

Obiettivo 2

Selezione di linee di trota resilienti alla PKD e allo stress termico

Introduzione

Negli ultimi decenni si è osservato un progressivo aumento della temperatura dei corpi idrici, associato a una riduzione della disponibilità e del volume delle risorse idriche come conseguenza dei cambiamenti climatici. Tali alterazioni ambientali determinano condizioni di stress fisiologico nei pesci, compromettendone l'omeostasi e aumentando la suscettibilità alle infezioni da agenti patogeni (Barange *et al.*, 2018).

Le malattie infettive rappresentano, infatti, uno dei principali ostacoli per la rapida espansione dell'acquacoltura. Nonostante ciò, i notevoli sviluppi nello studio del genoma degli organismi acquatici hanno consentito di applicare tecnologie innovative a supporto di produzioni di acquacoltura sostenibili. In particolare, l'utilizzo di marcatori genetici a DNA, quali i Polimorfismi a Singolo Nucleotide (SNP), è sempre più diffuso per la selezione di soggetti portatori di tratti di grande interesse economico. Gli SNP possono essere utilizzati per studi di associazione (*Genome Wide Association Studies*, GWAS) e vengono usati per identificare le varianti genetiche associate al miglioramento di differenti tratti, tra cui caratteri produttivi e resistenza alle malattie.

L'obiettivo 2 del progetto RESILTROUT mira a identificare marcatori di DNA per la selezione genomica, al fine di affrontare alcune delle principali criticità della trotticoltura italiana quali la malattia proliferativa renale (PKD) e lo stress termico.

La PKD è stata riportata come altamente impattante sulle produzioni di salmonidi, sia in Europa, che in Nord America, con rilevanti implicazioni economiche sia per le popolazioni selvatiche sia per quelle allevate (Hedrick *et al.*, 1993). L'agente eziologico della PKD è *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). Questa patologia è considerata una delle più gravi malattie parassitarie in acquacoltura, con focolai stagionali che si verificano tipicamente tra la tarda primavera e l'inizio dell'autunno, in concomitanza con l'aumento della temperatura dell'acqua. In questo periodo, i briozoi invertebrati rilasciano spore che infettano i pesci attraverso le branchie o la cute. Successivamente, il parassita si distribuisce preferenzialmente in organi quali rene, milza e fegato, dove prolifera. La trota iridea rappresenta un ospite irregolare e a fondo cieco per *T. bryosalmonae* e solo occasionalmente sopravvive a infezioni gravi, con tassi di mortalità che possono raggiungere il 95% negli avannotti allevati in incubatoio. Attualmente non sono disponibili vaccini o terapie efficaci per il controllo della PKD.

Analogamente, lo stress termico conseguente all'aumento della temperatura delle acque rappresenta uno dei principali fattori limitanti per la sostenibilità delle produzioni d'acquacoltura. Gli effetti risultano particolarmente evidenti negli impianti alimentati da acque superficiali, maggiormente esposti alle variazioni climatiche stagionali e agli eventi estremi.

L'incremento della temperatura altera numerosi processi fisiologici dei pesci, tra cui il metabolismo energetico, la crescita, l'efficienza alimentare e la funzionalità immunitaria, determinando una riduzione delle performance produttive. Inoltre, condizioni termiche al di fuori dell'intervallo ottimale di specie favoriscono l'insorgenza di stati di stress cronico, con aumento dei tassi di mortalità e maggiore suscettibilità alle patologie infettive di origine batterica, virale e parassitaria. Parallelamente, temperature più elevate possono accelerare il ciclo biologico e la capacità di diffusione di numerosi patogeni acquatici, contribuendo a un incremento della frequenza e della severità degli episodi di malattia negli allevamenti ittici (Casarano *et al.*, 2021).

Metodologia analitica

Linee di trota presenti nell'Azienda Agricola Canali Cavour sono state ottenute con una riproduzione fattoriale completa derivante dall'incrocio di 32 maschi con 100 femmine come riportato in Tabella 1.

La progenie ottenuta è stata suddivisa in gruppi omogenei, costituiti ognuno da 1000 esemplari, e mantenuti, in accordo alla normale prassi di allevamento, in *raceway* con acqua naturalmente infetta da *Tetracapsuloides bryosalmonae* per un primo gruppo, ed esposta, a partire da Maggio 2024, alle naturali fluttuazioni termiche periodiche per il secondo gruppo al fine di ottenere due popolazioni sulle quali definire i fenotipi e condurre la genotipizzazione per l'applicazione di studi di GWAS.

