'ormone della crescita (GH), il fattore di crescita insulino simile I (IGF-I), il cortisolo ed infine la prolattina. Il GH è un ormone fondamentale implicato in vari processi i principali quali la crescita, lo sviluppo e il metabolismo in tutti i vertebrati e nei pesci è coinvolto nell'osmoregolazione e nell'adattamento a diverse salinità; alcune sue azioni sono mediate dall'IGF-I. Il GH e l'IGF-I stimolano il numero e/o la dimensione delle cellule a cloruri nei salmonidi (Sakamoto & Hirano, 1993). Le cellule a cloruro sono delle cellule ricche di mitocondri presenti nelle

branchie dei teleostei e contribuiscono all'osmoregolazione; nei pesci sono di due tipi, le cellule alfa-cloruro e le cellule beta-cloruro (Prunet et al., 1994). Il GH nel salmone atlantico aumenta il numero di cellule alfa-cloruro e cellule accessorie (entrambe ritenute coinvolte nella secrezione di sale) e riduce, invece, il numero di cellule beta (si presume siano coinvolte nell'assorbimento di ioni) (McCormick, 2001). I livelli plasmatici di GH aumentano successivamente all'esposizione in acqua marina e così anche il cortisolo (McCormick, 2011), i tre ormoni integrano le loro azioni per regolare la secrezione di sali. Il numero di recettori del cortisolo presenti nelle branchie è fortemente correlato con la capacità del cortisolo stesso di stimolare le  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasi branchiali (McCormick, 2001). Inoltre, il cortisolo aumenta il numero di ionociti branchiali, agendo sulla loro differenziazione (McCormick, 2001). Tra il cortisolo e il GH c'è un'interazione positiva che comporta un aumento della tolleranza all'acqua salata (Nisembaum et al., 2021). Infatti, il GH causa una proliferazione generale delle cellule staminali nelle branchie su cui poi il cortisolo agisce (McCormick, 2001). La prolattina è un ormone che interviene sull'osmoregolazione in acqua dolce e agisce a livello di membrana branchiale riducendo i tassi di scambio di acqua e di ioni; aumenta durante lo sviluppo iniziale degli *smolt* e diminuisce con l'avanzare della smoltificazione (Young et al., 1989; McCormick, 2011). Nel salmone atlantico è stato evidenziato anche un ruolo della tiroxina (T4) nell'aumentare l'attività delle  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasi branchiali e il numero di cellule a cloruri. Gli ormoni tiroidei svolgono un ruolo di supporto nell'acclimatazione all'acqua di mare e possono interagire sia con l'asse GH/IGF-I che con il cortisolo (McCormick, 2001).

Nel 1958 Parry evidenziò una correlazione tra il tasso di crescita e la smoltificazione. Un aumento della durata delle ore di luce causa un aumento significativo di ormone della crescita (GH) e di cortisolo negli *smolts*, ma non nei *parr* (McCormick et al., 2007). Il fotoperiodo è, infatti, uno dei principali fattori di controllo nello sviluppo degli *smolt*, attraverso un "asse luce-ipofisi" che attiva le cellule dell'ipofisi anteriore produttrici di GH (McCormick et al., 2007). L'asse GH/IGF può essere modificato da fattori ambientali che possono stimolare l'attività ormonale e modificare la produzione dell'IGF-I. L'IGF agisce poi con un meccanismo di feedback negativo e inibisce la secrezione di GH a livello ipofisario (Dickhoff et al., 1997). L'asse GH/IGF-I presenta una maggiore attività al picco di smoltificazione e le azioni del GH sembrano essere mediate da molteplici vie molecolari che comprendono i recettori del GH branchiali, la secrezione di IGF-I nel fegato e la sua produzione locale nelle branchie. L'IGF-I interagisce con proteine chiamate di legame IGF (IGFBPS; IGF *binding proteins*) (Cunming

Duan et al., 2010). Le IGFbps modulano l'azione dell'IGF; i salmonidi hanno diverse IGFbps e pare che alcune in particolare siano importanti per la smoltificazione e l'adattamento all'acqua di mare (Breves et al., 2017).

Già nel 1939, Hoar riportò il coinvolgimento degli ormoni tiroidei nella smoltificazione di *Salmo salar*, in particolare evidenziò l'attivazione tiroidea a livello istologico. Gli ormoni tiroidei sono elevati durante il processo di smoltificazione e vi sono prove del loro ruolo nei cambiamenti sia morfologici (argentatura) che comportamentali (migrazione a valle) (Ojima & Iwata, 2007). Nel corso della smoltificazione si è osservato un aumento della tiroxina (T4) circolante. La sua forma più attiva, invece, la triiodotironina (T3) ha un intervallo di oscillazioni minore (McCormick et al., 2007). Gli ormoni tiroidei nei teleostei hanno un ruolo di promotori per la mobilitazione dei lipidi, stimolano la sintesi proteica e influenzano il metabolismo dei carboidrati. Queste azioni portano ad una diminuzione dei lipidi corporei, a cambiamenti nella composizione amminoacidica dei muscoli e aumentano il galleggiamento (Folmar & Dickhoff, 1980).

I livelli di cortisolo aumentano in maniera significativa durante la smoltificazione. Dopo il trasferimento in acqua marina, il livello di cortisolo diminuisce progressivamente all'aumentare dell'acclimatazione all'acqua salata (Langhorne & Simpson, 1986). Il GH contribuisce ad aumentare la secrezione del cortisolo durante la smoltificazione tramite l'aumento della sensibilità delle cellule interrenali all'ormone adrenocorticotropo (ACTH), il quale stimola la produzione dei glucocorticoidi nelle stesse cellule e un aumento dei recettori dei glucocorticoidi, in particolare a livello branchiale (Nisembaum et al., 2021). Il cortisolo ha un'interazione sinergica con il GH che permette di aumentare l'attività delle  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasi branchiali e questa azione sembra suggerire che l'aumento della concentrazione dei recettori corticosteroidi sia un potenziale meccanismo per tale interazione (Mancera & McCormick, 2019). L'aumento di questi recettori rende più sensibile la risposta branchiale al cortisolo che risulta in un'attività enzimatica più elevata (Shrimpton & McCormick, 1998).

#### 1.4 Allevamento del salmone

Il salmone atlantico è la specie allevata in acquacoltura più significativa in Europa, sia in termini di biomassa che di valore economico. I principali produttori europei sono la Norvegia, seguita da Scozia e Irlanda. All'inizio degli anni '70 si ebbe l'avvio dell'industria dell'acquacoltura del salmone nell'Atlantico e da allora vari programmi di allevamento e riproduzione sono stati stabiliti in tutto il mondo. Il salmone atlantico d'allevamento è stato

sottoposto a selezione genetica per caratteristiche economicamente importanti, quali crescita, maturazione tardiva, resistenza alle malattie e parametri di qualità (come il colore della carne e la percentuale di grasso) (Glover et al., 2009).

L'allevamento del salmone atlantico prevede che una parte del ciclo sia mantenuta in acqua dolce e l'altra in acqua salata. I riproduttori vengono tenuti in acqua dolce per garantire una migliore biosicurezza grazie al movimento unidirezionale di pesci dall'acqua dolce alle gabbie in mare, riducendo al minimo il rischio di diffusione delle malattie dagli impianti di produzione dell'acqua di mare agli incubatoi di acqua dolce. È importante che siano mantenuti a basse densità e l'acqua sia di elevata qualità (Purser, 2003). Stando ai dati raccolti dall'EFSA densità superiori ai 20 kg/m<sup>3</sup> sono collegate ad un maggior rischio di scarso benessere e l'acqua deve avere valori di ammoniaca non superiori ai 0,02 mg/L e i nitrati non dovrebbero eccedere i 20 µg/L (Algers et al., 2008). Per una buona qualità delle uova è fondamentale che la temperatura dell'acqua sia ottimale e vanno evitate le alte temperature (Purser, 2003); i valori ideali per i riproduttori sono tra gli 8°C e i 12°C (Algers et al., 2008). Le uova vengono raccolte tramite il processo di spremitura che di solito viene fatto manualmente. Le cellule spermatiche vengono poi unite alle uova, all'interno di catini ed è bene evitare di attivarle tramite il contatto con l'acqua prima della fecondazione delle uova poiché, una volta attivate, la loro motilità ha una durata breve di 0,5-2 minuti (Purser, 2003). Una volta fecondate le uova vanno lavate e lasciate 40-60 minuti in acqua nei catini, trascorso questo tempo vanno spostate negli incubatoi. Il tasso di fecondazione e sopravvivenza può essere controllato dopo due giorni dal rilevamento della blastocisti. L'apporto di ossigeno deve essere superiore al 70% (Algers et al., 2008). È possibile accelerare lo sviluppo delle uova aumentando, restando sempre nei limiti accettabili, la temperatura dell'acqua; è importante fare attenzione ed evitare uno sviluppo troppo rapido poiché causerebbe perdita di uova, deformità o larve di bassa qualità (Purser, 2003). Le temperature per l'incubazione usate di solito nell'industria sono fino ad un massimo di 8°C per la prima fase, fino alla comparsa dell'occhio e non maggiori di 10°C fino alla schiusa (Algers et al., 2008). È importante nella fase di larva garantire la massima crescita poiché i *fry* sono più facili da gestire se pesano 0,2-0,7 g. I *fry* diventeranno *parr*, che vengono allevati in gabbie o in vasche. Il focus centrale dell'allevamento del salmone è la produzione di *smolt* che possano venir trasferiti in acqua salata dove verranno trasferiti una volta completata la smoltificazione. Il metodo più usato per l'allevamento degli *smolt* sono le gabbie marine. Gli *smolt* vengono trasferiti agli impianti di acqua di mare in periodi dell'anno

adatti, ossia durante la loro "finestra di smoltificazione", ovvero in primavera per il salmone atlantico (Purser, 2003).

Uno dei maggiori problemi nell'allevamento del salmone è rappresentato dalle fughe di animali allevati; prevenire questi eventi è importante per tutelare l'ambiente poiché il rischio è che avvenga un'ibridazione tra gli animali selvatici e quelli scappati dagli allevamenti e che ci sia un impatto sulle popolazioni presenti in natura. Una volta che i pesci sono scappati è difficile intervenire e recuperarli; quindi, è necessario agire a monte del problema. La riduzione dell'impatto sulle popolazioni selvatiche dei pesci d'allevamento che sono fuggiti si basa soprattutto su un efficace contenimento fisico e sulla gestione operativa. L'uso di stock sterili ("contenimento riproduttivo") può essere utile come supporto a queste misure, garantendo che i pesci fuggiti non possano riprodursi in natura. Ad oggi l'unico metodo che sia usufruibile in grande scala nei salmoni di allevamento per il contenimento riproduttivo è la triploidia indotta (Benfey, 2016) e quindi ottenere degli individui con un set di cromosomi in più rispetto alla normale popolazione di salmoni che è, invece, diploide. La triploidia presenta anche altri vantaggi poiché la maturazione sessuale è spesso associata con un'incidenza più alta di malattie e, in particolare in diversi salmonidi, cambiamenti organolettici delle carni (Piferrer et al., 2009)

### 1.5 Triploidia

Con il termine poliploidia si indica un organismo che possiede uno o più set di cromosomi addizionali rispetto al numero che più frequentemente viene rilevato in natura per una data specie (Benfey, 2011). La maggior parte degli animali in natura sono diploidi, ovvero possiedono un duplicato di cromosomi omologhi nelle cellule somatiche, una condizione evoluta insieme alla gametogenesi attraverso la divisione cellulare meiotica (Piferrer et al., 2009). La poliploidia può avvenire come evento spontaneo in natura o può essere indotta dall'uomo in invertebrati ed alcuni vertebrati (Benfey, 2011). Dunque, i triploidi sono animali che possiedono un set di cromosomi addizionale, ovvero le loro cellule hanno tre set completi di cromosomi (Piferrer et al., 2009).

Benfey e collaboratori (1986) hanno dimostrato che gli individui maschi e triploidi di *Salmo gairdneri* producono spermatozoi aneuploidi, presentano uno spermatocrito significativamente più basso e hanno testicoli più piccoli rispetto agli individui diploidi, ma comunque sviluppano caratteri sessuali secondari normali. Si è visto che individui triploidi maschi di *S. salar* mostrano comportamento riproduttivo, ma il tasso di concepimento è

comunque basso e le uova prodotte presentano un sacco vitellino di scarsa qualità che difficilmente porterebbe allo sviluppo e sopravvivenza dell'embrione (Fjelldal et al., 2014). Le femmine triploidi sono sterili, non producono gameti ed istologicamente è stato osservato che l'ovaio non è maturo (Murray et al., 2018). Da vari studi è dunque emersa la possibilità di utilizzare popolazioni triploidi interamente di sesso femminile per reprimere tutti gli aspetti della maturazione sessuale (Benfey, 2016). Un altro vantaggio della mancata maturazione è la potenziale crescita più rapida poiché l'energia non viene spesa per lo sviluppo delle gonadi, ma può andare direttamente al muscolo (Taylor et al., 2014). I triploidi, soprattutto nella fase di *smolt*, hanno un maggior tasso di accrescimento perché non impiegano energia nella riproduzione ed è, quindi, resa disponibile per l'aumento di peso inoltre, presentano un maggior contenuto lipidico corporeo (Nuez-Ortín et al., 2017).

Si può indurre la triploidia nei pesci applicando uno shock durante la seconda divisione meiotica. Lo shock, chimico o fisico, impedisce la divisione cellulare e previene l'estrusione del secondo corpo polare, mentre permette la divisione dei cromosomi così producendo gli individui triploidi. Esistono diversi protocolli per indurre la triploidia (Piferrer et al., 2009). Si può indurre tramite trattamenti termici (sia con shock da caldo che da freddo), ma anche usando uno shock pressorio. I trattamenti termici sono poco costosi da applicare e si possono usare anche nella produzione industriale. (Tiwary et al., 2004). Come trattamento chimico, il protossido di azoto iperbarico si è mostrato pienamente efficace nell'indurre la triploidia, ma comporta tuttavia una riduzione della sopravvivenza. Inoltre, i trattamenti chimici sembrano essere meno accettati dal consumatore finale (Benfey, 2009). Un'altra possibilità per generare individui triploidi è quella di incrociare tetraploidi (ovvero individui con 4 set di cromosomi,  $4n$ ) con diploidi. È possibile incrociare femmine tetraploidi con maschi diploidi e viceversa (Benfey, 2009). Un'altra tecnica è la fecondazione dispermica di un uovo aploide (con un unico set di cromosomi,  $n$ ) dopo il trattamento degli spermatozoi con glicole polietilene (Pandian & Koteeswaran, 1998). La limitazione principale per quanto concerne la fecondazione dispermica è data dall'alto tasso di fallimento di fusione degli spermatozoi, mentre l'incrocio di individui tetraploidi con i diploidi richiede comunque l'induzione diretta della tetraploidia (Benfey, 2009). È possibile utilizzare diversi metodi per il rilevamento dei triploidi e verificare che il protocollo sia riuscito correttamente. Tra questi, la misurazione del DNA contenuto negli eritrociti o la dimensione degli eritrociti stessi sono i metodi più usati (Tiwary et al., 2004).

L'uso di salmoni triploidi sterili viene considerato sempre di più come strategia per ridurre l'impatto delle fughe di animali allevati, ma perché i triploidi vengano accettati in acquacoltura è necessario che abbiano delle *performance* di crescita che siano almeno uguali a quelle dei diploidi (Taylor et al., 2011).

Negli anni sono stati fatti vari studi sui salmoni triploidi, ma si sono ottenuti risultati diversi nelle ricerche effettuate, anche in base ai parametri considerati. Alcuni studi mostrano performance di crescita migliori ed altri peggiori, con prevalenza di deformità degli individui triploidi (Benfey, 2001; Fraser et al., 2015; Hansen et al., 2015). Quello che ad oggi sembra essere chiaro è che i triploidi a condizioni subottimali rendono meno e che questi animali andrebbero trattati come una "nuova specie" per quanto concerne i loro bisogni e range ottimali (Leclercq et al., 2011). Hansen e collaboratori (2015) hanno mostrato che alcuni parametri produttivi, come l'assunzione dell'alimento e la crescita, sono inferiori nei triploidi allevati in acqua di mare ad alte temperature (19°C). Questa differenza nei parametri produttivi tra diploidi e triploidi viene amplificata se la saturazione di ossigeno disciolto nell'acqua viene ridotta dal 100% al 70% con conseguenti alterazioni fisiologiche e aumento di mortalità. Queste differenze però sembrano essere presenti solo quando i pesci sono esposti ad alte temperature. In altri studi effettuati a temperature più basse, infatti, i triploidi hanno tassi di crescita simili o superiori ai diploidi (Atkins & Benfey, 2008). Molti degli studi svolti in passato hanno considerato animali diploidi e triploidi allevati insieme, e questo ha messo in evidenza che, se allevati insieme le performance sono peggiori rispetto a quando sono allevati separatamente, a prescindere dalla ploidia. Questo, assieme ai protocolli storicamente basati sui diploidi, potrebbe contribuire a spiegare poiché i risultati delle ricerche fatte in precedenza siano così diversi tra loro (Taylor et al., 2014).

I giovanili triploidi di *S. salar* hanno, in genere, una massa corporea minore per unità di lunghezza corporea, caratteristica che permane anche nelle femmine triploidi mature perché non sviluppano i caratteri sessuali secondari. A parte i caratteri legati alla maturazione i triploidi non sono distinguibili dai diploidi sulla base delle loro caratteristiche esterne (Benfey, 2016).

Esistono delle differenze a livello cellulare tra diploidi e triploidi. I triploidi, possedendo un set di cromosomi in più, hanno del DNA extra che li rende più eterozigoti. Mostrano un aumento della dimensione cellulare con una conseguente diminuzione del rapporto tra superficie e volume e un numero minore di cellule a livello tissutale. Anche i globuli rossi dei triploidi

quindi presentano delle differenze rispetto a quelli dei diploidi in dimensione e numero. Sono, infatti, più grandi, ma meno concentrati (Sadler et al., 2000). Gli eritrociti dei triploidi hanno una ridotta capacità di trasporto dell'ossigeno rispetto a quelli dei diploidi, dovuta ad un contenuto minore di emoglobina e ad un più basso rapporto di carico emoglobina-ossigeno. Questo potrebbe causare problemi in situazioni di stress in cui il consumo di ossigeno aumenta o in caso di ambiente con minor ossigeno (Cotterell & Wardle, 2004). Uno studio ha indicato che gli eritrociti dei triploidi sintetizzano più proteine totali, per cellula, e che hanno dei livelli di *heat shock protein* (HSP) totali che sono sufficienti per sopravvivere a condizioni di stress lieve, ma hanno dei titoli basali bassi che potrebbero rendere più difficile la risposta allo stress acuto, in particolare nel caso delle HSP si fa riferimento allo stress termico (Saranyan et al., 2017). Inoltre, sembra che in condizioni di stress legati ad ipossia acuta, i triploidi presentino una capacità di omeostasi minore poiché mostrano acidificazione del sangue ed emoconcentrazione, assente negli individui diploidi (Cnaani et al., 2013).

