



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

Sede amministrativa: Università degli Studi di Padova

**DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA, PATOLOGIA  
COMPARATA E IGIENE VETERINARIA**

**SCUOLA DI DOTTORATO IN SCIENZE VETERINARIE  
INDIRIZZO DI SANITÀ PUBBLICA E PATOLOGIA COMPARATA**

Ciclo XXIII

**IDENTIFICAZIONE DI  
MARCATORI MOLECOLARI  
PER LA RESISTENZA ALLA FOTOBATTERIOSI  
NELL'ORATA DI ALLEVAMENTO  
(*SPARUS AURATA*)**

**Direttore della scuola:** Ch.mo Prof. Massimo MORGANTE

**Coordinatore di indirizzo:** Ch.mo Prof. Mauro DACASTO

**Supervisore:** Prof. Luca BARGELLONI

**Dottoranda:** Caterina PELLIZZARI

31 GENNAIO 2011



*Ai miei genitori,  
Emanuela e Rinaldo*



## Riassunto

La fotobatteriosi ittica, causata dal batterio Gram negativo *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*), è una patologia infettiva che colpisce diverse specie di pesci che vivono in acque marine temperate. La fotobatteriosi rappresenta un reale problema sanitario per gran parte degli allevamenti intensivi di orata (*Sparus aurata*), con tassi di mortalità che possono raggiungere il 90-100%; gli stadi larvali e giovanili sono i più suscettibili all'infezione. Una possibile strategia per prevenire la patologia prevede la selezione di animali geneticamente resistenti a essa. La resistenza alla fotobatteriosi presenta un'ereditabilità medio bassa (0.12-0.45) e la sua stima risulta dispendiosa, di conseguenza, la strategia migliore per l'attuazione di programmi di miglioramento genetico per questo tratto è la selezione assistita da marcatori. Scopo di questo progetto è l'identificazione di loci genetici coinvolti nella determinazione della resistenza all'infezione in orata, mediante un approccio genomico integrato. Un'analisi di QTL per la resistenza alla fotobatteriosi è stata effettuata considerando una popolazione di 500 individui, generati da 8 maschi e 5 femmine, infettati sperimentalmente con *Phdp* e genotipizzati utilizzando 151 loci microsatelliti. I dati ottenuti sono stati elaborati attraverso un'analisi di regressione *half-sib* per due caratteri con distribuzione continua, la lunghezza al momento del decesso e la sopravvivenza, e per due caratteri binari, la sopravvivenza al giorno 7 e al giorno 15, associati ai maggiori picchi di mortalità. Per la resistenza alla fotobatteriosi sono stati identificati due QTL significativi. Il primo, coinvolto nella sopravvivenza al giorno 15, è stato associato al LG3. Il secondo, per la sopravvivenza al termine del *challenge*, è stato collocato nel LG21, per cui è stato possibile anche identificare un potenziale marcatore (Id13) associato alla resistenza alla patologia. Per la lunghezza al momento del decesso è stato individuato un QTL significativo nel LG6, in grado di spiegare il 5-8% della varianza fenotipica. La tecnologia *microarray* è stata impiegata per analizzare i cambiamenti a livello trascrizionale nel rene cefalico di orate sottoposte a un'infezione sperimentale con *Phdp*. La piattaforma *microarray* a oligonucleotidi, sviluppata da Ferraresso e colleghi (2008), è stata aggiornata aggiungendo 6412 nuovi trascritti unici. Le analisi statistiche dei dati di espressione hanno identificato 293 trascritti significativamente sovraespressi e 123 trascritti significativamente sottoespressi, associati a una risposta all'infezione che coinvolge principalmente i più immediati meccanismi del sistema immunitario innato. È stata rilevata, inoltre, una significativa predominanza di molecole antinfiammatorie che aiutano a controllare gli eccessivi danni collaterali ai tessuti dovuti alla risposta dell'ospite, ma così facendo, porterebbero anche a una riduzione dell'efficacia dei meccanismi immunitari responsabili dell'eliminazione del patogeno. I saggi di espressione in *Real time* RT-PCR hanno confermato i risultati di *microarray*. I geni differenzialmente espressi sono stati localizzati nel genoma di *Gasterosteus aculeatus*, per trovare una possibile co-localizzazione dei loci che contribuiscono alla resistenza all'infezione o alla suscettibilità. Questi geni, che apparentemente si collocano nelle stesse regioni dei QTL significativi, rappresentano un punto di partenza per raffinare la localizzazione dei QTL qui identificati e potrebbero rappresentare dei potenziali marcatori per la selezione di linee di animali maggiormente resistenti alla fotobatteriosi