5000 trote iridee provenienti dallo stesso incrocio sono invece state allevate per essere utilizzate quali riproduttori e sono state, a tal fine, identificate univocamente mediante trasponder intramuscolare e genotipizzate. Sono stati registrati tutti i parametri morfometrici ed effettuato il prelievo di materiale biologico per ciascun individuo.

Tabella 1. Incrocio fattoriale completo utilizzato per la riproduzione.

	Femmine						
Maschi	1	2	3	4	5	...	100
1	X	X	X	X	X	X	X
2	X	X	X	X	X	X	X
3	X	X	X	X	X	X	X
4	X	X	X	X	X	X	X
5	X	X	X	X	X	X	X
...	X	X	X	X	X	X	X
32	X	X	X	X	X	X	X

Per la PKD i casi sono stati campionati durante la primavera e l'estate del 2024 e definiti in base alla presenza di lesioni interne specifiche, in particolare ingrossamento del rene, splenomegalia, e mediante PCR end-point per la rilevazione di *T. bryosalmonae*, come descritto da Kent *et al.* (1998), amplificando un frammento di 435bp del gene SSU-rDNA. Considerato che la PKD induce una condizione di immunosoppressione generalizzata, è stata inoltre effettuata una classificazione del grado di infestazione al fine di supportare il ruolo di *T. bryosalmonae* come causa primaria di mortalità.

È stata quindi sviluppata una Digital droplet PCR (ddPCR) per la quantificazione assoluta del patogeno e per la definizione del fenotipo, utilizzando primer e sonde specifici già descritti per la real-time PCR da Carraro *et al.*, 2018.

Per tutti i casi è stato prelevato un campione di tessuto utilizzato quale matrice per l'estrazione del DNA. A tale scopo è stato utilizzato l'estrattore automatico KingFisher Flex.

Quali controlli sono invece stati considerati i soggetti sopravvissuti a seguito dei picchi termici stagionali e campionati durante la stagione invernale 2024 mediante tamponi buccali. Anche in tal caso il DNA è stato estratto mediante estrazione automatica.

Tuttavia, tutti i campioni positivi alla PCR end-point, anche in presenza di un basso livello di infestazione, e in assenza di principali patogeni batterici, sono stati inclusi nel GWAS come

casi. Per lo stress termico sono state genotipizzate un totale di 600 trote iridee delle 1000 monitorate, di cui 300 soggetti venuti a morte 300 sopravvissuti ai rialzi termici stagionali.

Genotipizzazione

La genotipizzazione è stata effettuata utilizzando array commerciali a media densità (contenenti 57.000 marcatori SNP) sviluppati per la trota iridea e processati seguendo le istruzioni del produttore e utilizzando lo strumento GeneTitan™ MC Fast Scan.

Studio GWAS

Il software Axass (Thermofisher) è stato utilizzato per il controllo di qualità dei dati analitici mentre il software PLINK v1.9 (Purcell *et al.*, 2007) è stato utilizzato sia per rimuovere SNP e individui con basso successo di genotipizzazione o SNP caratterizzati da una frequenza allelica rara. Lo stesso software è stato, inoltre utilizzato per analizzare la struttura della popolazione oggetto di studio.

Il software GCTA (Yang *et al.*, 2011) è stato invece utilizzato per lo studio di associazione applicando sia la correzione per test multipli di Bonferroni (Bonferroni, 1936) sia il *False Discovery Rate* (Benjamini and Hochberg, 1995),

Risultati

Su un totale di 990 campioni analizzati per PKD mediante PCR end-point, il 43% (n = 426) è risultato positivo per *T. bryosalmonae*. Tra questi, 368 campioni sono stati ulteriormente analizzati con ddPCR, consentendo la quantificazione del carico parassitario e la classificazione in cinque livelli di gravità dell'infestazione: molto basso (<10 copie/μL), basso (10–99 copie/μL), moderato (100–999 copie/μL), elevato (1.000–9.999 copie/μL) e molto elevato (>10.000 copie/μL). La maggior parte dei campioni positivi rientrava nelle categorie moderata ed elevata, rappresentando rispettivamente il 36% e il 29% del totale.