Da diversi studi è emersa la presenza di malformazioni nei salmoni triploidi, come deformazioni ossee, ma anche alterazioni ai filamenti branchiali e pertanto ridotta area branchiale, ma non è stata collegata ad esse una chiara base genetica o ambientale. Infatti, l'allevamento è storicamente basato sugli animali diploidi e spesso parametri subottimali possono risultare in tassi di malformazione aumentati. Sia la temperatura e l'ossigenazione, sia fattori alimentari possono incidere fortemente sulla struttura degli individui. Inoltre, la riduzione della superficie branchiale può impattare sulla ionoregolazione e sull'efficienza respiratoria in condizioni di elevata richiesta di ossigeno o aumentare la mortalità in condizioni di allevamento non ottimali (Sadler et al., 2001). Deformità della colonna vertebrale a livello di tronco sono state evidenziate soprattutto nei triploidi, ma anche queste non sono state direttamente correlate a una causa genetica (Fjelldal & Hansen, 2010). Sono stati condotti anche degli studi al macello e si è visto che il peso finale non è significativamente influenzato dalla ploidia, anche se la percentuale di pesci scartati per deformità o piccole dimensioni è risultata essere maggiore nei triploidi (Fraser et al., 2013). Lo studio di Taylor e collaboratori (2013) rivela anche una significativa prevalenza di cataratta negli animali triploidi e sostiene che, sistemando i protocolli di allevamento, basati storicamente sui diploidi, si potrebbero risolvere i problemi legati alla crescita, alla cataratta e alle deformazioni scheletriche. I triploidi hanno una crescita maggiore in acqua dolce, ma perdono

il vantaggio dopo la smoltificazione, una volta che vengono spostati in acqua di mare (Fraser et al., 2013; Taylor et al., 2013).

I problemi legati alla visione sono correlati a un'ingestione ridotta e a un conseguente minor tasso di crescita, ma si è visto che un supplemento di istidina porta ad un miglioramento della cataratta nel salmone atlantico triploide (Taylor et al., 2015). Le malformazioni scheletriche hanno un'incidenza minore quando le forme giovanili di individui triploidi sono alimentati con diete ricche di fosforo e ad alto contenuto proteico (con proteine idrolizzate) e a basse temperature (Peruzzi et al., 2018). La supplementazione di fosforo sembra essere essenziale per il corretto sviluppo scheletrico durante la crescita, in particolare quando il salmone si trova nella fase di *parr* (Smedley et al., 2018).

### 1.6 La crescita nei pesci

Lo sviluppo e la crescita nei pesci teleostei sono processi complessi e dinamici. Vivendo completamente immersi nel loro ambiente sono soggetti a cambiamenti idrodinamici rapidi sin dai primi stadi della loro vita larvale (Patrino et al., 2008).

La crescita somatica è regolata dall'asse degli ormoni della crescita, in particolare l'ipotalamo produce l'ormone di rilascio della somatotropina (*growth-hormone releasing hormone*; GHRH) che agisce stimolando il rilascio del GH, prodotto dall'ipofisi anteriore e la somatostatina, ormone inibitore del GH; il GH agisce poi stimolando il rilascio di IGF-I dal fegato, l'IGF-I promuove la proliferazione e la differenziazione cellulare (Blanco, 2020; Deal & Volkoff, 2020).

L'asse ormone della crescita GH/IGF-I gioca un ruolo fondamentale nella regolazione neuroendocrina della crescita nei vertebrati. L'IGF viene secreto dal fegato e media le azioni del GH attraverso meccanismi endocrini, paracrini e/o autocrini (Le Roith et al., 2001). A livello cellulare può attivare varie risposte biologiche, tra cui, crescita, proliferazione, sopravvivenza e migrazione (Wood et al., 2005). La risposta cellulare specifica dipende dalle interazioni locali che avvengono tra i ligandi, i recettori, le proteine leganti l'IGF-I (IGFBP), le proteasi specifiche, le proteine della matrice extracellulare e le vie di trasduzione del segnale intracellulare (Clemmons, 2001; Duan, 2002; Firth & Baxter, 2002; Wood et al., 2005). Oltre al GH, anche prolattina e somatolattina sono coinvolte nella regolazione della crescita e, insieme ad esso, agiscono tramite il controllo del comportamento alimentare, del metabolismo, della funzione immunitaria e dell'osmoregolazione. La crescita è influenzata da numerosi processi fisiologici come l'ingestione, la digestione, l'assorbimento e l'escrezione dell'alimento, che vanno ad

influenzare l'equilibrio tra catabolismo ed anabolismo da cui dipendono la crescita e la massa corporea (Johnston et al., 2011). Pure gli ormoni tiroidei prendono parte al processo di crescita nei teleostei agendo sull'asse della crescita stimolando la trascrizione dell'mRNA del GH e dell'IGF-I e l'inibizione della funzione tiroidea causa alterazioni nello sviluppo (Deal & Volkoff, 2020). Anche l'asse ipotalamo-ipofisi-gonadi è coinvolto nei meccanismi che regolano la crescita, in particolare l'ormone di rilascio delle gonadotropine, prodotto dall'ipotalamo, è un inibitore dell'ingestione di cibo, mentre la secretoneurina, la cui funzione principale nei pesci è il rilascio dell'ormone luteinizzante, sembra stimolare l'ingestione (Blanco, 2020).

Molte specie di pesci teleostei hanno una crescita indeterminata. Le fibre muscolari possono raggiungere un diametro massimo dettato da richieste metaboliche e vincoli che dipendono dall'assimilazione dei nutrienti e dalla rimozione dei metaboliti (Johnston et al., 2003). Un alto tasso di crescita e una massa corporea maggiore sono collegate alla capacità di reclutare nuove fibre muscolari. Il numero di fibre dipende da condizioni esterne ed interne. Il fattore ambientale che più sembra influenzare il numero, la distribuzione e la misura delle fibre muscolari è la temperatura; il numero di fibre sembra essere minore in pesci allevati in acqua più calda del loro *optimum* (Johnston et al., 2003). Il sistema endocrino è il principale promotore della crescita attraverso fattori di crescita e trascrizione. Anche la miostatina (MSTN) sembra avere un ruolo nella regolazione della crescita (Johnston et al., 2003)

#### 1.6.1 L'ormone della crescita (GH) e il suo recettore (GHrec)

L'ormone della crescita è un ormone pluripotente che viene prodotto dall'ipofisi anteriore sia nei pesci, che negli altri vertebrati. Il GH, essendo un ormone polipeptidico, svolge la sua azione legandosi ad un recettore transmembrana, il recettore del GH (GHrec), nel tessuto bersaglio (Reinecke et al., 2005). Il GH è il principale componente di un sistema endocrino complesso; i segnali neuronali, neuroendocrini ed endocrini sono integrati nel sistema nervoso centrale e a livello di ipofisi viene regolata la secrezione del GH (Björnsson et al., 2002). Una volta arrivato in circolo i livelli di GH dipendono sia dal tasso di secrezione, ma anche dalla sua rimozione dal circolo (Björnsson et al., 2002). Le proteine leganti il GH (GHBP) modificano la *clearance*, ovvero la rimozione dell'ormone dal sangue, e l'emivita andando ad agire sulla quantità di ormone libero disponibile per il recettore (Björnsson et al., 2002). Il legame del GH con il recettore dà inizio alle vie di segnalazione intracellulare che mediano effetti sulla crescita e la proliferazione cellulare, sull'attivazione enzimatica e secrezione ormonale (Björnsson et al., 2002). Legandosi al suo recettore il GH stimola la sintesi e il rilascio

del fattore-I della crescita insulino-simile (IGF-I) (Moriyama et al., 2000). Il GH nei pesci è coinvolto in molti processi fisiologici del corpo, oltre la crescita, partecipa all'osmoregolazione, al metabolismo di lipidi, proteine carboidrati e alla funzione riproduttiva e immunitaria. Inoltre, il GH influenza anche molti aspetti del comportamento, tra cui appetito, aggressività ed evitamento dei predatori (Reinecke et al., 2005).

Il GHrec è un recettore transmembrana appartenente alla superfamiglia dei recettori delle citochine, formato da una singola proteina con dominio extracellulare N-terminale, dove si lega il GH, un singolo dominio transmembrana e un dominio intracellulare (Kopchick & Andry, 2000). Nei salmonidi il fegato ha la più alta densità di GHR, indicando che è il target principale per le azioni del GH (Björnsson et al., 2002). Il GHR è stato trovato anche nelle branchie, nei reni e nell'intestino (Björnsson et al., 2002). È stato rilevato anche in varie parti del cervello, questa scoperta potrebbe implicare un ruolo del GH nelle funzioni cerebrali dei pesci, ma anche un possibile meccanismo per il *feedback* negativo sulla secrezione del GH stesso (Björnsson et al., 2002). Si trova anche nel muscolo, anche perché il GH è importante per la regolazione della crescita e del metabolismo (Mommsen, 2001). Infine, il suo rilevamento a livello di tessuto ovarico supporta l'ipotesi di un ruolo del GH nella riproduzione (Björnsson et al., 2002).

#### 1.6.2 I fattori di crescita insulino-simili (IGFs)

I fattori della crescita insulino-simili sono polipeptidi evolutivamente antichi, ampiamente distribuiti nei vertebrati, espressi in maniera ubiquitaria e possiedono un'azione metabolica e mitogenica molto potente che influisce sullo sviluppo e sulla crescita cellulare (Radaelli et al., 2003). Il sistema di azione dei fattori di crescita insulino simili comprende i fattori di crescita IGF-I e IGF-II, due recettori, uno per IGF-I e uno per IGF-II, e una famiglia di proteine leganti gli IGF (Chandhini et al., 2021).

L'IGF-I è un polipeptide di 70 amminoacidi altamente conservato, ha una sequenza simile a IGF-II e all'insulina. Ha un ruolo chiave nello sviluppo e nella crescita che esercita attraverso la sua potente azione metabolica e mitogenica. L'espressione di mRNA di IGF-I è elevata nel fegato, ma è stato trovato in molti altri tessuti e si ritrova in tutte le fasi di crescita del pesce (Patrino et al., 2007). Ha un ruolo chiave nella regolazione della crescita e dello sviluppo che esplica mediando le azioni del GH (Moriyama et al., 2000). Nei pesci anadromi ha un ruolo anche nella smoltificazione insieme a GH, tiroxina, cortisolo e insulina (Moriyama et al., 2000).

L'IGF-II è un polipeptide di 67 amminoacidi. Si trova principalmente espresso nel fegato, ma la sua espressione nei pesci è stata dimostrata anche in altri tessuti extra-epatici (Radaelli et al., 2003). Si ritrova nei giovanili e anche nell'adulto; oltre a un'azione sulla crescita sembra avere anche degli effetti a livello di metabolismo cellulare (Reinecke et al., 2005).

### 1.6.3 La miostatina (MSTN)

La miostatina è un membro della famiglia dei fattori di crescita trasformanti beta (TGF-beta) ed è espressa soprattutto nel muscolo scheletrico (Patrino et al., 2007). Nei mammiferi, in particolare ci sono studi nei bovini e nei topi, la miostatina è un regolatore negativo della crescita del muscolo scheletrico (McPherron et al., 1997; McPherron & Lee, 1997). Nei teleostei ci sono due differenti geni della miostatina, MSTN-I e MSTN-II. In generale, nei pesci l'espressione di MSTN-I è stata dimostrata in numerosi organi, quali: cervello, occhio, pancreas, branchie, gonadi, diverse componenti dell'apparato gastroenterico e pelle (Patrino et al., 2007). La miostatina nei pesci sembra funzionare come inibitore della proliferazione e della crescita cellulare per regolare la crescita somatica e controllare la massa tissutale (Gabillard et al., 2013). Studi su MSTN-II hanno mostrato che il suo promotore è molto potente, specialmente a livello di cellule muscolari (Nadjar-Boger et al., 2013). A livello di muscolo cardiaco, nei pesci, la miostatina agisce assieme all'IGF-I durante lo sviluppo cardiaco, in particolare nei cardiomiociti (Patrino et al., 2007)

### 1.7 Lo stress nei pesci

Lo stress può essere considerato come la condizione in cui l'omeostasi, equilibrio dinamico dell'organismo, viene disturbata da stimoli intrinseci ed estrinseci definiti *stressor* (Chrousos & Gold, 1992). Da anni la definizione di stress è sottoposta a revisioni e adattamenti poiché gli *stressor* e le risposte ad essi collegate sono molteplici e differenti tra loro. La risposta fisiologica allo stress è adattativa e/o compensatoria, ma se l'animale si trovasse a rispondere ad uno stimolo intenso e cronico potrebbe diventare disfunzionale e risultare in una inibizione della crescita, scarse performance riproduttive o ridotta resistenza ai patogeni (Pankhurst, 2011). Lo stress e le risposte ad esso collegate sono state studiate in molte specie e i pesci hanno delle similitudini con i vertebrati terrestri, ma ci sono delle differenze dovute in particolare allo stretto contatto che hanno con il loro ambiente circostante, l'acqua (Wendelaar Bonga, 1997).

Gli *stressor* possono essere di varia natura: chimici, fisici o anche evocati da percezioni sensoriali come nel caso della presenza di un predatore. La risposta allo stimolo stressante

comprende tre fasi che vengono individuate come risposta primaria, secondaria e terziaria. La risposta primaria è quella neuroendocrina che include il rilascio di catecolamine, prevalentemente epinefrina, stimola l'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale e si conclude con il rilascio degli ormoni glucocorticoidi nella circolazione. La risposta secondaria comprende cambiamenti nei livelli plasmatici e tissutali di ioni e metaboliti, le *heat shock protein* (HSP) e tutti quegli aggiustamenti fisiologici in metabolismo, respirazione, stato acido base, sistema immunitario e risposte cellulari. Infine, la risposta terziaria comprende quegli aspetti che riguardano le prestazioni dell'animale come la crescita, la resistenza a patologie, l'attività metabolica, il comportamento, la riproduzione ma anche la sopravvivenza stessa. È un raggruppamento che viene fatto per semplificare i meccanismi della risposta allo stress, ma si deve tenere conto che la reazione dell'animale dipende anche dall'intensità e dalla durata dello stimolo oltre che dalla sua natura (Barton, 2002).

Dunque, a seguito di uno stimolo stressante c'è un aumento delle catecolamine, rilasciate dalle cellule cromaffini dei reni, e un aumento di cortisolo nel sangue. In caso di stress acuto, in particolare se accompagnato da una riduzione significativa di ossigeno nel sangue nel plasma aumentano adrenalina e noradrenalina (Pankhurst, 2011). Uno degli effetti delle catecolamine è quello di aumentare l'affinità dell'emoglobina per l'ossigeno (Perry & Bernier, 1999). Tramite l'asse ipotalamo-ipofisi-tessuto interrenale viene rilasciato il cortisolo nella circolazione. Lo stress stimola l'espressione e la sintesi dell'ormone di rilascio della corticotropina (CRF) che induce il rilascio della corticotropina (ACTH), sopprime l'appetito, aumenta l'attività motoria e nei salmonidi incentiva il movimento a valle (Pankhurst, 2011). L'ACTH agisce poi in pochi minuti sul tessuto interrenale che si attiva con la produzione di cortisolo. Nel plasma, di conseguenza a uno stimolo stressante, è possibile rilevare un aumento dei livelli di glucosio e di lattato (Begg & Pankhurst, 2004). Il cortisolo ha un ruolo importante nell'osmoregolazione poiché stimola l'attività delle  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasi branchiali, a livelli minori modula la risposta infiammatoria inibendo la produzione di citochine e sembra che attenui la risposta delle HSP in risposta a un insulto termico (Pankhurst, 2011).

#### 1.7.1 Il cortisolo

Il cortisolo è il principale corticosteroide nei pesci teleostei. Quando l'animale si trova sotto stress c'è l'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-interrenale che aumenta i livelli di cortisolo circolante (Wendelaar Bonga, 1997). Il cortisolo sembra associato alla risposta acuta di molti pesci a diverse malattie, ma aumenta anche in condizioni di stress ambientale e sociale

(Bernier, 2006). Inoltre, il cortisolo è collegato all'ingestione alimentare, aumenti moderati di cortisolo possono stimolare l'appetito, mentre aumenti pronunciati o cronici portano alla diminuzione dell'ingestione (Bernier, 2006). Il cortisolo influisce sul metabolismo dei carboidrati, delle proteine e dei lipidi. È un componente essenziale della risposta allo stress, e nei pesci ha anche un ruolo importante nell'osmoregolazione, nella crescita e nella riproduzione (Mommsen et al., 1999).

Il cortisolo circolante è uno degli indicatori più utilizzati per la misurazione dello stress poiché può essere misurato facilmente e accuratamente anche con kit commerciali, è possibile misurarne i livelli basali senza stressare l'animale con diverse procedure di campionamento tra cui l'anestesia e, infine, aumenta quando l'animale è esposto a stimoli stressanti (Mommsen et al., 1999). È possibile misurare il cortisolo anche in altre matrici, quali pelle, muco, muscolo e pinna; il campionamento del muco è meno invasivo del prelievo di sangue; mentre i muscoli e le pinne possono essere usati per la valutazione del cortisolo postmortem (Bertotto et al., 2010).

#### 1.7.2 Le proteine da shock termico (HSP)

Le proteine da shock termico sono un gruppo di proteine intracellulari che hanno un elevato grado di identità a livello di amminoacidi tra i diversi organismi. Le HSP sono espresse costitutivamente nelle cellule per alcuni processi cellulari critici collegati al funzionamento delle proteine, sono poi attivate nelle cellule in risposta a diversi stimoli stressanti e proteggono le funzioni cellulari vitali (Iwama et al., 1998). La prima identificazione di queste proteine è avvenuta in studi su *Drosophila melanogaster* e sulla risposta allo shock termico e da allora prendono il nome di proteine da shock termico (Ritossa, 1962), ma negli anni si è visto che non si limitano alla risposta in caso di stress da caldo (Welch, 1993). Si è visto che agiscono come chaperones giocando un ruolo cruciale nel piegamento delle proteine, assemblare complessi multiproteici, trasportare le proteine nei compartimenti specifici, controllare il ciclo cellulare e proteggere le cellule da stress e apoptosi (Li & Srivastava, 2003). Le HSP vengono classificate in base al loro peso molecolare in kilodalton (kDa) (Li & Srivastava, 2003). Sono state descritte tre principali famiglie, HSP90, HSP70 e a basso peso molecolare HSPs (Poltronieri et al., 2007).

HSP70 è un gruppo ampiamente distribuito di HSP presenti in numerosi organismi, dai batteri ai mammiferi. La sua espressione aumenta marcatamente in risposta a stress ambientali, come shock termico, irradiazione UV ed esposizione chimica ed è caratterizzata da elevata

sensibilità alle variazioni di temperatura (Yamashita et al., 2010). Sono stati fatti studi di filogenesi molecolare sulle proteine HSP70 che sono state identificate nei pesci ed è emerso che ci sono due cluster: "HSP70-I" o "HSP70-II" (Yamashita et al., 2010), questo suggerisce che c'è stata questa differenziazione durante l'evoluzione dei vertebrati. La famiglia delle HSP70 comprende forme costitutive (HSC70, *heat shock cognate*) e forme inducibili da stress (HSP70) (Clark et al., 2007).

La famiglia delle HSP90 interviene nelle vie di segnalazione cellulare e interagisce con i recettori degli ormoni steroidei (Poltronieri et al., 2008). Sono presenti anche in assenza di stimoli stressanti (Palmisano et al., 2000). È una molecola chaperon cruciale per mediare le azioni del cortisolo a livello cellulare (Sathiyaa et al., 2001) ed è necessaria per il corretto ripiegamento e funzionamento di diversi recettori per gli ormoni steroidei, incluso il recettore dei glucocorticoidi (GR) (Palmisano et al., 2000).

