

Obiettivo 5

Selezione di linee di trota resilienti alla lattococcosi

Introduzione

Negli ultimi decenni, i cambiamenti climatici hanno determinato un incremento progressivo della temperatura delle acque e una crescente riduzione della disponibilità delle risorse idriche, con conseguenti ripercussioni sugli ecosistemi acquatici e sulle attività di acquacoltura. Nella trota iridea, tali condizioni ambientali possono indurre importanti alterazioni fisiologiche, compromettendo i meccanismi di omeostasi e favorendo una maggiore vulnerabilità nei confronti degli agenti patogeni (Barange et al., 2018).

In questo contesto, le malattie infettive rappresentano una delle principali limitazioni allo sviluppo sostenibile e alla competitività dell'acquacoltura. I notevoli progressi compiuti negli ultimi anni nel campo della genomica hanno aperto nuove prospettive per il miglioramento genetico delle specie allevate, mettendo a disposizione strumenti innovativi per aumentare l'efficienza produttiva e la resilienza degli animali alle avversità ambientali e sanitarie.

Tra questi strumenti, assumono particolare rilevanza i marcatori genetici basati sul DNA, come i Polimorfismi a Singolo Nucleotide (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs), ampiamente impiegati nei programmi di selezione assistita. Gli SNP consentono di identificare varianti genetiche associate a caratteristiche di interesse zootecnico ed economico, tra cui crescita, efficienza alimentare, qualità del prodotto e resistenza alle malattie. Inoltre, essi costituiscono la base degli studi di associazione di tipo Genome-Wide (GWAS), approccio che permette di individuare regioni genomiche e geni coinvolti nell'espressione di specifici fenotipi, fornendo informazioni utili per l'implementazione di strategie di selezione genetica volte a migliorare la sostenibilità e la salute delle popolazioni allevate.

L'obiettivo 5 del progetto RESILTROUT mira a identificare marcatori di DNA per la selezione genomica, al fine di adottare un sistema complementare a quelli tradizionali ad oggi in uso, per la gestione della lattococcosi.

Tra le malattie infettive, la lattococcosi dei pesci, causata da *Lactococcus garvieae*, *Lactococcus petauri* e *Lactococcus formosensis* subsp. *formosensis*, rappresenta una patologia batterica riemergente di grande rilevanza per l'acquacoltura mondiale, in particolare nei periodi caratterizzati da temperature elevate dell'acqua (Soltani et al., 2021). La malattia è associata a elevati tassi di mortalità e a considerevoli perdite economiche per il settore. La sua gestione risulta particolarmente complessa a causa della limitata efficacia delle misure terapeutiche e profilattiche attualmente disponibili, inclusi trattamenti antibiotici e vaccini, soprattutto quando applicati in condizioni operative di campo. Per tali ragioni, la selezione genetica di soggetti maggiormente resistenti all'infezione rappresenta una strategia

promettente per il miglioramento della sostenibilità e della resilienza degli allevamenti di trota iridea.

Metodologia analitica

Linee di trota presenti nell'allevamento AACC sono state utilizzate per la riproduzione seguendo un modello fattoriale completo derivante dall'incrocio di 32 maschi con 100 femmine come riportato in tabella 1.

La progenie ottenuta, costituita da un gruppo di 1000, esemplari, è stata allevata in acque naturalmente infette da *Lactococcus garvieae*.

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

I pesci morti sono stati raccolti durante la primavera e l'estate del 2024 e del 2025, mentre i pesci sopravvissuti sono stati campionati nell'autunno del 2025.

A causa della bassa mortalità osservata durante il primo anno di studio e della necessità di preservare i riproduttori destinati alla riproduzione nel novembre 2025, il monitoraggio del focolaio è stato prolungato di un anno. Ciononostante, sono venuti a morte e campionati solo 233 soggetti. Per la genotipizzazione sono stati utilizzati 96 campioni risultati positivi per *Lactococcus garvieae* e 96 sopravvissuti.

I risultati ottenuti da una precedente analisi GWAS sulla lattococcosi condotta nell'ambito del progetto europeo SUPERTROUT (Improving Sustainability and Performance of Aquaculture Farming Systems: Breeding for Lactococcosis Resistance in Rainbow Trout; <https://www.izspltv.it/it/supert trout.html>) sono utilizzati in via preliminare, e validati nel set di dati generati nel presente studio. Tale analisi, è stata effettuata su 271 soggetti (152 casi e 119 controlli) e ha consentito l'identificazione di 10 marcatori genomici associati alla malattia. Questi marcatori sono stati valutati nella popolazione oggetto del presente studio al fine di verificarne l'applicabilità e la robustezza in un diverso contesto epidemiologico.

Il materiale biologico è stato prelevato sia da pesci morti sia da pesci sopravvissuti. L'estrazione del DNA genomico è stata effettuata utilizzando l'estrattore semi-automatico KingFisher™ Flex. La genotipizzazione è stata eseguita mediante un array commerciale a media densità di SNP specifico per la trota iridea, utilizzando lo strumento GeneTitan™ MC Fast Scan Instrument, secondo le istruzioni del produttore.