Per la PKD sono risultati significativi **due SNP (AX-89938039 e AX-89958371), entrambi ubicati sul cromosoma 8, in posizione 73.22Mbp e 38.44Mbp, rispettivamente.**

Nel caso dello **stress termico** sono risultati significativi due SNP: lo **SNP AX-89953412** presente sul cromosoma 16 in posizione 20.97 Mbp e lo **SNP AX-89954319** presente sul cromosoma 32 in posizione 14.13 Mbp.

La genotipizzazione è stata ottenuta per 4744 riproduttori su 5000 poichè alcuni, nel frattempo, sono venuti a morte o i genotipi erano mancanti. **Per la creazione di una progenie resiliente sono stati utilizzati 857 soggetti** sfruttando il modello fattoriale completo come precedentemente descritto (248 maschi e 609 femmine).

Conclusioni

L'utilizzo di studi GWAS non solo deve considerarsi uno strumento essenziale per il miglioramento genetico delle specie allevate, ma rappresenta anche un modello da utilizzare per ottenere produzioni di acquacoltura sostenibili.

La definizione del fenotipo rappresenta uno dei principali fattori di *bias* negli studi GWAS e una chiara e univoca classificazione dei casi è essenziale per evitare associazioni spurie e per la riproducibilità di studi condotti da gruppi differenti. Nel caso specifico, la conferma del fenotipo è stata effettuata mediante un approccio multidisciplinare che ha comportato: registrazione della sintomatologia e delle lesioni macroscopiche mediante sistemi tradizionali ed implementazione di metodiche basate sulla biologia molecolare.

I risultati ottenuti dallo studio GWAS possono essere impiegati per una selezione assistita da marcatori (MAS) basata sulla selezione di soggetti portatori di un numero limitato di marcatori associati alla resilienza. Vi sono però casi in cui ciascun marcatore spiega soltanto una piccola parte della variabilità fenotipica associata al tratto di interesse; in questi casi risulta maggiormente opportuno l'utilizzo di un approccio basato sulla selezione genomica (GS) che stima per ciascun riproduttore il valore genomico, che è la somma degli effetti di tutti marcatori testati.

Bibliografia di riferimento essenziale

- Barange, M., Bahri, T., Beveridge, M. C. M., Cochrane, K. L., Funge-Smith, S., & Poulain, F. (Eds.). (2018). *Impacts of climate change on fisheries and aquaculture: Synthesis of current knowledge, adaptation and mitigation options* (FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper No. 627). Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://doi.org/10.4060/i9705en>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B* (Methodological), 57(1), 289–300.
- Bonferroni, C. E. (1936). Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. R. Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali.
- Carraro, R., Dalla Rovere, G., Ferraresso, S., Carraro, L., Franch, R., Toffan, A., Pascoli, F., Patarnello, T., & Bargelloni, L. (2018). Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in fish tissues. *Journal of Fish Diseases*, 41(2), 247–254. <https://doi.org/10.1111/jfd.12703>
- Cascarano, M. C., Stavrakidis-Zachou, O., Mladineo, I., Thompson, K. D., Papandroulakis, N., & Katharios, P. (2021). Mediterranean aquaculture in a changing climate: Temperature effects on pathogens and diseases of three farmed fish species. *Pathogens*, 10(9), 1205. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091205>

- Hedrick, R. P., MacConnell, E., & de Kinkelin, P. (1993). Proliferative kidney disease of salmonid fish. *Annual Review of Fish Diseases*, 3, 277–290. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(93\)90039-E](https://doi.org/10.1016/0959-8030(93)90039-E)
- Kent, M. L., Khattra, J., Hervio, D. M. L., & Devlin, R. H. (1998). Ribosomal DNA sequence analysis of isolates of the PKX myxosporean and their relationship to members of the genus *Sphaerospora*. *Journal of Aquatic Animal Health*, 10, 12–21. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1998\)010<0012:RDSAOI>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1998)010<0012:RDSAOI>2.0.CO;2)
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P. I., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559–575. <https://doi.org/10.1086/51979>
- Yang, J., Lee, S. H., Goddard, M. E., & Visscher, P. M. (2011). GCTA: A tool for genome-wide complex trait analysis. *American Journal of Human Genetics*, 88(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.011>