Le HSP a basso peso molecolare hanno diverse funzioni ed è stato ipotizzato che funzionino come chaperon molecolari, prevenendo l'aggregazione proteica irreversibile (Iwama et al., 2004).

Le HSP sono potenzialmente degli ottimi candidati per valutare il benessere dei pesci e la loro risposta allo stress poiché sono proteine dalla struttura conservata e il loro aumento è indotto da diverse tipologie di *stressors* (Poltronieri et al., 2007).

## 2. Obiettivo della tesi

Il problema delle fughe in mare è un aspetto critico dell'allevamento del salmone atlantico in maricoltura. Anche se dal 2007 la situazione è migliorata, nel 2006 è stata stimata una perdita data dalle sole fughe del 13,1% (dati Fiskeridirektoratet), la fauna selvatica è a rischio, nel 2019 sono stati stimati solamente 481 000 individui selvatici, senza togliere gli animali che sono stati poi pescati (Thorstad, 2020). È evidente come siano necessarie soluzioni valide per prevenire l'eventuale interazione genetica con le popolazioni selvatiche senza intaccare gli aspetti produttivi (Jensen et al., 2010). L'utilizzo di individui sterili rappresenta una di queste possibilità, da qui il crescente interesse commerciale per gli individui triploidi di salmone atlantico. Nonostante i vantaggi legati alla salvaguardia delle popolazioni selvatiche e al rallentamento della maturazione precoce diversi studi hanno tuttavia evidenziato performance di crescita inferiori nei triploidi rispetto ai diploidi, ai limiti dei range ottimali per quest'ultimi (Benfey, 2016; Fraser et al., 2012; Piferrer et al., 2009) e la necessità di studiare ancora le performance di questi animali in condizioni diverse e potenzialmente più favorevoli. Il presente lavoro di tesi nasce all'interno di un progetto di ricerca più ampio che coinvolge più unità coordinate dalla "Artic University of Norway" con lo scopo di valutare la funzionalità digestiva e la crescita in salmoni diploidi e triploidi dalla schiusa alla trasformazione in *smolt.*, in condizioni potenzialmente più favorevoli per questi ultimi, ovvero a temperature più basse e con alimentazione ad elevato tenore di fosforo e proteine lisate. Oltre alla crescita, alla capacità digestiva e alle malformazioni, il progetto ha previsto la valutazione anche di eventuali differenze in termini di risposta allo stress e adattamento alla vita marina, ovvero nel processo di smoltificazione, ed è in questo contesto che si inserisce il presente elaborato di tesi. A tal fine sono stati analizzati indicatori dello stress e della crescita in animali diploidi e triploidi, tenuti in condizioni termiche ambientali ridotte rispetto al protocollo utilizzato normalmente nelle produzioni di salmoni diploidi e alimentati con due tipologie di dieta formulate per provare a minimizzare le differenze dettate dalla ploidia. Nello specifico le due diete, entrambe con tenore di fosforo più elevato rispetto alle diete commerciali per il salmone, differivano fra loro nei livelli di proteine lisate per andare, teoricamente, maggiormente incontro alle esigenze degli individui triploidi.

Per la valutazione dello stress, sono stati esaminati i livelli di cortisolo e di HSP70 nel muscolo, rispettivamente tramite saggio radioimmunologico (RIA) e *real-time* PCR. Per la valutazione della crescita sono stati analizzati: i) l'espressione genica di GH, GH-rec, IGF-I e miostatina nel muscolo tramite *real-time* PCR e ii) la presenza e la localizzazione a livello cellulare dell'mRNA di IGF-I nel fegato attraverso un'analisi di ibridazione *in situ*. Questi indicatori sono stati valutati in animali nel periodo di smoltificazione (ottobre-dicembre) per poter osservare eventuali differenze a carico di questa fase così delicata e determinate. Il cortisolo, l'ormone della crescita, il suo recettore e il fattore di crescita insulino simile I, IGF-I, sono stati pertanto utilizzati anche come indicatori di questo processo essendo i principali ormoni coinvolti nel processo di adattamento all'acqua salata nei pesci.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1 Produzione e mantenimento dei lotti sperimentali

Nell'agosto del 2015, uova di *Salmo salar* sono state fecondate artificialmente in uno schiuditoio commerciale (Stonfisku HF, Islanda) e, dopo 300 min a 5°C, la metà è stata sottoposta a shock pressorio di 9500 psi per 5 minuti (Taylor et al., 2011) al fine di indurre la triploidia. La schiusa è stata portata a termine nella *Tromsø Aquaculture Research Station* in Norvegia e per verificare la ploidia nei pesci è stata utilizzata la citometria a flusso negli animali allo stadio di avannotto. Prima di essere alimentati gli animali sono stati suddivisi in uguale numero per ploidia in 12 vasche circolari di 200 litri tenute, al chiuso.

In triplicati di vasche per ciascuna ploidia sono state somministrate due differenti diete: una dieta standard a base di farina di pesce (STD) e una dieta modificata nella quale il 45% di farina di pesce è stato sostituito con proteine di pesce idrolizzate (HFM). L'analisi del contenuto di fosforo delle due diete (MasterLab, Boxmeer, Olanda) ha dato come risultati 19 g/kg nella STD e 18 g/kg nella HFM, considerando che la dose richiesta per il salmone atlantico è di 8 g/kg, entrambe le diete contenevano un valore maggiore. Il cibo è stato somministrato con delle mangiatoie elettriche per fornire dai 6 ai 9 pasti al giorno; la quantità è risultata essere sempre in eccesso rispetto a quella consumata. A partire dall'inizio della somministrazione dell'alimento, la temperatura è stata aumentata gradualmente fino a 10°C in quattro settimane, è stata poi mantenuta utilizzando dei riscaldatori ( $10,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ), con eccezione il periodo estivo, durante il quale i salmoni sono stati esposti alla temperatura ambientale ( $9,5^\circ\text{C}$ - $12,5^\circ\text{C}$ ). Gli animali sono stati mantenuti sotto luce costante durante l'esperimento, ad eccezione del periodo tra il 6 settembre e il 18 ottobre in cui il fotoperiodo è stato modificato a 12 ore di luce e 12 di buio per simulare il periodo invernale e stimolare la smoltificazione. Il livello di ossigeno disciolto è stato misurato regolarmente e non è mai sceso sotto l'80% di saturazione. I pesci morti venivano rimossi giornalmente, contati e riportati nel registro di mortalità.

#### 3.2 Campionamento

I campioni per il presente studio sono stati prelevati mensilmente da ottobre a dicembre del 2016 per coprire il periodo in cui avviene la trasformazione da *parr* a *smolt*. 30 pesci per vasca per ciascuna ploidia (diploidi e triploidi) sono stati sacrificati e da questi animali è stata prelevata una porzione di muscolo dorsale, il fegato e la pinna caudale. I campioni sono stati

congelati in ghiaccio secco e spediti al Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione dell'Università di Padova, dove sono stati conservati a -80°C fino al momento delle analisi.

### 3.3 Analisi tramite *real-time* PCR

La valutazione dell'espressione di GH e del suo recettore, IGF-I, HSP70 e MSTN è stata condotta sul muscolo dei salmoni tramite analisi di *real-time* PCR. La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una tecnologia biomolecolare grazie alla quale è possibile ottenere la sintesi ciclica di DNA in vitro. Tale tecnica permette di ottenere, da uno specifico frammento di DNA un numero elevato di copie. La *real-time* PCR utilizza come fonte di informazione il DNA complementare (cDNA), ottenuto per retrotrascrizione del dell'RNA estratto da ogni singolo campione.

#### 3.3.1 Protocollo di estrazione RNA

Per procedere all'estrazione dell'RNA, 71 campioni sono stati prelevati dalla cella a -80°C, pochi per volta e in ghiaccio per evitarne lo scongelamento, e una piccola parte (50-100 mg) di muscolo del campione è stata prelevata per poter procedere all'estrazione. Un campione per volta è stato pestato con un pestello in un mortaio contenente azoto liquido fino a renderlo polvere. Questo passaggio preliminare all'estrazione con TRizol™ occorre per rendere più accessibile l'RNA in una matrice come il muscolo.

Per l'estrazione dell'RNA, è stato utilizzato il TRizol™ Reagent (Invitrogen™), con il protocollo riportato in appendice.

#### 3.3.2 Quantificazione dell'RNA estratto

I campioni di RNA estratto sono stati quantificati mediante lo spettrofotometro NanoDrop 2000. Tale strumento permette di misurare l'assorbanza dell'aliquota che si sta analizzando: gli acidi nucleici sono caratterizzati da un picco a una lunghezza d'onda di 26 nm. Con una pipetta è stato depositato 1 µl di campione sullo strumento e il *software* ha fornito i valori richiesti. Per capire la purezza del campione occorre valutare il rapporto tra i valori di assorbanza a 260 e 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ); la purezza del RNA coincide con un valore compreso tra 1,8 e 2, mentre valori più bassi potrebbero indicare la presenza di proteine o di altri contaminanti.

#### 3.3.3 Retrotrascrizione

Per retrotrascrivere l'RNA totale ottenuto con l'estrazione è stato utilizzato il protocollo Invitrogen™ SuperScript™ II Reverse Transcriptase.

Per ogni 1 µl di campione è stato messo 1 µl di DNA e 1 µl di buffer e le provette sono state incubate a temperatura ambiente per 15 minuti. Successivamente ad ogni provetta è stato aggiunto 1 µl di EDTA. È stata preparata una seconda mix con 1 µl di esameri casuali e 1 µl di dNTP per 1 µl di campione. Una volta aggiunta la mix ai campioni sono stati messi in stufa a 65°C per 5 minuti e subito spostati in ghiaccio. Ad ogni campione sono stati poi aggiunti 4 µl di 5X First-Strand Buffer, 2 µl di 0,1 M DTT e 1 µl di SuperScript™ II RT. Dopo 10 minuti a temperatura ambiente, è stato incubato per 50 minuti a 42°C e successivamente a 70°C per 15 minuti.

Con questo procedimento è stato ottenuto il DNA complementare (cDNA). I campioni sono poi stati diluiti con acqua sterile in rapporto 1:10 e conservati a -20°C.

### 3.3.4 Primer impiegati

Per la ricerca dei geni selezionati sono stati utilizzati i primer riportati in tabella 3.1.

Nome oligonucleotide	Sequenza (5' - 3')	Temperatura di <i>annealing</i> [°C]
SalmonS GH-for	CCCTAGCCAGACCCTGATCAT	61,8
SalmonS GH-rev	GAGCAGGTTGAGCCCACTT	58,8
SalmonS GHrec-for	GGAAGACATCGTGGAAACCAGA	59,8
SalmonS GHrec-rev	CAAACGGCTCCCGGTTAGA	59,4
TrotalGF1-for	CGGTCACATAACCGTGGTATTG	60,3
TrotalGF1-rev	CTGCCTTGCCAGACTTGACA	59,4
SalmonS MSTN-for	GCGCTACAAGGCCAACTACTG	61,8
SalmonS MSTN-rev	GGTGCCGCGAGGGTTAG	60
SalmonS HSP70-for	CAGGCCAGCATTGAGATTGA	57,3
SalmonS HSP70-rev	CCCTGAAGAGGTCGGAACAC	61,4

**Tabella 3.1.** Elenco dei primer utilizzati. for = forward; rev = reverse

### 3.3.5 Protocollo per la *real-time* PCR

Per ogni campione è stata fatta un'analisi in triplicato. Per ogni gene bersaglio è stata aggiunta la mix di reazione costituita dai reagenti riportati nella tabella 3.2.

Reagente	Quantità
SYBR Green I Dye Chemistry	12,50 µl
primer forward	0,75 µl
primer reverse	0,75 µl
Acqua sterile	8,50 µl

**Tabella 3.2.** Quantità utilizzate per singolo reagente nell'allestimento della mix di reazione. La mix di reazione è formata dall'enzima Polimerasi (SYBR Green I Dye Chemistry), dalla coppia di primer (forward e reverse) e da acqua sterile.

La mix di reazione è stata mescolata delicatamente con il puntale e in ogni pozzetto della piastra per la PCR sono stati messi 22,5 µl di mix di reazione e 2,5 µl di cDNA già

precedentemente diluito 1:10. Inoltre, in ogni piastra sono stati posti due pozzetti di controllo con 2,5 µl di acqua sterile.

Terminate le operazioni appena elencate per ogni campione in triplice copia, è stato applicato un film protettivo apposito e sono state poi analizzate tramite *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System*. Dopo un primo step a 50°C per l'attivazione delle polimerasi, sono stati fatti 40 cicli composti da due passaggi, uno a 95°C per la fase di denaturazione e uno a 60°C per fase di *annealing* e di estensione. Dopo questi cicli è stata aggiunta una fase di dissociazione con temperatura specifica per ogni amplicone. Tramite il software in dotazione al *Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System* è stato possibile osservare le curve di *melting* ottenute dai campioni. Le curve di melting sono un indice della purezza del prodotto di reazione e sono generate dal software analizzando le temperature di *melting* mostra, infatti, la temperatura di dissociazione specifica per ogni amplificato. La presenza di un unico picco rappresenta la specificità del saggio, mentre una curva multimodale indica che l'amplificazione è stata meno specifica; quindi, viene usata per verificare che non ci siano aspecifici all'interno del prodotto di amplificazione.

#### 3.4 Dosaggio del cortisolo

La valutazione dei livelli di cortisolo è stata effettuata sul muscolo tramite saggio radioimmunologico (RIA). La tecnica RIA ha un'elevata specificità poiché nei pozzetti dove vengono inseriti i campioni è presente un *coating* costituito da un anticorpo specifico per la sostanza in analisi. L'affinità tra anticorpo e antigene determina la sensibilità del saggio. L'antigene marcato con un tracciante radioattivo, a concentrazione nota, viene inserito nel pozzetto e compete con la sostanza da analizzare per l'anticorpo specifico in comune. L'anticorpo specifico è presente in difetto, e grazie alla competizione che si genera otterremo che maggiore è la concentrazione dell'analita, minore sarà la quantità di tracciante radioattivo che si legherà all'anticorpo e pertanto che verrà rilevata.

Per l'analisi, effettuata su 140 campioni, 100 mg di tessuto muscolare sono stati pesati e sono stati polverizzati tramite un mortaio con azoto liquido per omogeneizzare il campione. All'omogenato sono stati aggiunti 500 µl di tampone RIA ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  61mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  40 Mm, NaCl 154 Mm, pH 7,2) e 8ml di etere etilico per l'estrazione degli steroidi. La provetta è stata posta per 10 minuti su un agitatore rotante a temperatura ambiente, successivamente è stata centrifugata a 2.500 rpm per 5 minuti. In seguito al congelamento a -20°C, il surnatante è stato decantato in provette coniche e il campione è stato portato a secco

sottocorrente di azoto. Il residuo è stato ripreso con 500 µl di buffer RIA, agitato per 5 minuti, e caricato nella dose di 50-100 µl nei pozzetti preparati per il saggio (Bertotto et al., 2010; Pascoli et al., 2011).

Per l'analisi, sono state utilizzate micropiastre in poliestere da 96 pozzetti (Packard, optiplat 96 well PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA), ed inizialmente è stato usato un anticorpo anti-γglobuline di coniglio prodotto nella capra (RGG, Analytical Antibodies, Bologna, Italia) come anticorpo secondario, opportunamente diluito. Sono stati distribuiti 150 µl di antisiero per ogni pozzetto della piastra e questa è stata messa ad incubare *overnight* a 4°C. Successivamente all'incubazione la piastra è stata svuotata e sono stati aggiunti 150 µl di tampone RIA contenente albumina bovina sierica (BSA) allo 0,1% su ogni pozzetto. La piastra è stata nuovamente posta in incubazione a 4°C per 1 ora, poi è stata svuotata e messa a -20°C dove è stata conservata fino al momento dell'utilizzo che non è avvenuto oltre 4 settimane.

La piastra è stata caricata con 100 µl di anticorpo specifico (Anti-Cortisolo-CMO Rabbit, Analytical Antibodies) opportunamente diluito ad esclusione dei pozzetti di controllo (Attività Totale AT e *Non Specific Bound* NSB); la piastra è stata posta a incubare per 2 ore a 37°C. In seguito, è stato eseguito un lavaggio di ogni pozzetto, ad esclusione dei pozzetti AT e NSB, con 200 µl di tampone RIA, poi la piastra è stata svuotata, asciugata e caricata in doppio con 50-100 µl di estratto di muscolo opportunamente. Ad ogni pozzetto sono stati infine aggiunti 10 µl di tracciante radioattivo in soluzione da 7.500 cpm/10 µl, che è stata ottenuta tramite diluizione con etanolo assoluto (*stock solution*) e con tampone RIA (*working solution*). La curva di taratura è stata ottenuta con diluizioni scalari (1:2) da 1,5 pg/pozzetto a 200 pg/pozzetto.

Dopo essere stata ricoperta con un'apposita pellicola, la piastra è stata posta su agitatore orizzontale a bassa velocità per 3 minuti e messa ad incubare *overnight* a 4°C, al fine di indurre la reazione immunologica. Una volta terminata l'incubazione l'antigene marcato libero è stato separato dall'antigene marcato legato all'anticorpo con 4 lavaggi con 200 µl per pozzetto di tampone RIA, ad eccezione dei pozzetti AT. Per ogni pozzetto sono stati poi aggiunti 200 µl di liquido scintillante (Microscint, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) per rendere possibile il conteggio della frazione di radioattività legata; la piastra è stata sigillata con pellicola termosaldabile (TOPSEAL S, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) ed è stata agitata per 3 minuti a bassa velocità. La determinazione della frazione di

radioattività legata è stata effettuata tramite il  $\beta$ -counter (Top-Count, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Shelton, CT, USA) che elabora una curva di taratura e fornisce le concentrazioni ormonali dei campioni (pg/pozzetto), tramite il software GraphPad 5.0. la concentrazione di cortisolo è stata convertita in pg/g a partire dalle concentrazioni in ogni pozzetto.

### 3.5 Ibridazione in situ

La presenza e la localizzazione cellulare dell'mRNA di IGF-I a livello epatico è stata condotta con tecniche di ibridazione *in situ* (ISH). L'RNAscope® è una tecnica innovativa di ISH, altamente sensibile, che permette la visualizzazione diretta dell'mRNA nel contesto morfologico del tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*, FFPE), grazie all'utilizzo di sonde disegnate *ad hoc*.

L'analisi è stata condotta utilizzando 20 campioni di fegato dei mesi di ottobre e novembre. Per procedere all'analisi di tessuti FFPE è necessario, prima dell'ibridazione, che le sezioni vengano deparaffinate e trattate con calore e proteasi. La deparaffinatura è stata eseguita con xilene e la reidratazione è stata eseguita con una serie di passaggi in scale discendenti di etanolo. Le sezioni di tessuto sono state incubate in un tampone citrato (10 nmol/l, pH 6) e mantenute a ad una temperatura compresa tra i 100°C e i 103°C per 15 minuti, lavate in acqua deionizzata e immediatamente trattate con 10  $\mu$ m/ml di proteasi a 40°C per 30 minuti. Affinché l'ibridazione avvenga con successo deve esserci il legame di coppie di sonde adiacenti sull'acido nucleico target. Per ottenere l'ibridazione dell'RNA target sono state disegnate delle sonde apposite, ogni sonda è costituita da 18-25 basi complementari alla regione dell'RNA target, una sequenza spaziatrice e una sequenza di coda formata da 14 basi. Le sonde sono state poste in un primo buffer di ibridazione [6X SSC (1X SSC è equivalente a 0,15 mol/l NaCl, 0,015 mol/l Na-citrato) 25% formammide, 0,2% dodecil solfato di litio, reagenti bloccanti) per tre ore; il preamplificatore è stato messo in un secondo tampone (20% formammide, 5X SSC, 0,3% dodecil solfato di litio, 10% solfato destrano e reagenti bloccanti) per 30 minuti; l'amplificatore è stato posto nel secondo tampone di ibridazione a 40°C per 15 minuti e la sonda in un terzo buffer (5X SSC, 0,3% dodecil solfato di litio e reagenti bloccanti) per 15 minuti. Dopo ogni step di ibridazione i vetrini sono stati lavati con un buffer di lavaggio (0,1X SSC, 0,03% dodecil solfato di litio) tre volte a temperatura ambiente (Mazzei et al., 2019; Wang et al., 2012).