## Summary

Fish photobacteriosis is an infectious disease that affects several fish species living in marine temperate waters. Its causative agent is the Gram-negative bacterium *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (*Phdp*). Fish photobacteriosis represents a serious health problem for the majority of intensive sea bream hatcheries, with 90–100% mortality during disease outbreaks. Larvae and juveniles are the most susceptible stages. A potential strategy to prevent fish photobacteriosis is to select for animals that are genetically resistant to it. Resistance to *Phdp* infection has low medium heritability (0.12-0.45) and it is costly to measure, thus the best option for selective breeding is marked assisted selection. Aim of this work is to identify genetic loci involved in disease resistance in the gilthead sea bream (*Sparus aurata*) through an integrated genomic approach.

A QTL analysis for resistance to photobacteriosis was carried out on an experimental population of 500 offspring, originating from eight sires and six dams in a single mass-spawning event and experimentally infected with *Phdp*. A total of 151 microsatellite loci were genotyped in the experimental population, and half-sib regression QTL analysis was carried out on two continuous traits, body length at time of death and survival, and for two binary traits, survival at day 7 and survival at day 15, when the highest peaks of mortality were observed. Two significant QTLs were detected for disease resistance. The first one was located on linkage group LG3 affecting late survival (survival at day 15). The second one, for overall survival, was located on LG21, which allowed us to highlight a potential marker (Id13) linked to disease resistance. A significant QTL was also found for body length at death on LG6 explaining 5-8% of the phenotypic variation.

Microarray-based experiments were used to analyse changes at the transcriptome level upon *Phdp* experimental infection in sea bream juvenile head kidney. An update of the oligo-DNA microarray developed by Ferraresso et al. (2008) was produced by adding 6,412 novel unique transcripts. Statistical analysis identified 293 transcripts significantly up-regulated and 123 transcripts down-regulated leading to an infection response mainly associated to the more immediate innate immune system. It was observed, however, a significant predominance of anti-inflammatory mediators/signals, which help controlling excessive collateral damage to host tissue and cells due to host response, but, in so doing, might also reduce the effectiveness of immune mechanisms responsible for the clearance of the pathogen. Independent testing of a selection of differentially expressed genes with real-time RT-PCR confirmed microarray results.

Differentially expressed genes based on microarray analysis were mapped onto the stickleback genome, to find a possible co-localization of the loci contributing to disease resistance or susceptibility. These genes, which putatively co-localize with genome-wide significant QTLs, represent a starting point to refine the candidate regions for the already identified QTLs and might constitute potential markers for the implementation of selective breeding programs for photobacteriosis resistance.



## **PUBBLICAZIONI RELATIVE AL PROGETTO DI RICERCA**

Antonello J, Massault C, Franch R, Haley C, Pellizzari C, Bovo G, Patarnello T, de Koning DJ, Bargelloni L. **Estimates of heritability and genetic correlation for body length and resistance to fish pasteurellosis in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.)**. *Aquaculture* 2009, **298**(1-2): 29-35.

Massault C, Franch R, Haley C, de Koning DJ, Bovenhuis H, Pellizzari C, Patarnello T, Bargelloni L. **Quantitative trait loci for resistance to fish pasteurellosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*)**. *Animal Genetics* 2010, doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02110.x



## **INDICE**

<b>1. INTRODUZIONE GENERALE</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Sparus aurata</i> (Linnaeus, 1758)	3
1.2 La fotobatteriosi ittica	6
1.2.1 Cenni storici	6
1.2.2 Caratteristiche di <i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>Piscicida</i> e trasmissione	7
1.2.3 Meccanismi di virulenza	8
1.2.4 Trattamento e prevenzione	10
1.3 Miglioramento genetico in acquacoltura	11
1.3.1 La variabilità genetica	14
1.3.2 La selezione assistita da marcatori	16
1.3.2.1 <i>I marcatori microsatelliti</i>	17
1.3.3 Le mappe genomiche	19
1.3.3.1 <i>Mappe fisiche</i>	19
1.3.3.2 <i>Mappe di linkage</i>	20
1.4 La genomica funzionale e il suo contributo all'acquacoltura	21
1.4.1 Approcci high-throughput: DNA <i>microarray</i>	22
1.4.2 Studio dei geni significativi per la risposta alle patologie	24
1.5 Scopo del lavoro	26