Tutte le trote iridee rinvenute morte durante il periodo di studio sono state sottoposte a un esame post-mortem completo, comprendente ispezione esterna, necropsia e campionamento batteriologico del rene anteriore e dell'occhio. I campioni sono stati inoculati in condizioni asettiche su Columbia Agar addizionato con il 5% di sangue ovino e su Tryptic Soy Agar (TSA) preparato internamente. Le piastre sono state incubate a 22 ± 2 °C per 72 ore e controllate quotidianamente per la valutazione della crescita batterica. Le colonie predominanti sono state successivamente ritrapiantate su CA e gli isolati puri identificati mediante spettrometria di massa MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-of-Flight Mass Spectrometry). La conferma molecolare è stata quindi effettuata mediante amplificazione della regione ITS (Internal Transcribed Spacer) compresa tra i geni dell'rRNA 16S e 23S, secondo il protocollo descritto da Stoppani et al. (2023), al fine di discriminare le tre specie di *Lactococcus* note come agenti eziologici della lattococcosi dei pesci.

I pesci sono stati classificati come affetti da lattococcosi quando ceppi di *Lactococcus* spp. sono stati isolati in coltura pura e successivamente confermati mediante PCR mirata alla regione ITS 16S–23S dell'rRNA.

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 non rispettanti l'equilibrio di Hardy-Weinberg o caratterizzati da una frequenza allelica rara, sia soggetti con una qualità della genotipizzazione scarsa. Lo stesso software è stato 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

Dei 233 soggetti esaminati, 103 sono risultati positivi a *Lactococcus garvieae* e presentanti segni clinici caratteristici (Figura 2). Il batterio è stato isolato in circa il 27% dei campioni di rene anteriore e nel 31% circa dei campioni di umor vitreo. Altre specie batteriche, tra cui *Hafnia alvei*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens*, *Lactococcus lactis* e *Acinetobacter* spp., sono state rilevate con frequenze inferiori. È stata inoltre identificata la presenza di *Lactococcus petauri* in campioni di umor vitreo, sebbene con una prevalenza molto bassa (0,5%).

Gli SNP identificati come significativamente associati al fenotipo oggetto di studio nel progetto SUPERTROUT sono riportati nella Tabella 2. L'analisi funzionale dei geni associati ha evidenziato funzionalità associate allo sviluppo neuronale, alla vista, alla risposta alle infezioni e alle malattie, e allo sviluppo piastrinico.

Table 2. Lista degli SNP significativi identificati nello studio GWAS condotto con SUPERTROUT.

CHR	SNP	BP	A1	p-value
2	AX-89926924	9484418	G	5,91E-08
2	AX-89923664	9903358	C	2,76E-07
6	AX-89931324	35261851	T	2,76E-07
7	AX-89921634	30639676	G	5,91E-08
7	AX-89932857	26309860	C	2,76E-07
7	AX-89958655	29816173	A	3,89E-07
7	AX-89975544	69198029	T	1,05E-06
11	AX-89946324	23520466	A	8,27E-07
15	AX-89944847	13040691	T	1,69E-07
27	AX-89968747	26659801	C	1,69E-07

Dei 96 campioni positivi analizzati in RESILTROUT, 79 hanno passato i controlli di qualità e sono stati mantenuti nello studio.

Dopo le procedure di pulizia, sia dei marcatori che dei genotipi, sono stati mantenuti 113 campioni (57 positivi e 56 negativi) e 29331 marcatori.

Per prima cosa, gli SNP identificati nel progetto SUPERTROUT sono stati testati nel dataset di RESILTROUT per valutare la segregazione e associazione con la malattia anche in questa popolazione indipendente.

Dei 37 marcatori identificati con le analisi GWAS e FST, 29 sono stati analizzati in questo dataset e nessuno è risultato significativamente associato alla malattia.

Il dataset totale è stato poi analizzato usando il software GCTA ma nessun marcatore è risultato significativamente associato alla malattia.



Figura 2. Lesioni macroscopiche caratteristiche della lattococcosi.

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.

L'analisi GWAS non ha identificato regioni significativamente associate alla malattia. Una possibile causa è l'uso di un basso numero di soggetti nell'analisi, dovuta sia alla ridotta mortalità, sia all'eliminazione dallo studio dei campioni venuti a morte ma da cui non è stato re-isolato il patogeno specifico.

I marcatori identificati nel precedente progetto non sono stati confermati in questa popolazione, probabilmente perché la popolazione qui analizzata ha caratteristiche diverse rispetto alla popolazione usata nella fase di scoperta.

Ulteriori studi dovranno essere fatti per identificare varianti associate alla resistenza e resilienza alla lattococcosi nella popolazione italiana, e poterle poi impiegare per una selezione assistita da marcatori (MAS), se abbiamo un numero limitato di marcatori associati,

o un approccio basato sulla selezione genomica (GS), se vi sono molti marcatori che spiegano soltanto una piccola parte della variabilità fenotipica associata al tratto di interesse.

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.
- 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>
- Soltani, M., Baldisserotto, B., Hosseini Shekarabi, S. P., Shafiei, S., & Bashiri, M. (2021). Lactococcosis, a re-emerging disease in aquaculture: Disease significance and phytotherapy. *Veterinary Sciences*, 8(9), 181. <https://doi.org/10.3390/vetsci8090181>
- Stoppani, N., Colussi, S., Pastorino, P., Prearo, M., Sciuto, S., Altinok, I., Öztürk, R. Ç., Ture, M., Vela, A. I., Blanco, M. D. M., Kotzamanidis, C., Bitchava, K., Malousi, A., Fariano, L., Volpatti, D., Acutis, P. L., & Fernández-Garayzábal, J. F. (2023). 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region (ITS) sequencing: A potential molecular diagnostic tool for differentiating *Lactococcus garvieae* and *Lactococcus petauri*. *Microorganisms*, 11, 1320. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11051320>
- 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>