Le immagini dei vetrini sono state acquisite ad un ingrandimento di 40x e successivamente analizzate con il software ImageJ (Fiji) per determinare quantitativamente la presenza di sonde mRNA. Per preparare le aree a colorazione differente è stato usato il plugin Trainable Weka Segmentation ed è stata fatta una classificazione in base alle tre diverse classi di colorazione: IGF, ematosilina e background partendo da un'immagine campione utilizzata come riferimento. Dalle immagini ottenute tramite classificazione è stata selezionata la classe di colorazione IGF tramite funzione "threshold". Ogni immagine ottenuta è stata sottoposta a funzione "watershed" per separare i clusters di segnale e, successivamente, tramite la funzione "Analyze particles" (set: size= 0.2-1.5  $\mu\text{m}^2$ , circularity = 0.3-1.0, exclude on edges, include holes) è stato stimato il numero di segnali positivi per immagine.

### 3.6 Analisi statistica

Per effettuare l'analisi dei dati ottenuti dalla *real-time* PCR è stato utilizzato il metodo 2DDct dei singoli campioni.

L'analisi statistica dei dati è stata effettuata utilizzando il software R. Per valutare le differenze nell'espressione genica e nei livelli di cortisolo, considerate significative con livello di significatività  $P < 0,05$ , si è optato per un modello misto completo per quasi tutti i valori analizzati ad eccezione dell'IGF-I per cui è stato usato un modello lineare semplice. Nel modello misto completo sono stati introdotti tutti i fattori fissi (mese di campionamento, dieta, ploidia) e le loro interazioni, e il fattore random "vasca". Nel modello lineare semplice i valori di 2DDct sono stati utilizzati come variabile risposta (dipendente) ed i fattori data, gruppo e ploidia come variabili esplicative (indipendenti). La variabile dipende è stata trasformata in funzione logaritmo, tramite la formula  $\log(1 + DDtc)$  per i dati ottenuti dalla *real-time* PCR e  $\log(1 + HC)$  per il cortisolo, per migliorare sia la distribuzione dei dati che l'omogeneità delle varianze.

Per questa analisi sono stati valutati i mesi di ottobre, novembre e dicembre. La dieta fa riferimento alla dieta standard a base di farina di pesce (GP1) e alla dieta modificata con il 45% di proteine di pesce idrolizzate (GP2). Infine, la ploidia fa riferimento ai due gruppi di animali, diploidi (2N) e triploidi (3N).

Per analizzare i valori ottenuti con l'ibridazione in situ-RNA scope è stato utilizzato un modello misto impostando la variabile data come effetto fisso e la variabile ventrino (che corrisponde ad un animale specifico) come effetto random.

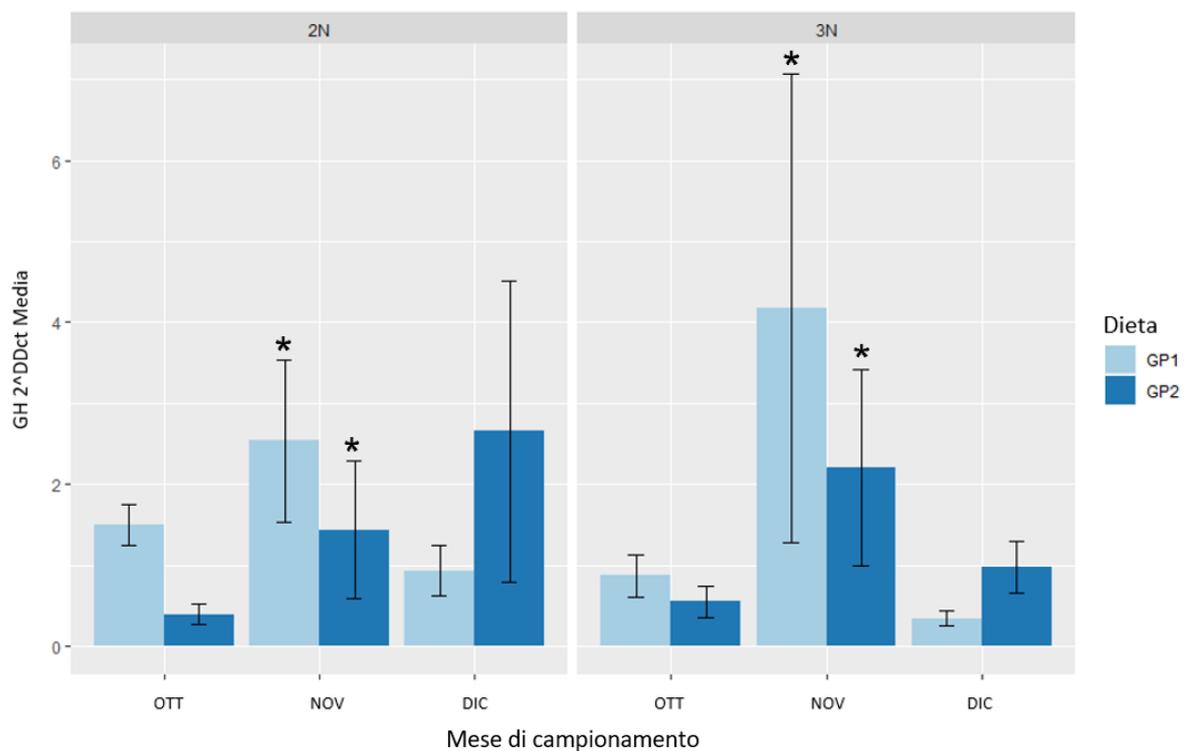


## 4. Risultati

### 4.1 Risultati PCR

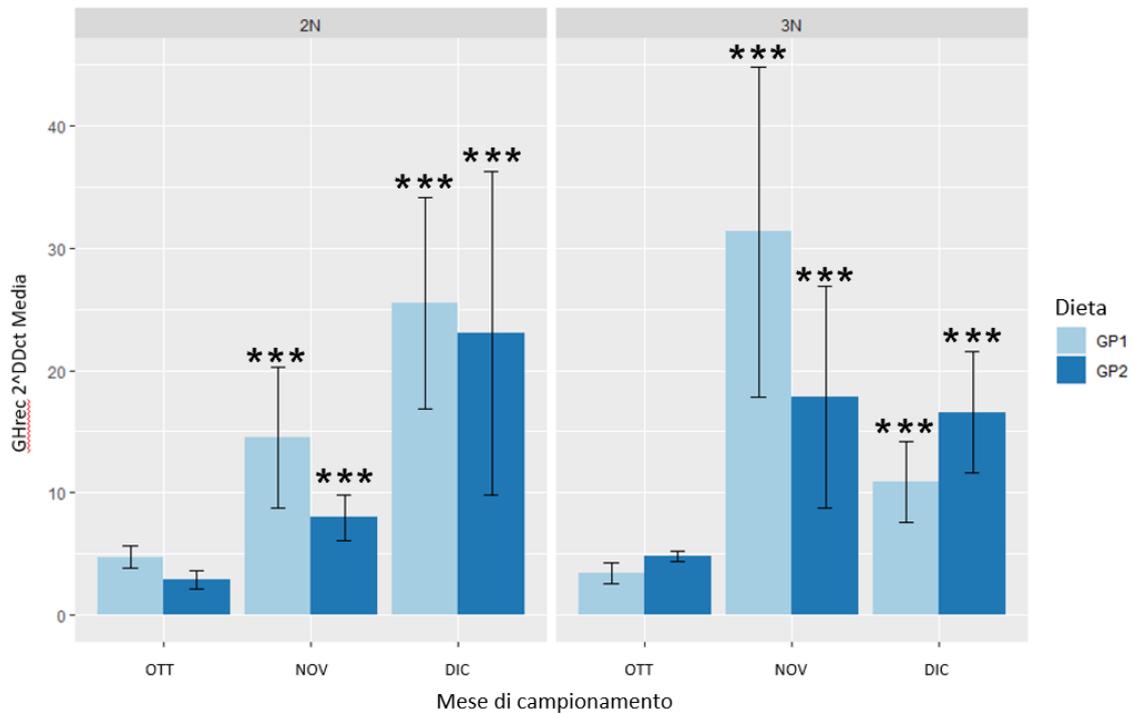
I dati ottenuti con l'analisi *real-time* PCR sono stati elaborati con il software Applied 7500 sds, riportati in grafici tenendo in considerazione come fattori variabili il mese di campionamento, la dieta e la ploidia e successivamente analizzati con il software R per verificare le differenze statisticamente significative.

I livelli di espressione del GH, rappresentati in Figura 4.1, hanno mostrato differenze significative legate solamente al mese di campionamento ( $p < 0,01$ ) con i valori di novembre più alti di ottobre e dicembre indipendentemente dalla dieta e dalla ploidia. Inoltre, nessuna delle interazioni fra i fattori prese in considerazione durante l'analisi è risultata significativa.



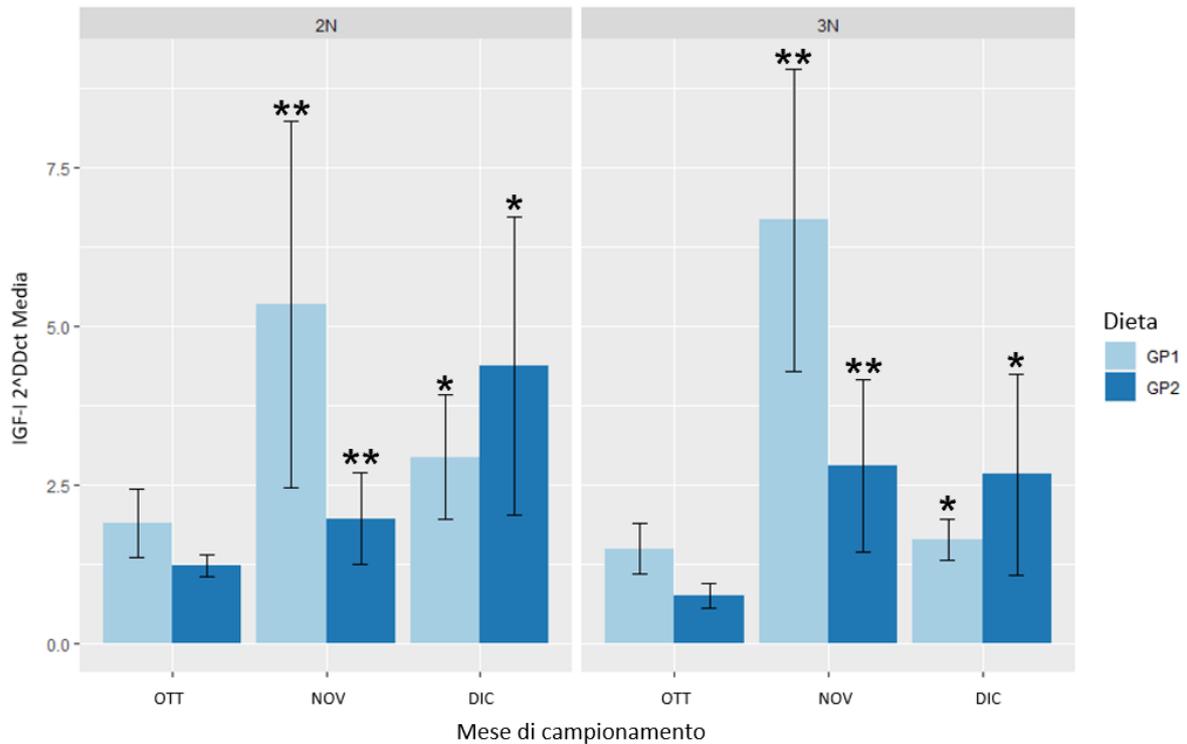
**Figura 4.1** Livelli di espressione di GH negli animali distinti per ploidia e per diete. L'asse delle ascisse indica il mese di campionamento, l'asse delle ordinate la media dei valori di espressione del GH. Le barre rappresentano l'errore standard e gli asterischi indicano le differenze significative. Il livello di significatività è interpretabile secondo la seguente legenda: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '\*'.

Anche l'espressione del GHrec è risultata significativamente influenzata dal mese di campionamento con valori più alti in novembre e dicembre ( $p < 0,0001$ ) indipendentemente dalla ploidia e dalla dieta. Anche in questo caso, nessuna delle interazioni fra i fattori considerati per l'analisi è risultata significativa.



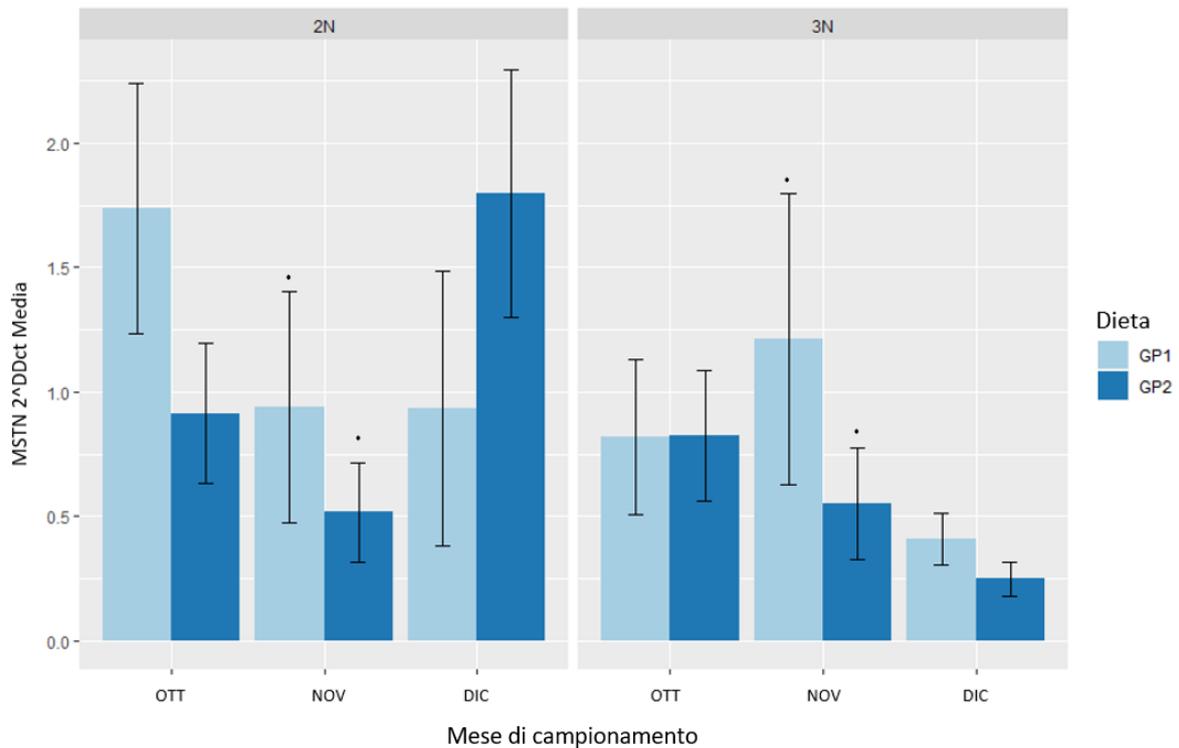
**Figura 4.2.** Livelli di espressione di GHrec negli animali distinti per ploidia e per diete. L'asse delle ascisse indica il mese di campionamento, l'asse delle ordinate la media dei valori di espressione del GHrec. Le barre rappresentano l'errore standard e gli asterischi indicano le differenze significative. Il livello di significatività è interpretabile secondo la seguente legenda: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.'.

Il mese di campionamento ha influenzato in modo altamente significativo anche l'espressione di IGF-I (figura 4.3) con valori molto più elevati sia in novembre che in dicembre (rispettivamente  $p < 0,001$  e  $p < 0,01$ ), mentre la dieta è al limite della significatività ( $p = 0,07$ ). Nessuna delle interazioni fra i fattori considerate per l'analisi è risultata significativa.



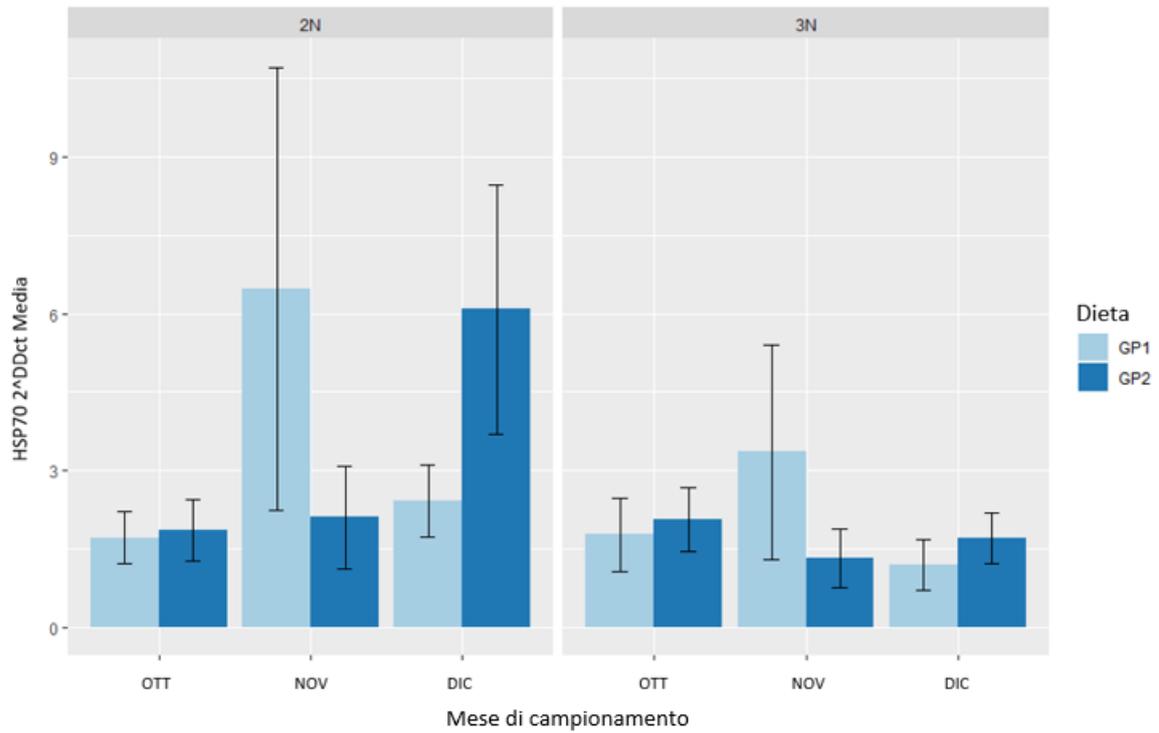
**Figura 4.3.** Livelli di espressione di IGF-I negli animali distinti per ploidia e per diete. L'asse delle ascisse indica il mese di campionamento, l'asse delle ordinate la media dei valori di espressione dell'IGF-I. Le barre rappresentano l'errore standard e gli asterischi indicano le differenze significative. Il livello di significatività è interpretabile secondo la seguente legenda: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '\*'. '.