**2. IDENTIFICAZIONE DI LOCI GENETICI ASSOCIATI  
ALLA RESISTENZA ALLA FOTOBATTERIOSI ITTICA  
IN ORATA**

	29
2.1 Introduzione	31
2.2 Materiali e metodi	33
2.2.1 La popolazione sperimentale	33
2.2.2 Misurazione dei fenotipi	34
2.2.3 Progettazione dell'analisi di QTL	34
2.2.4 La mappa genetica	35
2.2.5 Mappaggio di QTL	36
2.3 Risultati e discussione	38
2.3.1 La mappa genetica	38
2.3.2 Crescita e mortalità	40
2.3.3 QTL per la resistenza alla fotobatteriosi	41
2.3.3.1 <i>Il marcatore Id13</i>	44
2.3.4 QTL per la crescita	46
2.3.5 QTL per la resistenza alle patologie in acquacoltura	46
2.3.6 MAS e selezione genomica	48

<b>3. PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA DELLA RISPOSTA</b>	
<b>ALLA FOTOBATTERIOSI ITTICA IN ORATA</b>	49
3.1 Introduzione	51
3.1.1 La tecnologia Agilent	52
3.2 Materiali e metodi	53
3.2.1 Infezione sperimentale, campioni biologici ed estrazione dell'RNA	53
3.2.2 Progettazione del <i>microarray</i> e annotazione funzionale	54
3.2.3 Esperimenti di <i>microarray</i>	56
3.2.4 Acquisizione ed analisi dei dati sperimentali	57
3.2.5 Validazione dei dati di espressione mediante <i>Real-time</i> RT-PCR	58
3.2.6 Mappatura dei geni differenzialmente espressi in <i>Gasterosteus aculeatus</i>	59
3.3 Risultati e discussione	60
3.3.1 Esito dell'infezione sperimentale	60
3.3.2 Sviluppo del <i>microarray</i>	60
3.3.3 Analisi dei dati di espressione genica	61
3.3.4 Validazione mediante <i>Real-time</i> RT-PCR	72
3.3.5 Confronto tra geni differenzialmente espressi e genoma di <i>Gasterosteus aculeatus</i>	74
<b>4. CONCLUSIONI GENERALI</b>	75
<b><i>Bibliografia</i></b>	79
<b><i>Appendici</i></b>	99



# **1. INTRODUZIONE GENERALE**



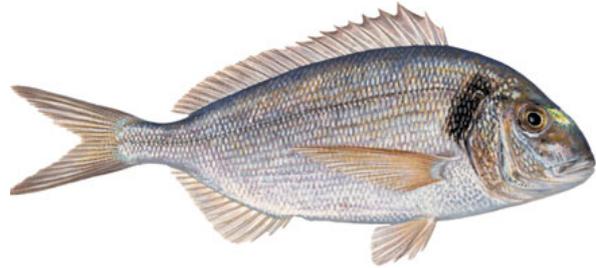
## 1.1 *Sparus aurata* (Linnaeus, 1758)

Classe: Actinopterygii

Ordine: Perciformes

Famiglia: Sparidae

Denominazione in lingua italiana: Orata



L'orata, *Sparus aurata* (Linnaeus 1758), è un teleosteo marino della famiglia *Sparidae* che comprende più di 100 specie. Gli Sparidi sono ampiamente diffusi in acque temperate e tropicali, con un massimo di diversità di specie nelle regioni del Nord-Est Atlantico e del Mediterraneo, e rappresentano un elemento chiave nell'ecosistema costiero marino. Molte delle specie della famiglia degli sparidi rivestono un ruolo di rilievo nell'ambito dell'economia della pesca e dell'acquacoltura, visto l'elevato valore commerciale conferito dalle pregiate qualità alimentari largamente riconosciute.