L'espressione della miostatina (figura 4.4) invece vede il fattore mese di campionamento al limite della significatività ( $p=0.0518$ ), mentre ancora una volta la ploidia e la dieta sono risultati ininfluenti sull'espressione e sulle interazioni tra fattori.



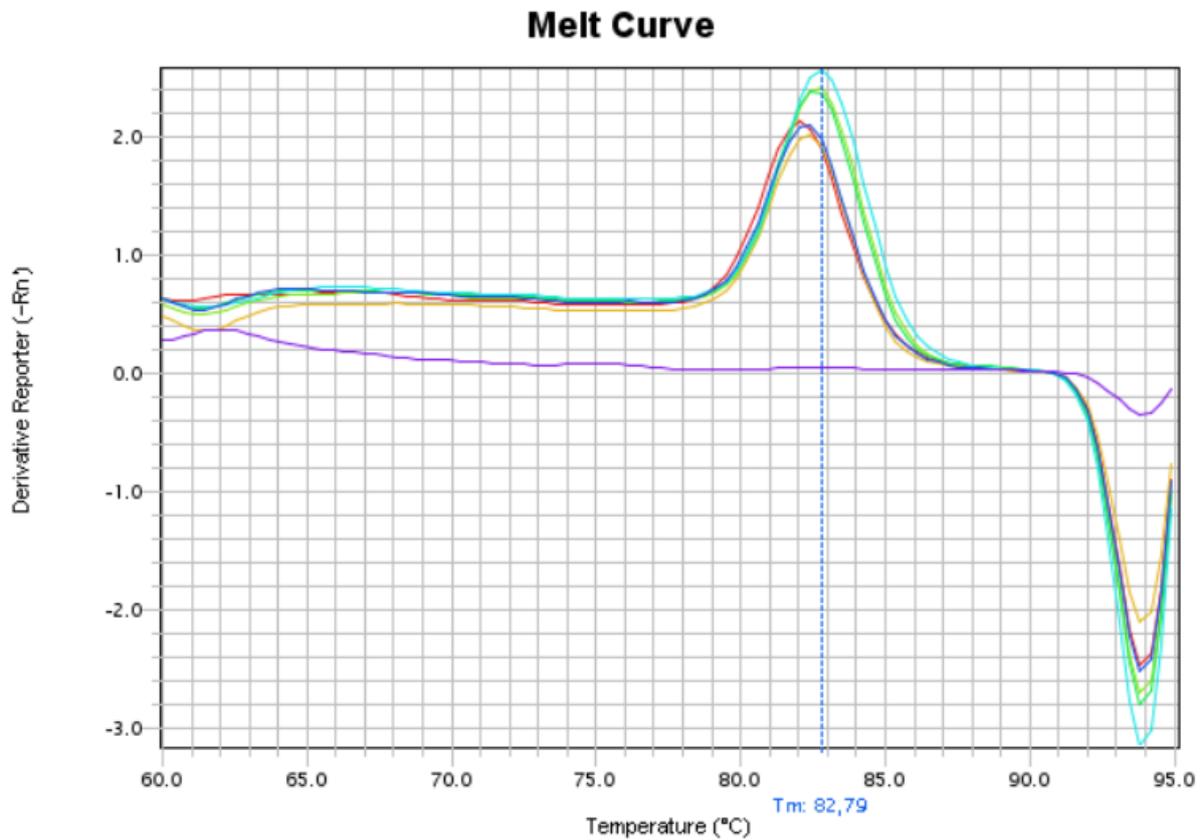
**Figura 4.4.** Livelli di espressione di MSTN negli animali distinti per ploidia e per diete. L'asse delle ascisse indica il mese di campionamento, l'asse delle ordinate la media dei valori di espressione della MSTN. Le barre rappresentano l'errore standard e gli asterischi indicano le differenze significative. Il livello di significatività è interpretabile secondo la seguente legenda: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '!'.

Per l'espressione di HSP70, rappresentata graficamente in figura 4.5, nessuno dei livelli, né delle interazioni considerate, è risultato significativo.



**Figura 4.5.** Livelli di espressione di HSP70 negli animali distinti per ploidia e per diete. L'asse delle ascisse indica il mese di campionamento, l'asse delle ordinate la media dei valori di espressione Di HSP70. Le barre rappresentano l'errore standard e gli asterischi indicano le differenze significative. Il livello di significatività è interpretabile secondo la seguente legenda: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*' 0,01 '\*' 0,05 '.'.

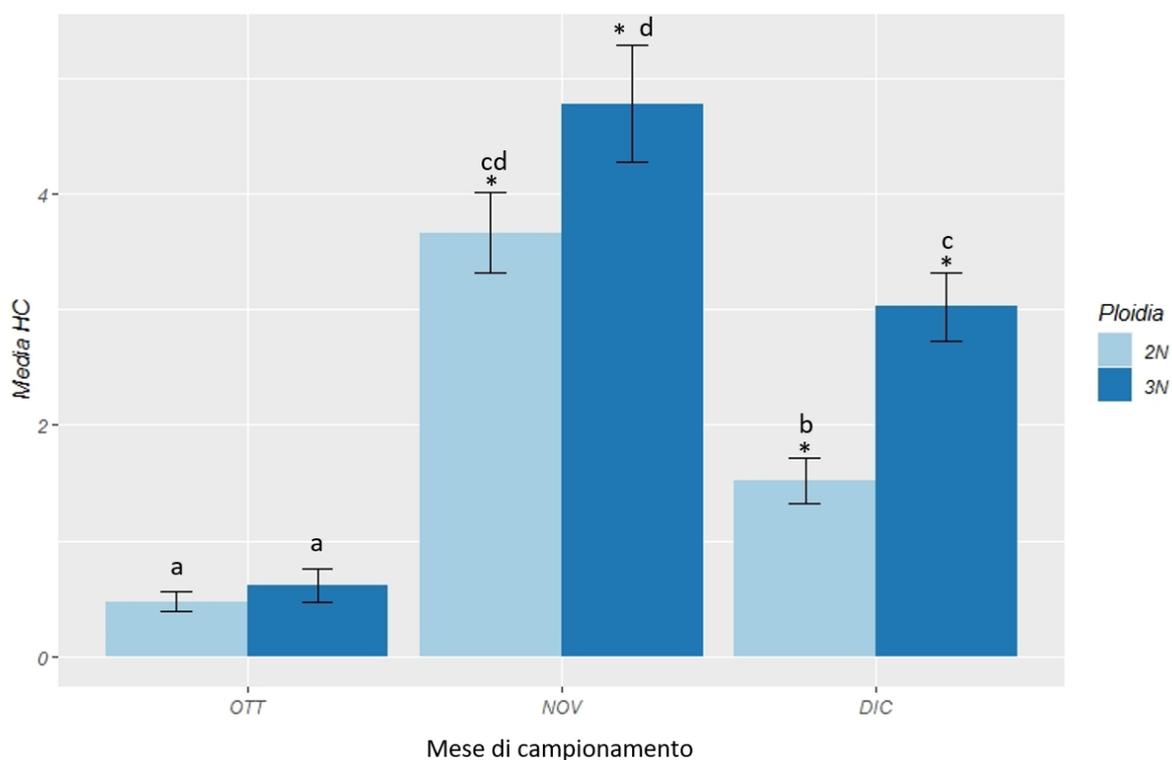
I dati ottenuti con la *real-time* PCR sono stati controllati osservando le curve di melting (figura 4.6). La presenza di un picco unico indica la specificità del saggio, mentre una curva con più picchi è segno di un'amplificazione meno specifica. Pertanto, si è verificato che i campioni, analizzati in triplice copia, presentassero un unico picco e che fosse alla temperatura corretta.



**Figura 4.6.** Curva di *melting* di IGF di novembre. L'analisi della curva di *melting* è stata ottenuta grazie al software 7500 in dotazione. La curva di *melting* è riportata in un grafico con temperatura (ascisse) e fluorescenza (ordinate). Nel grafico riportato si vedono 5 campioni e il controllo negativo, che non presenta alcuna curva.

## 4.2 Risultati RIA

I dati della concentrazione di cortisolo muscolare (HC) ottenuti tramite saggio radioimmunologico (RIA) sono riportati in figura 4.8. Sia il mese di campionamento, con i valori più alti in novembre e dicembre ( $p < 0,001$ ) che la ploidia, con valori più elevati nei triploidi nel mese di dicembre ( $p < 0,001$ ), si sono rivelati altamente influenti sui livelli di questo ormone; mentre la dieta ancora una volta non ha influito sui livelli.

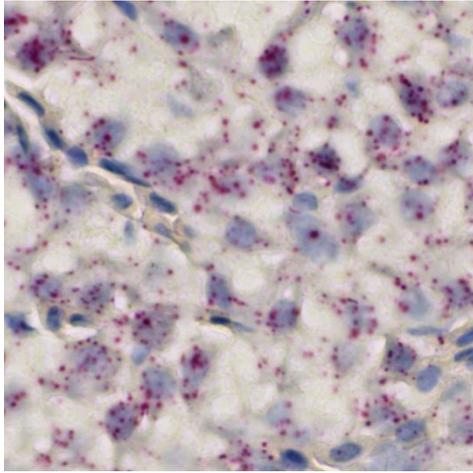


**Figura 4.7.** Livelli di concentrazione del cortisolo muscolare. L'asse delle ascisse indica il mese di campionamento, l'asse delle ordinate la media dei valori di concentrazione del cortisolo. Le barre rappresentano il livello di espressione, con l'errore standard indicato dalle linee. Gli asterischi indicano differenze significative fra le medie rispetto al mese di campionamento. Il livello di significatività è interpretabile secondo la seguente legenda: 0 '\*\*\*\*' 0,001 '\*\*\*' 0,01 '\*\*' 0,05 '. A lettere diverse corrispondono differenze significative rispetto alla ploidia.

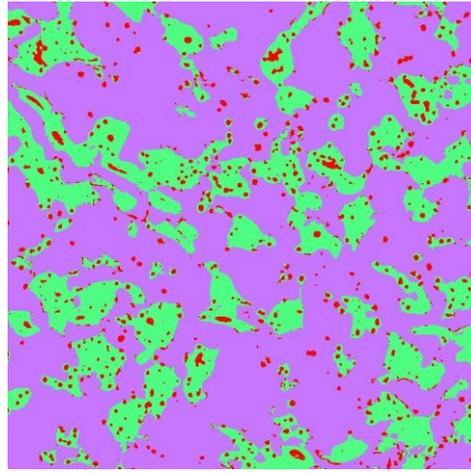
## 4.3 Risultati ibridazione *in situ*

Per quanto concerne l'IGF-I, analizzato con la tecnica dell'ibridazione *in situ* è stato utilizzato un modello misto in cui la variabile mese è stata impostata come effetto fisso e la variabile vetrino (corrispondente ad un animale specifico) come effetto random. Nell'analisi dell'ibridazione *in situ* ci si è concentrati sui campionamenti effettuati nei mesi di ottobre e novembre.

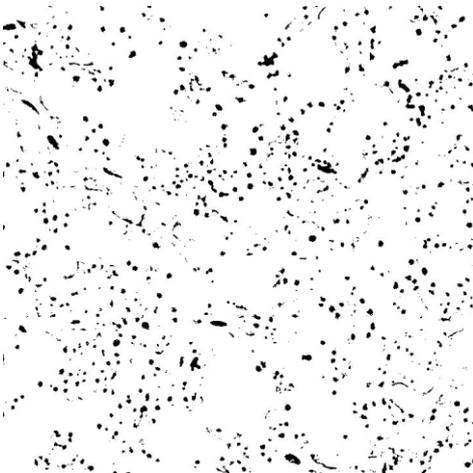
La conta è stata effettuata grazie al plugin Trainable Weka segmentation e sono state classificate tre diverse classi di colorazione: IGF, ematosilina e background, su un'immagine campione utilizzata come riferimento. Dalle immagini ottenute tramite classificazione è stata selezionata la classe di colorazione IGF tramite funzione "threshold" (metodo "Intermodes") e, in seguito alla separazione dei clusters di segnale, è stato stimato il numero di segnali positivi per immagini (Figure 4.8, 4.9, 4.10 e 4.11).



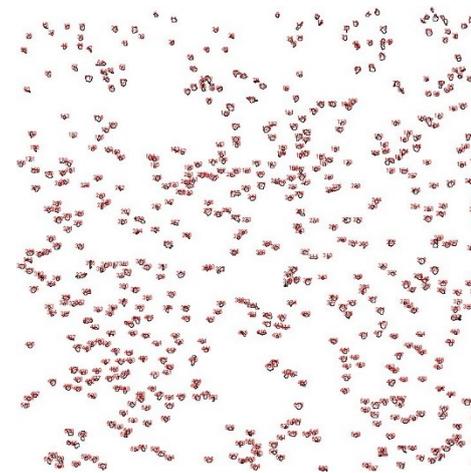
**Figura 4.8.** Vetrino in seguito ai passaggi per l'ibridazione in situ. Ingrandimento 40x.



**Figura 4.9.** Funzione "watersheed" per separare i cluster di segnale.

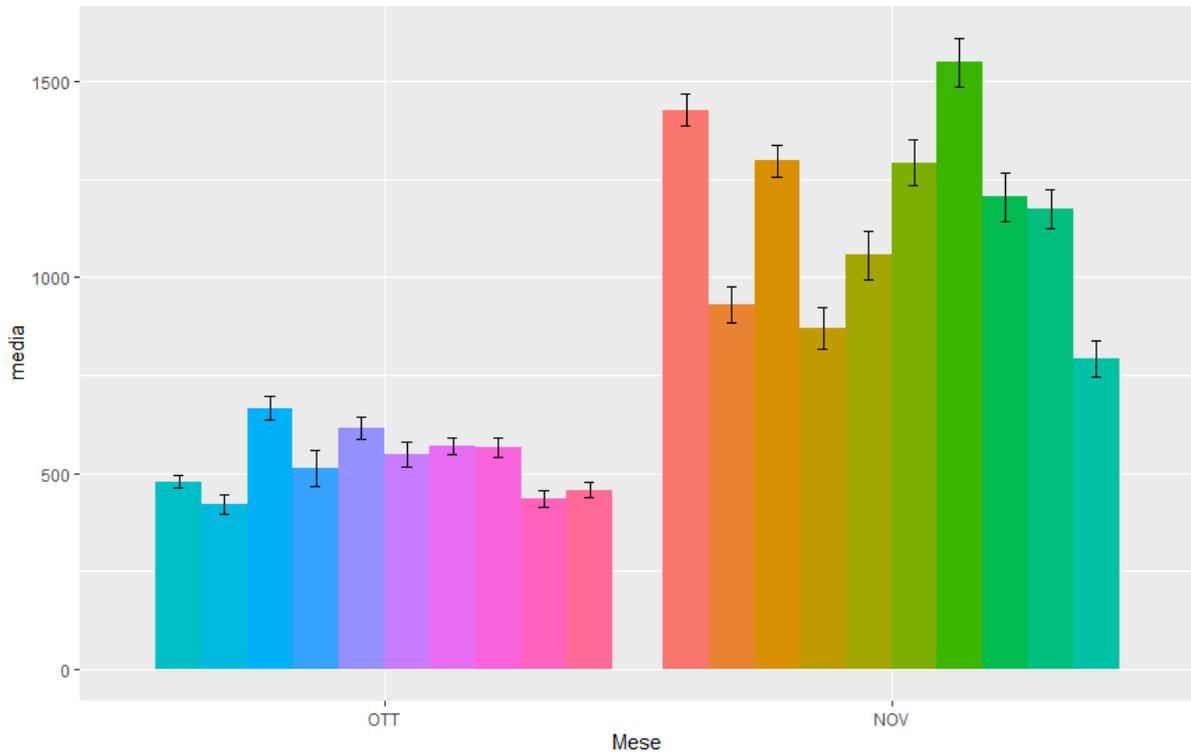


**Figura 4.10.** Funzione "threshold".

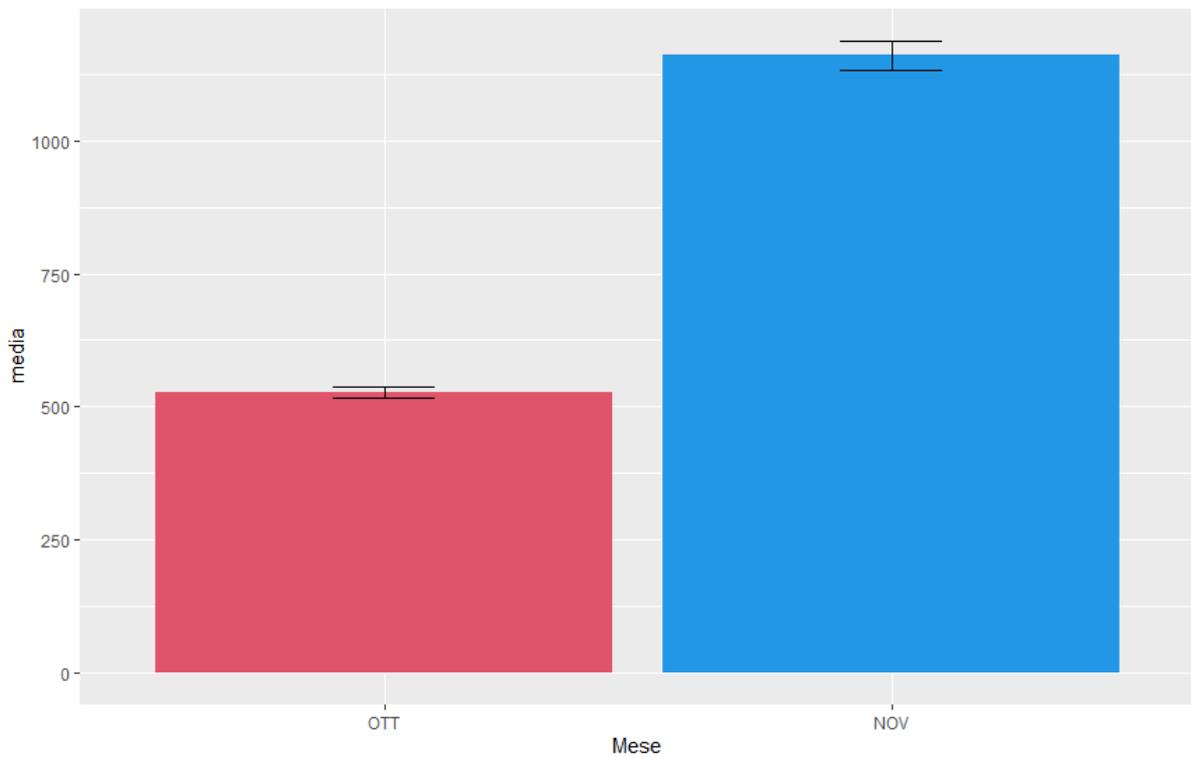


**Figura 4.11.** Funzione "Analyze particles". Stima del numero di segnali positivi per immagine.

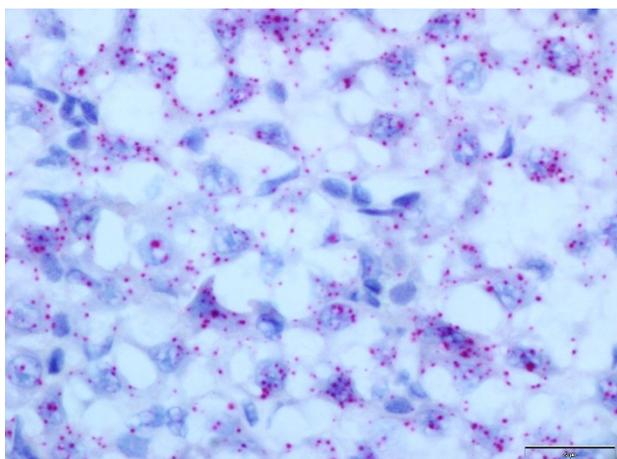
Il numero medio di molecole di mRNA è risultato significativamente più alto nel mese di novembre ( $p < 0,0001$ ; figure 4.12 e 4.13). È possibile apprezzare nelle figure 4.14 e 4.15 come il parenchima epatico abbia mostrato una positività maggiore al segnale nei campioni di novembre rispetto a quelli di ottobre.