Diffusa nel Mediterraneo e nell'Atlantico orientale, dalla Gran Bretagna al Senegal, è possibile trovare questa specie anche presso l'isola di Capo Verde e raramente nel Mar Nero. E' una specie eurialina, che quindi tollera variazioni anche notevoli del grado di salinità pur non adattandosi ad ambienti acquatici del tutto dolci. Resiste a temperature che possono raggiungere anche i 32-33°C, mentre risente fortemente del freddo non sopravvivendo a temperature inferiori ai 5°C (Ravagnan, 1992).

Come gli altri sparidi, l'orata ha un corpo alto, ovale e massiccio, compresso lateralmente e rivestito di spesse scaglie. La mascella superiore è lievemente più lunga di quella inferiore, le labbra sono carnose ed evidenti; nella parte anteriore di ciascuna mascella ha da quattro a sei canini molto robusti, seguiti da quattro o cinque file di denti molariformi nella mascella superiore e da tre o quattro file in quella inferiore (Pepitone *et al.*, 1995).

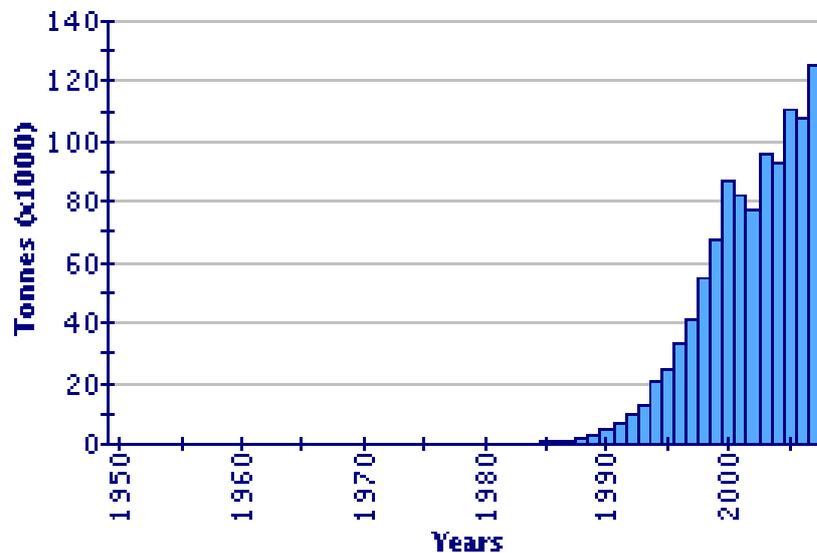
La pinna caudale è biloba. La colorazione è grigia con riflessi azzurro dorati sul dorso, cinque strie verticali nere e quattro grigie sui fianchi. La lunghezza media è di circa 30-35 cm, con un massimo di 70 cm. Il suo peso si aggira sui 10 kg circa, tuttavia la taglia commerciale ottimale è attorno ai 350-400 g. Si nutre principalmente di molluschi. L'orata è moderatamente gregaria, vive lungo la fascia costiera, in prevalenza su fondali sia sabbiosi sia rocciosi, generalmente ad una profondità di 1-2 m sino a 30-40 m.

Durante il periodo primaverile ed estivo compie frequenti migrazioni trofiche in ambienti lagunari ed estuarini, dove, in autunno, in corrispondenza del periodo riproduttivo, viene catturata durante la risalita a mare (Crosetti *et al.*, 2001). La riproduzione avviene in autunno, in condizioni di cattività la deposizione delle uova avviene generalmente a intervalli di 24 ore per un periodo di tre mesi (generalmente da ottobre a dicembre).

L'orata è una specie ermafrodita proterandrica; sviluppa prima gli elementi maschili, poi, entro il secondo anno di età, quelli femminili. La maturità sessuale viene raggiunta nei maschi all'età di 1-2 anni (20-30 cm) e nelle femmine a 2-3 anni (33-40cm). Il percorso di inversione da maschio a femmina tuttavia non è del tutto chiaro, l'evoluzione di ciascun esemplare non è facile da predire e sembra che non tutti i maschi di orata siano soggetti allo stesso modo al fenomeno dell'inversione sessuale (in alcuni sembra assente). I meccanismi che sottendono questo fenomeno sono tuttora ignoti anche se è probabile questo avvenga in relazione a fattori genetici, ambientali e sociali (Meiri *et al.*, 2002) che possono essere sfruttati per ottimizzare il rapporto maschi/femmine dei riproduttori in acquacoltura.