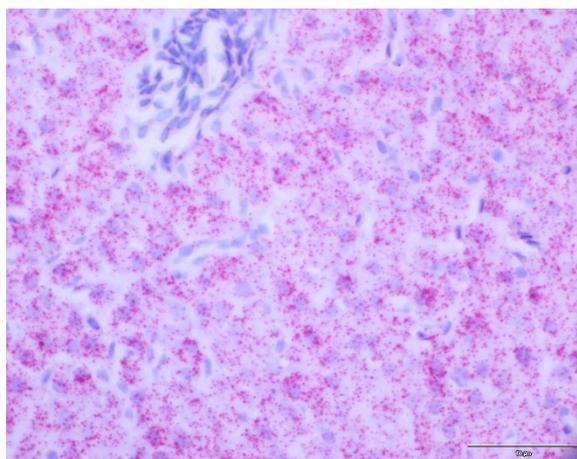
**Figura 4.12.** Numero medio delle molecole di mRNA rilevato in ciascuno degli animali campionati nei mesi di ottobre e novembre (n=10 conte per animale). Le barre rappresentano l'errore standard.



**Figura 4.13.** Media complessiva del numero di molecole di mRNA rilevato negli animali campionati (n=10) nei mesi di ottobre e novembre. Le barre rappresentano l'errore standard.



**Figura 4.14** Ibridazione in situ del parenchima epatico di animali campionati nel mese di ottobre.



**Figura 4.15** Ibridazione in situ del parenchima epatico di animali campionati nel mese di novembre.

## 5. Discussione

Ad oggi l'uso dei salmoni triploidi è un tema ancora dibattuto e il loro utilizzo, ora come in passato, è causa di controversie. Il vantaggio principale della triploidia è la sterilità che ne deriva, poiché, nell'eventualità di fughe accidentali dai sistemi di allevamento, gli animali non possono accoppiarsi con la fauna selvatica e dunque vengono tutelate le linee genetiche dei salmoni selvatici presenti in natura. Assieme alla sterilità, nei triploidi si riscontrano anche altre differenze rispetto ai salmoni diploidi, le principali delle quali sembrano essere a carico soprattutto dei fabbisogni alimentari, dei parametri ambientali, dell'accrescimento e anche del sistema immunitario.

Il sistema di allevamento del salmone atlantico è caratteristico rispetto ad altre specie di acquacoltura, poiché si tratta di un pesce anadromo e pertanto, il suo ciclo biologico include la smoltificazione, una fase critica necessaria per il passaggio dalla vita in acqua dolce a quella di mare. È una fase molto stressante e delicata che rappresenta un punto chiave ed impegnativo nell'allevamento di questa specie. Risulta, dunque, fondamentale che siano chiare le eventuali differenze tra individui triploidi e diploidi anche in questa fase che potrebbe rivelarsi critica. Al fine di chiarire i dubbi riguardo l'utilizzo di salmoni triploidi, è opportuno analizzare le risposte fisiologiche degli animali rispetto ai diploidi normali in termini di risposta allo stress e regolazione della crescita, in particolare durante la smoltificazione, al fine di migliorare le performance e capire se queste linee genetiche triploidi rappresentino un effettivo vantaggio nelle produzioni. Il progetto generale che comprende la parte relativa alla presente tesi prevedeva l'applicazione di condizioni potenzialmente più adatte ai triploidi per la durata dell'intero ciclo, dalla schiusa alla smoltificazione. Per questo progetto gli animali sono stati allevati a basse temperature, in media a 4,8°C, e alimentati con una dieta a base di un mix di farina di pesce e idrolizzato proteico e una dieta standard, entrambe ad alto contenuto di fosforo. Queste condizioni sono potenzialmente ottimali per l'allevamento dei salmoni triploidi, in base ad alcuni studi precedenti si è visto che questi individui hanno esigenze differenti che con cambiamenti nella dieta e nella temperatura dell'acqua potrebbero risolvere alcune problematiche (Fjelldal et al., 2016; Sambraus et al., 2017). Questo progetto è stato svolto anche nell'ottica di contribuire a confermare che, con adeguate condizioni, l'allevamento dei salmoni atlantici triploidi è vantaggioso al pari o di più di quello dei diploidi, sia per il benessere animale sia da un punto di vista produttivo e dunque anche economico.

Per questa tesi sono stati analizzati fattori coinvolti nell'osmoregolazione, nella crescita e nella risposta allo stress; sono stati dunque considerati il GH e il suo recettore, l'IGF-I, la miostatina, il cortisolo e le HSP70. L'analisi è stata eseguita tramite *real-time* PCR per GH, GHrec, IGF-I e miostatina, usando come matrice il muscolo. Si è poi approfondita l'analisi per l'IGF-I con la metodica dell'ibridazione *in situ* partendo da campioni di fegato. La valutazione dei livelli di cortisolo è stata effettuata sul muscolo tramite saggio radioimmunologico (RIA). Molti ormoni sono coinvolti nella regolazione della smoltificazione, in particolare il GH, l'IGF-I, il cortisolo e i loro recettori, stimolando l'adattamento in acqua salata e il cambiamento nell'osmoregolazione (Nilsen et al., 2008). Durante la smoltificazione questi ormoni aumentano, temporaneamente, per guidare la trasformazione (McCormick, 2001). In particolare, i livelli di GH e di cortisolo plasmatici seguono un pattern stagionale durante la smoltificazione, aumentando sia negli animali esposti a fotoperiodo naturale, ma anche in quelli in cui la smoltificazione è indotta tramite manipolazione del fotoperiodo (Björnsson et al., 2000; Sundell et al., 2003). La concentrazione plasmatica di GH viene, ridotta dal fotoperiodo decrescente (Björnsson et al., 2000). Nelle popolazioni chiuse che non effettuano la migrazione e la smoltificazione questi cambiamenti non avvengono e gli aumenti di ormoni e recettori risultano essere attenuati (Nilsen et al., 2007). In questo studio il GH e il suo recettore e l'IGF-I, analizzati tramite *real-time* PCR, hanno mostrato delle differenze significative per quanto riguarda il periodo di smoltificazione, soprattutto con incrementi significativi nei mesi di novembre e/o dicembre, rispetto al loro valore prima del periodo di adattamento (ottobre). Questo cambiamento nei mesi in cui è avvenuta la smoltificazione è un dato importante, infatti, è necessario che i livelli di questi fattori aumentino al fine che ci possa essere un corretto adattamento nell'osmoregolarità in vista della fase in acqua di mare. Le due diete somministrate e la ploidia non hanno influito sulla variazione di questi fattori. Per aver un dato più completo sulla smoltificazione, l'IGF-I è stato analizzato anche mediante la metodica della ibridazione *in situ*, in particolare soffermandosi nei mesi di ottobre e novembre dove si è vista la variazione più significativa e i risultati osservati sono coerenti con quanto ottenuto tramite *real-time* PCR. È stato scelto di approfondire l'analisi dell'IGF-I con l'ibridazione *in situ* poiché si tratta di una tecnica che permette di valutare come la distribuzione di uno specifico acido nucleico, in questo caso mRNA, è correlato alla produzione proteica del gene target e la sua relazione con le strutture cellulari (Jensen, 2014). Il fatto che, a temperatura e dieta ottimali per gli individui triploidi, tutti gli animali siano

riusciti a completare la trasformazione a prescindere dalla ploidia è un dato interessante per la gestione dell'allevamento dei triploidi.

La crescita muscolare dei pesci, nella fase postembrionale, è determinata dall'ipertrofia, ovvero un aumento di dimensioni delle fibre muscolari presenti, ma anche, a differenza dei mammiferi e degli uccelli, dall'iperplasia, l'aumento del numero di fibre dovute al reclutamento di nuovi miotubi (Johnston, 2006). Questi processi avvengono per tutta la vita dell'animale e sono mantenuti da un equilibrio tra l'espressione sequenziale dei fattori regolatori miogenici (MRF) che avviano la proliferazione (Shulgina et al., 2021) e la miostatina, un importante regolatore della crescita muscolare e dell'attivazione e differenziazione delle cellule satelliti (Garikipati & Rodgers, 2012). Per avere dei dati sulla crescita degli animali triploidi in confronto ai diploidi in questo studio si è scelto di analizzare la miostatina; i risultati evidenziano che i fattori considerati, ovvero le due diverse diete, la differente ploidia e il periodo di campionamento, non hanno influenzato in maniera significativa i livelli di miostatina. Nei pesci, la crescita è influenzata da molti fattori ambientali quali l'alimentazione, la temperatura, l'ossigenazione, il pH e il fotoperiodo (Shulgina et al., 2021). Considerando che le condizioni di allevamento erano ottimali anche per i triploidi i risultati non sono diversi da quelli attesi. Anche il mantenimento degli animali a luce continua, ad eccezione di un periodo da settembre a metà ottobre in cui il fotoperiodo è stato modificato a 12 ore di luce e 12 di buio per favorire la smoltificazione, ha avuto un ruolo importante per una crescita regolare (Shulgina et al., 2021). Da questo dato emerge quindi che la ploidia non ha un'influenza sulla crescita muscolare quando gli animali sono allevati in condizioni ottimali. In altri studi la crescita degli animali triploidi è risultata essere comparabile a quella dei diploidi (Taylor et al., 2011), in particolare a basse e costanti temperature le differenze legate alla ploidia si riducono (Benhaïm et al., 2020).

Il cortisolo, nei pesci anadromi, ha un ruolo fondamentale anche nella fase di smoltificazione. Il suo aumento, correlato al fotoperiodo, stimola l'attività delle  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPasi branchiali (McCormick et al., 1991) aumenta la tolleranza alla salinità dell'acqua e agisce in sinergia con il GH e l'IGF-I favorendo l'adattamento al trasferimento in acque salate (McCormick, 1996). Inoltre, il cortisolo stimola l'aumento della capacità di trasporto fluidi dell'intestino che avviene nella trasformazione da *parr* a *smolt* (Veillette et al., 1995). Con questo studio si è voluto valutare anche l'aspetto relativo allo stress nei pesci, sempre di più, infatti, l'attenzione della produzione e del consumatore si sposta verso il benessere animale anche in

acquacoltura. Per tale scopo sono stati considerati sia il cortisolo, ormone essenziale per la risposta allo stress e l'adattamento a diverse salinità, che la famiglia della heat shock proteins (HSP70). Queste proteine, infatti, la cui azione è fondamentale a livello cellulare sono impiegate di frequente come biomarcatori poiché il loro aumento è rapido e significativo in risposta a diversi eventi stressanti.

L'analisi del cortisolo per valutare lo stress nei pesci è fondamentale poiché viene considerato il principale ormone dello stress nei teleostei ed è un indicatore affidabile (Sadoul & Geffroy, 2019). In questo studio, si è scelto di valutare i suoi livelli nel muscolo perché, a differenza dell'analisi da campione di sangue, evita incrementi istantanei dovuti alla manipolazione per il prelievo. Il livello di cortisolo nel muscolo è correlato positivamente a quello plasmatico poiché è un ormone lipofilo che si diffonde facilmente attraverso le membrane cellulari e pertanto arriva a diversi tessuti (Bertotto et al., 2010).

In questo studio l'aumento del cortisolo è risultato essere correlato sia al mese di campionamento, con un aumento significativo nei mesi di novembre e dicembre sia per i diploidi che nei triploidi che alla ploidia, con valori superiori negli animali triploidi nel mese di dicembre quindi, nel periodo in cui è avvenuta la smoltificazione. La relazione tra l'aumento del cortisolo e il periodo analizzato è in linea con quanto riportato in bibliografia; infatti, è un ormone importante per la smoltificazione e il cortisolo plasmatico si è visto essere più elevato negli *smolt* rispetto ai *parr* (Björnsson et al., 2011). Come già accennato, i triploidi da noi esaminati risultano avere dei livelli di cortisolo significativamente maggiori rispetto agli individui diploidi ma solo limitatamente al mese di dicembre. Sadler e collaboratori nel 2000 e Chalmers e collaboratori nel 2018 non hanno evidenziato differenze sui livelli di cortisolo plasmatico su esemplari di *Salmo salar* a diversa ploidia a seguito di stress causato rispettivamente dal confinamento e dopo l'esposizione a perossido di idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Un aumento significativo del cortisolo in salmoni triploidi, rispetto ai diploidi, è invece stato osservato in condizioni di temperature elevate (18°C) e di ipossia (Sambraus et al., 2018). Anche alcuni studi sulla manipolazione e il confinamento su *Salvelinus fontinalis* i livelli di cortisolo plasmatico non hanno mostrato differenze significative correlate alla ploidia (Biron & Benfey, 1994; Benfey & Biron, 2000). In *Salmo salar* è stato evidenziato che la risposta allo stress ha anche una base genetica (Fevolden et al., 1991), ma considerando che i triploidi sono stati ottenuti tramite shock pressorio dallo stesso gruppo di uova che hanno dato origine agli individui diploidi escluderei in questo studio che la differenza possa essere legata alla linea

genetica. Un aspetto da considerare è che rispetto agli studi precedenti, questo ha una particolarità nella scelta della matrice utilizzata per la quantificazione del cortisolo e ad oggi non è possibile fare un confronto con altri studi che abbiano scelto di utilizzare per l'analisi del cortisolo il muscolo e non i livelli plasmatici.

Gli studi citati avevano come obiettivo quello di evidenziare differenze nei livelli di cortisolo plasmatico a seguito di un evento stressante acuto, come la manipolazione o il confinamento, mentre nel nostro, le condizioni di allevamento sono state sempre ottimali e il fatto che il cortisolo sia aumentato durante il periodo di smoltificazione è con tutta probabilità da imputare a questo processo di adattamento/trasformazione che è avvenuta regolarmente sia nei diploidi che nei triploidi. Essendo infatti il cortisolo un ormone coinvolto sia nella smoltificazione che nella risposta allo stress il dato da noi ottenuto potrebbe essere collegato ad uno o ad entrambi i processi. Inoltre, tutti gli altri dati analizzati non hanno evidenziato differenze tra i fattori di regolazione della crescita e di adattamento all'osmoregolazione e nella risposta allo stress tra i due gruppi.

Le HSP70 sono proteine altamente conservate e sono spesso usate come biomarcatori poiché il loro aumento è rapido e significativo in condizioni di stress variabili (Bertotto et al., 2011); sono presenti due forme, una costitutiva (HSC70) che è presente normalmente nelle cellule, senza che sia presente uno stimolo stressante e una forma inducibile (HSP70) (Iwama et al., 1998). L'aumento della forma inducibile in particolare si osserva dopo stress termici, esposizione a tossici e pesticidi, ma anche in caso di trasporto e sovraffollamento (Bertotto et al., 2011) e di stress osmotico (Smith et al., 1999). Negli stadi giovanili di salmone atlantico, l'intervallo termico ottimale per la crescita è intorno ai 15°C-20°C (Jonsson et al., 2001) e si è osservato che i primi segni di stress metabolico si verificano già a 22°C-24°C (Breau et al., 2011). In uno studio di Saranyan e collaboratori del 2017 è stato evidenziato che gli individui triploidi di salmone atlantico, rispetto ai diploidi, hanno negli eritrociti dei livelli basali di HSP più bassi e questo dato suggerisce che i triploidi potrebbero essere limitati nella risposta a stati di stress acuto. In questo studio, le temperature sono sempre state mantenute intorno ai 10°C e pertanto non sono mai stati raggiunti dei valori stressanti per gli animali. Come già accennato, non è solo l'innalzamento termico a causare l'attivazione delle HSP70, ma anche altri fattori stressanti. Sembra che la permanenza prolungata in ambiente ipersalino possa causare un aumento di questa famiglia di proteine e, nel caso dell'allevamento del salmone atlantico, è importante valutarle per verificare che la smoltificazione sia avvenuta con

successo senza sottoporre gli animali ad eccessivo stress osmotico (Smith et al., 1999). Il fatto che l'espressione delle HSP70 non sia stata influenzata da nessuno dei fattori presi in analisi è indice che la smoltificazione non ha comportato stress eccessivo agli animali a prescindere dalla ploidia. Questo dato supporta l'ipotesi che dieta e parametri ambientali adeguati risultano importanti per favorire il benessere degli animali triploidi.

## 6. Conclusioni

Nello studio da noi condotto su salmoni atlantici diploidi e triploidi è stato scelto di somministrare due diete, entrambe bilanciate sulle esigenze dei gruppi a diversa ploidia e mantenere i parametri ambientali a livelli ottimali anche per i triploidi. Questa scelta è stata fatta al fine di minimizzare le differenze dovute a questi fattori, evidenziate da studi precedenti, e verificare se l'opportuna variazione di questi fattori è sufficiente per produrre performance simili negli animali a diversa ploidia. Inoltre, la scelta di condurre lo studio nella fase di smoltificazione è stata fatta per poter analizzare al meglio una delle fasi più delicate della vita e dell'allevamento di *Salmo salar*.

Per quanto concerne i fattori della crescita, coinvolti anche nella trasformazione da *parr* a *smolt*, le differenze che abbiamo riscontrato sembrano più legate al periodo di campionamento e considerando che l'intervallo di tempo copre il processo di smoltificazione è un dato in linea con le aspettative. Le HSP70 analizzate non hanno sottolineato nessuna differenza significativa per nessuno dei fattori considerati, essendo una proteina collegata a diversi tipi di stress ambientale e soprattutto shock termico, ma non alla smoltificazione, il risultato non è differente da quanto atteso. Il fatto che i fattori della crescita e le HSP70 non mostrino differenze collegate alla ploidia è indice che gli animali triploidi riescano ad effettuare la smoltificazione al pari dei fratelli diploidi se le condizioni di allevamento sono tarate sulle esigenze dei triploidi. Il dato relativo al cortisolo risulta essere significativamente differente nei diversi mesi di campionamento e in maniera puntiforme in relazione alla ploidia, aumentando nel periodo di smoltificazione e negli individui triploidi nel solo mese di dicembre. Questa differenza potrebbe essere collegata alla diversa matrice di campionamento, o a differenze lievi nella smoltificazione tra diploidi e triploidi.

Complessivamente, i risultati di questo studio sembrano indicare che con dieta e temperature adeguate le differenze nella crescita e nella risposta allo stress durante il periodo di smoltificazione si appianano e nella maggior parte dei valori analizzati i triploidi hanno mostrato andamenti simili a quelli dei diploidi. Le differenze osservate, invece, per quasi tutti i parametri sono imputabili al momento di campionamento e questo riflette i cambiamenti che avvengono negli animali durante il periodo della smoltificazione.

Sono sempre più necessari studi sulle condizioni di benessere e allevamento dei pesci per via dell'importanza crescente che l'acquacoltura sta assumendo nelle produzioni alimentari. La

sostenibilità è sempre più ricercata per salvaguardare l'ambiente e porterebbe a una visione migliore dell'acquacoltura e dei lavoratori di questo settore da parte del consumatore. Il benessere animale è ormai da tempo associato a produttività e qualità; pertanto, studi specifici possono ampliare la base scientifica e offrire soluzioni pratiche al settore produttivo e commerciale. Questo studio contribuisce ad aumentare le conoscenze sulla fisiologia dei salmoni atlantici triploidi e diploidi nella delicata fase di smoltificazione.

## Riferimenti

### Bibliografia

- Algers, B., Blokhuis, H. J., Broom, D. M., Costa, P., Domingo, M., Greiner, M., Guemene, D., Hartung, J., Koenen, F., Muller-Graf, C., Morton, D. B., Osterhaus, A., Pfeiffer, D. U., Roberts, R., Sanaa, M., Salman, M., Sharp, J. M., Vannier, P., Wierup, M., & Wooldridge, M. (2008). Animal welfare aspects of husbandry systems for farmed Atlantic salmon - Scientific Opinion of the Panel on Animal Health and Welfare. *EFSA Journal*, 6(7). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2008.796>
- Atkins, M. E., & Benfey, T. J. (2008). Effect of acclimation temperature on routine metabolic rate in triploid salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 149(2), 157–161. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2007.11.004>
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 517–525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Begg, K., & Pankhurst, N. W. (2004). Endocrine and metabolic responses to stress in a laboratory population of the tropical damselfish *Acanthochromis polyacanthus*. *Journal of Fish Biology*, 64(1), 133–145. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.2004.00290.X>
- Benfey, T. J., Solar, I. I., de Jong, G., & Donaldson, E. M. (1986). Flow-cytometric confirmation of aneuploidy in sperm from triploid rainbow trout. *Trans Am Fish Soc*, 115, 838–840. [https://doi.org/https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1986\)115<838:FCOALS>2.0.CO;2](https://doi.org/https://doi.org/10.1577/1548-8659(1986)115<838:FCOALS>2.0.CO;2)
- Benfey, T. J. (2001). Use of sterile triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) for aquaculture in New Brunswick, Canada. *ICES Journal of Marine Science*, 58(2), 525–529. <https://doi.org/10.1006/JMSC.2000.1019>
- Benfey, T. J. (2009). Producing sterile and single-sex populations of fish for aquaculture. In G. Burnell & G. Allan (Eds.), *New Technologies in Aquaculture* (pp. 143–164). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845696474.1.143>
- Benfey, T. J. (2011). Physiology of Triploid Fish. In *Encyclopedia of Fish Physiology* (Vol. 3, pp. 2009–2015). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00255-0>
- Benfey, T. J. (2016). Effectiveness of triploidy as a management tool for reproductive containment of farmed fish: Atlantic salmon (*Salmo salar*) as a case study. *Reviews in Aquaculture*, 8(3), 264–282. <https://doi.org/10.1111/RAQ.12092>
- Benhaïm, D., Leblanc, C. A. L., Horri, K., Mannion, K., Galloway, M., Leeper, A., Knobloch, S., Sigurgeirsson, Ó., & Thorarensen, H. (2020). The effect of triploidy on the performance, gut microbiome and behaviour of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*) raised at low temperature. *Applied Animal Behaviour Science*, 229, 105031. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2020.105031>
- Bernier, N. J. (2006). The corticotropin-releasing factor system as a mediator of the appetite-suppressing effects of stress in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 146(1), 45–55. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2005.11.016>
- Berrill, I. K., Porter, M. J. R., Smart, A., Mitchell, D., & Bromage, N. R. (2003). Photoperiodic effects on precocious maturation, growth and smoltification in Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 222(1–4), 239–252. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00125-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00125-X)

- Bertotto, D., Poltronieri, C., Negrato, E., Majolini, D., Radaelli, G., & Simontacchi, C. (2010). Alternative matrices for cortisol measurement in fish. *Aquaculture Research*, 41(8), 1261–1267. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2109.2009.02417.X>
- Bertotto, D., Poltronieri, C., Negrato, E., Richard, J., Pascoli, F., Simontacchi, C., & Radaelli, G. (2011). Whole body cortisol and expression of HSP70, IGF-I and MSTN in early development of sea bass subjected to heat shock. *General and Comparative Endocrinology*, 174(1), 44–50. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2011.08.003>
- Björnsson, B. T., Hemre, G. I., Bjornevik, M., & Hansen, T. (2000). Photoperiod Regulation of Plasma Growth Hormone Levels during Induced Smoltification of Underyearling Atlantic Salmon. *General and Comparative Endocrinology*, 119(1), 17–25. <https://doi.org/10.1006/GCEN.2000.7439>
- Björnsson, B. T., Johansson, V., Benedet, S., Einarsdottir, I. E., Hildahl, J., Agustsson, T., & Jönsson, E. (2002). Growth Hormone Endocrinology of Salmonids: Regulatory Mechanisms and Mode of Action. *Fish Physiology and Biochemistry* 2002 27:3, 27(3), 227–242. <https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000032728.91152.10>
- Björnsson, B. T., Stefansson, S. O., & McCormick, S. D. (2011). Environmental endocrinology of salmon smoltification. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.003>
- Blanco, A. M. (2020). Hypothalamic- and pituitary-derived growth and reproductive hormones and the control of energy balance in fish. In *General and Comparative Endocrinology* (Vol. 287, p. 113322). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113322>
- Breau, C., Cunjak, R. A., & Peake, S. J. (2011). Behaviour during elevated water temperatures: can physiology explain movement of juvenile Atlantic salmon to cool water? *Journal of Animal Ecology*, 80(4), 844–853. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2011.01828.x>
- Breves, J. P., Fujimoto, C. K., Phipps-Costin, S. K., Einarsdottir, I. E., Björnsson, B. T., & McCormick, S. D. (2017). Variation in branchial expression among insulin-like growth-factor binding proteins (igfbps) during Atlantic salmon smoltification and seawater exposure.
- Buck, R. J. G., & Youngson, A. F. (1982). The downstream migration of precociously mature Atlantic salmon, *Salmo salar* L, parr in autumn; its relation to the spawning migration of mature adult fish. *Journal of Fish Biology*, 20(3), 279–288. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.1982.TB04709.X>
- Chalmers, L., Vera, L. M., Taylor, J. F., Adams, A., & Migaud, H. (2018). Comparative ploidy response to experimental hydrogen peroxide exposure in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Fish & Shellfish Immunology*, 81, 354–367. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2018.07.017>
- Chandhini, S., Trumbo, B., Jose, S., Varghese, T., Rajesh, M., & Kumar, V. J. R. (2021). Insulin-like growth factor signalling and its significance as a biomarker in fish and shellfish research. *Fish Physiology and Biochemistry* 2021, 1–21. <https://doi.org/10.1007/S10695-021-00961-6>
- Chrousos, G. P., & Gold, P. W. (1992). The Concepts of Stress and Stress System Disorders: Overview of Physical and Behavioral Homeostasis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 267(9), 1244–1252. <https://doi.org/10.1001/jama.1992.03480090092034>
- Clark, M. S., Fraser, K. P. P., Burns, G., & Peck, L. S. (2007). The HSP70 heat shock response in the Antarctic fish *Harpagifer antarcticus*. *Polar Biology* 2007 31:2, 31(2), 171–180. <https://doi.org/10.1007/S00300-007-0344-5>
- Clemmons, D. R. (2001). Use of Mutagenesis to Probe IGF-Binding Protein Structure/Function Relationships. *Endocrine Reviews*, 22(6), 800–817. <https://doi.org/10.1210/EDRV.22.6.0449>

- Cnaani, A., McLean, E., & Hallerman, E. M. (2013). Effects of growth hormone transgene expression and triploidy on acute stress indicators in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 412–413, 107–116. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2013.06.029>
- Cotterell, S. P., & Wardle, C. S. (2004). Endurance swimming of diploid and triploid Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 65(s1), 55–68. <https://doi.org/10.1111/J.0022-1112.2004.00552.X>
- Deal, C. K., & Volkoff, H. (2020). The Role of the Thyroid Axis in Fish. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 861. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.596585>
- Dickhoff, W. W., Beckman, B. R., Larsen, D. A., Duan, C., & Moriyama, S. (1997). *The role of growth in endocrine regulation of salmon smoltification*. 231–236.
- Dittman, A. H., & Quinn, T. P. (1996). *Homing in Pacific salmon: mechanisms and ecological basis*. 91, 83–91.
- Duan, C. (2002). Specifying the cellular responses to IGF signals: roles of IGF-binding proteins. *Journal of Endocrinology*, 175(1), 41–54. <https://doi.org/10.1677/JOE.0.1750041>
- Duan, Cunming, Ren, H., & Gao, S. (2010). Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: Roles in skeletal muscle growth and differentiation. *General and Comparative Endocrinology*, 167(3), 344–351. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2010.04.009>
- Edwards, P., & Demaine, H. (1998). *Rural aquaculture: Overview and Framework for Country Reviews*. FAO. <http://www.fao.org/3/x6941e/x6941e00.htm#Contents>
- Evans, D. H. (2008). Teleost fish osmoregulation: What have we learned since August Krogh, Homer Smith, and Ancel Keys. In *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* (Vol. 295, Issue 2). American Physiological Society. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90337.2008>
- FAO. 2020. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- Firth, S. M., & Baxter, R. C. (2002). Cellular Actions of the Insulin-Like Growth Factor Binding Proteins. *Endocrine Reviews*, 23(6), 824–854. <https://doi.org/10.1210/ER.2001-0033>
- Fjelldal, P. G., & Hansen, T. (2010). Vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) underyearling smolts. *Aquaculture*, 309(1–4), 131–136. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2010.09.027>
- Fjelldal, P. G., Wennevik, V., Fleming, I. A., Hansen, T., & Glover, K. A. (2014). Triploid (sterile) farmed Atlantic salmon males attempt to spawn with wild females. *Aquaculture Environment Interactions*, 5(2), 155–162. <https://doi.org/10.3354/AEI00102>
- Fjelldal, P. G., Hansen, T. J., Lock, E. J., Wargelius, A., Fraser, T. W. K., Sambraus, F., El-Mowafi, A., Albrektsen, S., Waagbø, R., & Ørnsrud, R. (2016). Increased dietary phosphorous prevents vertebral deformities in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Nutrition*, 22(1), 72–90. <https://doi.org/10.1111/ANU.12238>
- Fleming, I. A. (1996). Reproductive strategies of Atlantic salmon: Ecology and evolution. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6(4), 379–416. <https://doi.org/10.1007/BF00164323>
- Folmar, L. C., & Dickhoff, W. W. (1980). The parr-Smolt transformation (smoltification) and seawater adaptation in salmonids: A review of selected literature. *Aquacult* 21(1), 1-37 Mar and Dickhoff.
- Fraser, Thomas W.K., Fjelldal, P. G., Hansen, T., & Mayer, I. (2012). Welfare considerations of triploid fish. *Reviews in Fisheries Science*, 20(4), 192–211.

<https://doi.org/10.1080/10641262.2012.704598>

- Fraser, Thomas W.K., Hansen, T., Skjæraasen, J. E., Mayer, I., Sambraus, F., & Fjelldal, P. G. (2013). The effect of triploidy on the culture performance, deformity prevalence, and heart morphology in Atlantic salmon. *Aquaculture*, 416–417, 255–264. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2013.09.034>
- Fraser, T W K, Hansen, T., Fleming, M. S., & Fjelldal, P. G. (2015). The prevalence of vertebral deformities is increased with higher egg incubation temperatures and triploidy in Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 38(1), 75–89. <https://doi.org/10.1111/JFD.12206>
- Gabillard, J. C., Biga, P. R., Rescan, P. Y., & Seiliez, I. (2013). Revisiting the paradigm of myostatin in vertebrates: Insights from fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 194, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.08.012>
- Garikipati, D. K., & Rodgers, B. D. (2012). Myostatin stimulates myosatellite cell differentiation in a novel model system: Evidence for gene subfunctionalization. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 302(9), 1059–1066. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00523.2011>
- Gibson, R. J. (1993). The Atlantic salmon in fresh water: spawning, rearing and production. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 1993 3:1, 3(1), 39–73. <https://doi.org/10.1007/BF00043297>
- Glover, K. A., Otterå, H., Olsen, R. E., Slinde, E., Taranger, G. L., & Skaala, Ø. (2009). A comparison of farmed, wild and hybrid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) reared under farming conditions. *Aquaculture*, 286(3–4), 203–210. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2008.09.023>
- Handeland, S. O., Järvi, T., Fernö, A., & Stefansson, S. O. (1996). Osmotic stress, antipredatory behaviour, and mortality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(12), 2673–2680. <https://doi.org/10.1139/cjfas-53-12-2673>
- Hansen, L. P., & Quinn, T. P. (1998). *The marine phase of the Atlantic salmon ( Salmo salar ) life cycle , with comparisons to Pacific salmon*. 55, 104–118.
- Hansen, T. J., Olsen, R. E., Stien, L., Oppedal, F., Torgersen, T., Breck, O., Remen, M., Vågseth, T., & Fjelldal, P. G. (2015). Effect of water oxygen level on performance of diploid and triploid Atlantic salmon post-smolts reared at high temperature. *Aquaculture*, 435, 354–360. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2014.10.017>
- Iwama, G. K., Thomas, P. T., Forsyth, R. B., & Vijayan, M. M. (1998). Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 8(1), 35–56. <https://doi.org/10.1023/A:1008812500650>
- Iwama, G. K., Afonso, L. O. B., Todgham, A., Ackerman, P., & Nakano, K. (2004). Are hsps suitable for indicating stressed states in fish? *Journal of Experimental Biology*, 207(1), 15–19. <https://doi.org/10.1242/JEB.00707>
- Jensen, Dempster, T., Thorstad, E. B., Uglem, I., & Fredheim, A. (2010). Escapes of fishes from Norwegian sea-cage aquaculture: Causes, consequences and prevention. *Aquaculture Environment Interactions*, 1(1), 71–83. <https://doi.org/10.3354/AEI00008>
- Jensen, E. (2014). Technical Review: In Situ Hybridization. *The Anatomical Record*, 297(8), 1349–1353. <https://doi.org/10.1002/AR.22944>
- Jonsson, B., Forseth, T., Jensen, A. J., & Næsje, T. F. (2001). Thermal performance of juvenile Atlantic Salmon, *Salmo salar* L. *Functional Ecology*, 15(6), 701–711. <https://doi.org/10.1046/J.0269-8463.2001.00572.X>

- Johnston, I. A., Manthri, S., Alderson, R., Smart, A., Campbell, P., Nickell, D., Robertson, B., Paxton, C. G. M., & Burt, M. L. (2003). Freshwater environment affects growth rate and muscle fibre recruitment in seawater stages of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Journal of Experimental Biology*, *206*(8), 1337–1351. <https://doi.org/10.1242/JEB.00262>
- Johnston, I. A. (2006). Environment and plasticity of myogenesis in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, *209*(12), 2249–2264. <https://doi.org/10.1242/JEB.02153>
- Johnston, I. A., Bower, N. I., & Macqueen, D. J. (2011). Growth and the regulation of myotomal muscle mass in teleost fish. *Journal of Experimental Biology*, *214*(10), 1617–1628. <https://doi.org/10.1242/JEB.038620>
- Klemetsen, A., Amundsen, P., Dempson, J., & Jonsson, B. (2003). *Atlantic salmon Salmo salar L., brown trout Salmo trutta L. and Arctic charr Salvelinus alpinus (L.): a review of aspects of their life histories*. 1–59.
- Kopchick, J. J., & Andry, J. M. (2000). Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Molecular Genetics and Metabolism*, *71*(1–2), 293–314. <https://doi.org/10.1006/mgme.2000.3068>
- Kottelat, M., & Freyhof, J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Publications Kottelat, Cornol and Freyhof, Berlin. 395–408.
- Langhorne, P., & Simpson, T. H. (1986). The interrelationship of cortisol, Gill (Na + K) ATPase, and homeostasis during the Parr-Smolt transformation of atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *General and Comparative Endocrinology*, *61*(2), 203–213. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(86\)90198-X](https://doi.org/10.1016/0016-6480(86)90198-X)
- Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.-L., & Butler, A. (2001). The Somatomedin Hypothesis: 2001. *Endocrine Reviews*, *22*(1), 53–74. <https://doi.org/10.1210/EDRV.22.1.0419>
- Leclercq, E., Taylor, J. F., Fison, D., Fjellidal, P. G., Diez-Padriza, M., Hansen, T., & Migaud, H. (2011). Comparative seawater performance and deformity prevalence in out-of-season diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *158*(1), 116–125. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2010.09.018>
- Li, Z., & Srivastava, P. (2003). Heat-Shock Proteins. *Current Protocols in Immunology*, *58*(1), A.1T.1-A.1T.6. <https://doi.org/10.1002/0471142735.IMA01TS58>
- Mancera, J. M., & McCormick, S. D. (2019). Role of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor i and cortisol in teleost osmoregulation. In *Fish Osmoregulation* (1st ed., pp. 497–515). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b10994-16>
- Mazzei, M., Vascellari, M., Zanardello, C., Melchiotti, E., Vannini, S., Forzan, M., Marchetti, V., Albanese, F., & Abramo, F. (2019). Quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and RNAscope in situ hybridization (RNA-ISH) as effective tools to diagnose feline herpesvirus-1-associated dermatitis. *Veterinary Dermatology*, *30*(6), 491-e147. <https://doi.org/10.1111/VDE.12787>
- McCormick, S. D., Dickhoff, W. W., Duston, J., Nishioka, R. S., & Bern, H. A. (1991). Developmental differences in the responsiveness of gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase to cortisol in salmonids. *General and Comparative Endocrinology*, *84*(2), 308–317. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(91\)90054-A](https://doi.org/10.1016/0016-6480(91)90054-A)
- McCormick, S. D. (1996). Effects of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor I on Salinity Tolerance and Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Interaction with Cortisol. *General and Comparative Endocrinology*, *101*(1), 3–11.

<https://doi.org/10.1006/GCEN.1996.0002>

- McCormick, S. D., Hansen, L. P., Quinn, T. P., & Saunders, R. L. (1998). Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(S1), 77–92. <https://doi.org/10.1139/d98-011>
- McCormick, S. D. (2001). Endocrine control of osmoregulation in teleost fish. *American Zoologist*, 41(4), 781–794. <https://doi.org/10.1093/icb/41.4.781>
- McCormick, S. D., Shrimpton, J. M., Moriyama, S., & Björnsson, B. T. (2007). Differential hormonal responses of Atlantic salmon parr and smolt to increased daylength: A possible developmental basis for smolting. *Aquaculture*, 273(2–3), 337–344. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.10.015>
- McCormick, S. D. (2011). The Hormonal Control of Osmoregulation in Teleost Fish. In *Encyclopedia of Fish Physiology* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1016/B978-0-1237-4553-8.00212-4>
- McPherron, A. C., Lawler, A. M., & Lee, S.-J. (1997). Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature* 1997 387:6628, 387(6628), 83–90. <https://doi.org/10.1038/387083a0>
- McPherron, A. C., & Lee, S.-J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23), 12457–12461. <https://doi.org/10.1073/PNAS.94.23.12457>
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M., & Moon, T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 1999 9:3, 9(3), 211–268. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>
- Mommsen, T. P. (2001). Paradigms of growth in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2–3), 207–219. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00312-8](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00312-8)
- Moriyama, S., Ayson, F. G., & Kawauchi, H. (2000). Growth regulation by insulin-like growth factor-i in fish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(8), 1553–1562. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1553>
- Murray, D. S., Kainz, M. J., Hebberecht, L., Sales, K. R., Hindar, K., & Gage, M. J. G. (2018). Comparisons of reproductive function and fatty acid fillet quality between triploid and diploid farm Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Royal Society Open Science*, 5(8). <https://doi.org/10.1098/RSOS.180493>
- Nadjar-Boger, E., Maccatrozzo, L., Radaelli, G., & Funkenstein, B. (2013). Genomic cloning and promoter functional analysis of myostatin-2 in shi drum, *Umbrina cirrosa*: Conservation of muscle-specific promoter activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 164(2), 99–110. <https://doi.org/10.1016/J.CBPB.2012.11.003>
- Nilsen, T. O., Ebbesson, L. O. E., Madsen, S. S., McCormick, S. D., Andersson, E., Björnsson, B. T., Prunet, P., & Stefansson, S. O. (2007). Differential expression of gill Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits, Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>,2Cl-cotransporter and CFTR anion channel in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon *Salmo salar*. *Journal of Experimental Biology*, 210(16), 2885–2896. <https://doi.org/10.1242/JEB.002873>
- Nilsen, T. O., Ebbesson, L. O. E., Kiillerich, P., Björnsson, B. T., Madsen, S. S., McCormick, S. D., & Stefansson, S. O. (2008). Endocrine systems in juvenile anadromous and landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*): Seasonal development and seawater acclimation. *General and Comparative Endocrinology*, 155(3), 762–772. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2007.08.006>

- Nisembaum, L. G., Martin, P., Lecomte, F., & Falcón, J. (2021). Melatonin and osmoregulation in fish: A focus on Atlantic salmon *Salmo salar* smoltification. *Journal of Neuroendocrinology*, 33(3). <https://doi.org/10.1111/jne.12955>
- Nuez-Ortín, W. G., Carter, C. G., Wilson, R., Cooke, I. R., Amoroso, G., Cobcroft, J. M., & Nichols, P. D. (2017). Triploid Atlantic salmon shows similar performance, fatty acid composition and proteome response to diploids during early freshwater rearing. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 22, 67–77. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbd.2017.02.005>
- Ojima, D., & Iwata, M. (2007). The relationship between thyroxine surge and onset of downstream migration in chum salmon *Oncorhynchus keta* fry. *Aquaculture*, 273(2–3), 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.10.024>
- Page, L. M., & Burr, B. M. (1991). A field guide to freshwater fishes: North America north of Mexico. In *Choice Reviews Online* (Vol. 29, Issue 02, pages 50-51). <https://doi.org/10.5860/choice.29-0687>
- Palmisano, A. N., Winton, J. R., & Dickhoff, W. W. (2000). Tissue-specific induction of Hsp90 mRNA and plasma cortisol response in chinook salmon following heat shock, seawater challenge, and handling challenge. *Marine Biotechnology*, 2(4), 329–338. <https://doi.org/10.1007/s101260000005>
- Pandian, T. J., & Koteeswaran, R. (1998). Ploidy induction and sex control in fish. *Hydrobiologia* 1998 384:1, 384(1), 167–243. <https://doi.org/10.1023/A:1003332526659>
- Pankhurst, N. W. (2011). The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), 265–275. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2010.07.017>
- Pascoli, F., Lanzano, G. S., Negrato, E., Poltronieri, C., Trocino, A., Radaelli, G., & Bertotto, D. (2011). Seasonal effects on hematological and innate immune parameters in sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology*, 31(6), 1081–1087. <https://doi.org/10.1016/J.FSI.2011.09.014>
- Patrino, M., Sivieri, S., Poltronieri, C., Sacchetto, R., Maccatrozzo, L., Martinello, T., Funkenstein, B., & Radaelli, G. (2007). Real-time polymerase chain reaction, in situ hybridization and immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-I and myostatin during development of *Dicentrarchus labrax* (Pisces: Osteichthyes). *Cell and Tissue Research*, 331(3), 643–658. <https://doi.org/10.1007/S00441-007-0517-0>
- Perry, S. F., & Bernier, N. J. (1999). The acute humoral adrenergic stress response in fish: facts and fiction. *Aquaculture*, 177, 285–295.
- Peruzzi, S., Puvanendran, V., Riesen, G., Seim, R. R., Hagen, Ø., Martínez-Llorens, S., Falk-Petersen, I.-B., Fernandes, J. M. O., & Jobling, M. (2018). Growth and development of skeletal anomalies in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed phosphorus-rich diets with fish meal and hydrolyzed fish protein. *PLoS ONE*, 13(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0194340>
- Piferrer, F., Beaumont, A., Falguière, J. C., Flajšhans, M., Haffray, P., & Colombo, L. (2009). Polyploid fish and shellfish: Production, biology and applications to aquaculture for performance improvement and genetic containment. *Aquaculture*, 293(3–4), 125–156. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2009.04.036>
- Poltronieri, C., Maccatrozzo, L., Simontacchi, C., Bertotto, D., Funkenstein, B., Patrino, M., & Radaelli, G. (2007). Quantitative RT-PCR analysis and immunohistochemical localization of HSP70 in sea

- bass *Dicentrarchus labrax* exposed to transport stress. *European Journal of Histochemistry*, 51(2), 125–136. <https://doi.org/10.4081/1134>
- Poltronieri, C., Negrato, E., Bertotto, D., Majolini, D., Simontacchi, C., & Radaelli, G. (2008). Immunohistochemical localization of constitutive and inducible Heat Shock Protein 70 in carp (*Cyprinus carpio*) and trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to transport stress. *European Journal of Histochemistry*, 52(3), 191–198. <https://doi.org/10.4081/1211>
- Prunet, P., Pisam, M., Claireaux, J. P., Boeuf, G., & Rambourg, A. (1994). Effects of growth hormone on gill chloride cells in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 266(3), 35–39. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1994.266.3.r850>
- Purser, J. (2003). Salmonids. In *Aquaculture: Farming Aquatic Animals and Plants* (3rd ed., pp. 363–388).
- Radaelli, G., Patrino, M., Maccatrozzo, L., & Funkenstein, B. (2003). Expression and cellular localization of insulin-like growth factor-II protein and mRNA in *Sparus aurata* during development. *The Journal of Endocrinology*, 178(2), 285–299. <https://doi.org/10.1677/JOE.0.1780285>
- Reinecke, M., Björnsson, B. T., Dickhoff, W. W., McCormick, S. D., Navarro, I., Power, D. M., & Gutiérrez, J. (2005). Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1–2), 20–24. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2005.01.016>
- Ritossa, F. (1962). A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 18:12, 18(12), 571–573. <https://doi.org/10.1007/BF02172188>
- Rochard, E., & Elie, P. (1994). *La macrofaune aquatique de l'estuaire de la Gironde*. Contribution au livre blanc de l'Agence de l'Eau Adour Garonne. Agence de l'Eau Adour-Garonne, Éditions Bergeret, Bordeaux, France. p.18
- Sadler, J., Pankhurst, N. W., Pankhurst, P. M., & King, H. (2000). Physiological stress responses to confinement in diploid and triploid Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, 56(3), 506–518. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8649.2000.TB00751.X>
- Sadler, J., Pankhurst, P. M., & King, H. R. (2001). High prevalence of skeletal deformity and reduced gill surface area in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 198(3–4), 369–386. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00508-7](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00508-7)
- Sakamoto, T., & Hirano, T. (1993). Expression of insulin-like growth factor I gene in osmoregulatory organs during seawater adaptation of the salmonid fish: Possible mode of osmoregulatory action of growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(5), 1912–1916. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.5.1912>
- Sambraus, F., Olsen, R. E., Remen, M., Hansen, T. J., Torgersen, T., & Fjellidal, P. G. (2017). Water temperature and oxygen: The effect of triploidy on performance and metabolism in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) post-smolts. *Aquaculture*, 473, 1–12. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2017.01.024>
- Sambraus, F., Remen, M., Olsen, R., Hansen, T., Waagbø, R., Torgersen, T., Lock, E., Imsland, A., Fraser, T., & Fjellidal, P. (2018). Changes in water temperature and oxygen: the effect of triploidy on performance and metabolism in large farmed Atlantic salmon. *Aquaculture Environment Interactions*, 10, 157–172. <https://doi.org/10.3354/aei00260>
- Saranyan, P. V., Ross, N. W., & Benfey, T. J. (2017). Erythrocyte heat shock protein responses to chronic

- (in vivo) and acute (in vitro) temperature challenge in diploid and triploid salmonids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 206, 95–104. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2017.01.007>
- Sathiyaa, R., Campbell, T., & Vijayan, M. M. (2001). Cortisol modulates HSP90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, 129(2–3), 679–685. [https://doi.org/10.1016/S1096-4959\(01\)00373-6](https://doi.org/10.1016/S1096-4959(01)00373-6)
- Shrimpton, J. M., & McCormick, S. D. (1998). *Regulation of Gill Cytosolic Corticosteroid Receptors in Juvenile Atlantic Salmon: Interaction Effects of Growth Hormone with Prolactin and Triiodothyronine*. 274, 262–274.
- Shulgina, N. S., Churova, M. V., Murzina, S. A., Krupnova, M. Y., & Nemova, N. N. (2021). The Effect of Continuous Light on Growth and Muscle-Specific Gene Expression in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) Yearlings. *Life*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/LIFE11040328>
- Skilbrei, O. (1991). Importance of Threshold Length and Photoperiod for the Development of Bimodal Length – Frequency Distribution in Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. <https://doi.org/10.1139/f91-255>
- Smedley, M. A., Migaud, H., McStay, E. L., Clarkson, M., Bozzolla, P., Campbell, P., & Taylor, J. F. (2018). Impact of dietary phosphorous in diploid and triploid Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) with reference to early skeletal development in freshwater. *Aquaculture (Amsterdam, Netherlands)*, 490, 329. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.02.049>
- Smith, T. R., Tremblay, G. C., & Bradley, T. M. (1999). Hsp70 and a 54 kDa protein (Osp54) are induced in salmon (*Salmo salar*) in response to hyperosmotic stress. *Journal of Experimental Zoology*, 284(3), 286–298. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19990801\)284:3<286::AID-JEZ6>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19990801)284:3<286::AID-JEZ6>3.0.CO;2-J)
- Stefansson, Sigurd O., Hansen, T., Björnsson, B. T., Haux, C., Taranger, G. L., & Saunders, R. L. (1991). Growth, Parr – Smolt Transformation, and Changes in Growth Hormone of Growth, Parr-Smolt Transformation, and Changes in Growth Hormone of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Reared under Different Photoperiods. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 2100-2108. <https://doi.org/10.1139/f91-249>
- Stefansson, Sigurd Olav, Berge, A. I., & Gunnarsson, G. S. (1998). *Changes in seawater tolerance and gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity during desmoltification in Atlantic salmon kept in freshwater at different temperatures* q. 0044, 271–277.
- Stefansson, Sigurd O., Björnsson, B. T., Ebbeson, L. O., & McCormick, S. D. (2008). Smoltification. *Atlantic*, 639–681.
- Struthers, G., Jenkins, D., & Shearer, W. M. (1987). The Status of the Atlantic Salmon in Scotland. In *The Journal of Applied Ecology* (Vol. 24, Issue 2, p. 703). <https://doi.org/10.2307/2403905>
- Sundell, K., Jutfelt, F., Ágústsson, T., Olsen, R. E., Sandblom, E., Hansen, T., & Björnsson, B. T. (2003). Intestinal transport mechanisms and plasma cortisol levels during normal and out-of-season parr–smolt transformation of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture*, 222(1–4), 265–285. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00127-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00127-3)
- Takvam, M., Wood, C. M., Kryvi, H., & Nilsen, T. O. (2021). Ion Transporters and Osmoregulation in the Kidney of Teleost Fishes as a Function of Salinity. *Frontiers in Physiology*, 0, 513. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2021.664588>
- Taylor, J F, Preston, A. C., Guy, D., & Migaud, H. (2011). Ploidy effects on hatchery survival, deformities, and performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 315(1), 61–68. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.11.029>

- Taylor, John Frank, Sambraus, F., Mota-Velasco, J., Guy, D. R., Hamilton, A., Hunter, D., Corrigan, D., & Migaud, H. (2013). Ploidy and family effects on Atlantic salmon (*Salmo salar*) growth, deformity and harvest quality during a full commercial production cycle. *Aquaculture*, 410–411, 41–50. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2013.06.004>
- Taylor, J. F., Bozzolla, P., Frenzl, B., Matthew, C., Hunter, D., & Migaud, H. (2014). Triploid Atlantic salmon growth is negatively affected by communal ploidy rearing during seawater grow-out in tanks. *Aquaculture*, 432, 163–174. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2014.05.014>
- Taylor, J.F., Waagbø, R., Diez-Padrisa, M., Campbell, P., Walton, J., Hunter, D., Matthew, C., & Migaud, H. (2015). Adult triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*) have higher dietary histidine requirements to prevent cataract development in seawater. *Aquaculture Nutrition*, 21(1), 18–32. <https://doi.org/10.1111/ANU.12130>
- Thorstad, E. (2020). *Status of wild Atlantic salmon in Norway 2020 Norwegian Scientific Advisory Committee for Atlantic Salmon*. 1, 1–9. <https://hdl.handle.net/11250/2657947>
- Tiwary, B. K., Kirubakaran, R., & Ray, A. K. (2004). The biology of triploid fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 2005 14:4, 14(4), 391–402. <https://doi.org/10.1007/S11160-004-8361-8>
- Veillette, P. A., Sundell, K., & Specker, J. L. (1995). Cortisol Mediates the Increase in Intestinal Fluid Absorption in Atlantic Salmon during Parr-Smolt Transformation. *General and Comparative Endocrinology*, 97(2), 250–258. <https://doi.org/10.1006/GCEN.1995.1024>
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L., Bui, S., Nielson, A., Wu, X., Vo, H., Ma, X., & Luo, Y. (2012). RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 14(1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/J.JMOLDX.2011.08.002>
- Wedemeyer, G. A., Saunders, R. L., & Clarke, W. C. (1980). Environmental factors affecting smoltification and early marine survival of anadromous salmonids. *North American Salmon Research Center Report*, 5(June).
- Welch, N. J. (1993). Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Molecular Chaperones*, 71–77. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2108-8\\_9](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2108-8_9)
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3), 591–625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>
- Wood, A. W., Duan, C., & Bern, H. A. (2005). Insulin-Like Growth Factor Signaling in Fish. *Article in International Review of Cytology*. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(05\)43004-1](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(05)43004-1)
- Yamashita, M., Yabu, T., & Ojima, N. (2010). Stress Protein HSP70 in Fish. *Aqua-BioScience Monographs*, 3(4), 111–141. <https://doi.org/10.5047/ABSM.2010.00304.0111>
- Young, G., Björnsson, B. T., Prunet, P., Lin, R. J., Bern, A., Young, G., Björnsson, B. T., Prunet, P., Lin, R. J., & Smoltification, H. A. B. (1989). *Smoltification and seawater adaptation in Coho salmon (Oncorhynchus kisutch): Plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones, and cortisol*.

## Sitografia

Sito web Eurostat, data di consultazione 28/03/2021:

[https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Fishery\\_statistics#cite\\_ref-5](https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Fishery_statistics#cite_ref-5)

Sito Wikimedia Commons, data di consultazione 10/07/2021:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Atlantic\\_salmon\\_parr.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Atlantic_salmon_parr.jpg)

Sito Wikimedia Commons, data di consultazione 10/07/2021:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Smaablank-han-storhun-v-pho2012\\_K2E2855\\_copy.jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Smaablank-han-storhun-v-pho2012_K2E2855_copy.jpg)

Sito Wikimedia Commons, data di consultazione 10/07/2021:

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=1012293>

Sito Wikimedia Commons, data di consultazione 10/07/2021:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Smolt\\_salmo\\_salar\\_\(29119938758\).jpg](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Smolt_salmo_salar_(29119938758).jpg)

Sito Wikimedia Commons, data di consultazione 10/07/2021:

[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salmo\\_salar-Atlantic\\_Salmon-Atlanterhavsparken\\_Norway.JPG](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Salmo_salar-Atlantic_Salmon-Atlanterhavsparken_Norway.JPG)

## Appendice: protocollo di estrazione RNA

Per l'estrazione dell'RNA, è stato utilizzato il Invitrogen™ TRIzol™ Reagent, con il seguente protocollo:

- In un potter con pestello è stato inserito 1 ml di TRIzol™ a cui è stato aggiunto il campione tritato e si è proceduto ad un'ulteriore frammentazione meccanica;
- dopo 3 minuti, il contenuto è stato trasferito in una provetta da 2 ml;
- successivamente le provette contenenti il campione e il TRIzol™ sono state centrifugate a 12.000 x g per 10 minuti a 2-8°C;
- il surnatante è stato trasferito in una provetta da 1,5 ml e il pellet rimasto, contenente membrane cellulari, polisaccaridi, DNA ad alto peso molecolare, è stato scartato;
- fase di separazione: dopo 5 minuti a temperatura ambiente sono stati aggiunti 0,2 ml di cloroformio. Una volta chiuse attentamente le provette sono state agitate a mano vigorosamente per 15 volte, successivamente sono state mantenute 2-3 minuti a temperatura ambiente. I campioni sono stati centrifugati a 12.000 x g per 15 minuti a 2-8°C;
- dopo la centrifuga il contenuto si trovava diviso in tre parti: uno strato rosso fenolo-cloroformio inferiore, una interfase e una fase acquosa incolore superiore. L'RNA si trova esclusivamente nella fase superiore acquosa;
- è stata trasferita la fase acquosa contenente l'RNA in una nuova provetta da 1,5 ml, inclinando la provetta a 45° e pipettando la soluzione. È importante, in questa fase, prestare estrema attenzione a prelevare unicamente la fase acquosa evitando di prendere anche l'interfase o lo strato sottostante.
- Fase di precipitazione dell'RNA: alla fase acquosa è stato aggiunto 0,5 ml di isopropanolo. È stato tenuto a temperatura ambiente per 10 minuti e poi centrifugato a 12.000 x g per 10 minuti a 2-8°C;
- dopo la centrifuga l'RNA totale precipitato forma un pellet bianco simile a gel sul fondo della provetta. Il surnatante viene scartato.
- Lavaggio dell'RNA: il pellet di RNA è stato lavato in 1 ml di etanolo al 75%. È stato centrifugato a 7.500 x g per 5 minuti a 2-8°C.

- Risospensione dell'RNA: è stato rimosso l'etanolo e la provetta contenente l'RNA è stata lasciata 15 minuti aperta a temperatura ambiente per fare evaporare completamente l'etanolo;
- in seguito, sono stati aggiunti 20–50  $\mu$ l di acqua sterile e con il puntale è stato risospeso il pellet di RNA. È stato incubato a 55-60°C per 10 minuti;
- i campioni sono stati poi messi in cella a -80°C.