L'orata è la specie che viene più comunemente allevata nell'area Mediterranea. La pratica dell'acquacoltura si è affermata nei primi anni '80, vedendo un aumento della produzione in Europa pressoché costante, che ha raggiunto una media di 80-100

tonnellate l'anno (Figura 1.1). Il principale Paese europeo produttore è la Grecia, che controlla più dell'80% della produzione.



**Figura 1.1** Produzione globale di orata da allevamento (FAO, 2006)

Nonostante il notevole sviluppo registrato dalle pratiche di allevamento, diverse sono le limitazioni che ancora permangono. Tra queste rientrano l'elevata mortalità larvale, la presenza di malformazioni scheletriche, la suscettibilità alle infezioni e alle condizioni di stress e la lentezza nell'accrescimento. L'aumento della conoscenza dei meccanismi molecolari responsabili di caratteristiche fenotipiche di forte interesse economico e qualitativo, attraverso un approccio genomico, offre la prospettiva di rivoluzionare e rendere più efficiente questo settore.

## **1.2 La fotobatteriosi ittica**

La fotobatteriosi ittica, descritta anche come pasteurellosi, è una patologia infettiva sostenuta dal batterio *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* (*Phdp*). L'infezione colpisce varie specie di telesotei che vivono nei mari temperati e ha procurato gravi perdite in allevamenti di specie ittiche, soprattutto in Giappone e nell'area Mediterranea (Toranzo *et al.*, 2005). La fotobatteriosi rappresenta un problema sanitario rilevante per l'allevamento intensivo di orata, causando una mortalità che può arrivare al 90-100% dei pesci infetti, con gravi perdite economiche per gli allevatori (Hawke *et al.*, 2003). Lo sviluppo di strategie mirate alla prevenzione della patologia risulta quindi essere di particolare interesse.

### **1.2.1 Cenni storici**

Il primo episodio della malattia è stato registrato nel 1963, in una popolazione di pesce persico-spigola americano (*Morone americanus*) e di persico-spigola (*Morone saxatilis*) colpiti da un'epizoozia nella baia di Chesapeake in USA (Snieszko *et al.*, 1964).

Sulla base di alcune reazioni biochimiche, delle proprietà fisiologiche e di una netta colorazione bipolare del ceppo isolato, il batterio responsabile di tale episodio è stato inizialmente classificato nel genere *Pasteurella* spp. Successivamente, alcuni campioni isolati da Snieszko sono stati sottoposti ad ulteriori indagini da Janssen e Surgalla (1968) che hanno confermato l'appartenenza del batterio al genere *Pasteurella* spp., identificandolo come specie *Pasteurella piscicida*. In seguito, altri fenomeni epidemici si sono verificati negli Stati Uniti, coinvolgendo nuove specie ittiche, tra cui il cefalo (*Mugil cephalus*; Lewis *et al.*, 1970). Nel 1968 la patologia è stata descritta per la prima volta in Giappone e nel 1969 è stata considerata responsabile di gravi morie in allevamenti di ricciola (*Seriola quinqueradiata*; Kubota *et al.*, 1970). A partire dagli anni '90, sono stati registrati eventi di pasteurellosi ittica anche in Europa. Nel 1990 si è verificata la prima epizoozia causata da *P. piscicida* nell'orata in Spagna (Toranzo *et*

*al.*, 1991) e nello stesso periodo la patologia è apparsa anche in Italia (Ceschia *et al.*, 1991) con danni ad allevamenti di branzino (*Dicentrarchus labrax*) e orata. Manifestazioni di altre epidemie sono state registrate anche in Grecia (Bakopoulos *et al.*, 1995), Portogallo (Baptista *et al.*, 1996), Turchia (Candan *et al.*, 1996), Malta (Bakopoulos *et al.*, 1997) e Israele (Noga, 1996). Altri casi di infezione da pasteurella o da microrganismi pasteurella-simili sono stati descritti per specie anadrome o d'acqua dolce quali: lo snakehead (*Channa maculata*) in Giappone (Tung *et al.*, 1985); il siluro (*Silurus glanis*) e la carpa comune (*Cyprinus carpio*) in Ungheria (Farkas *et al.*, 1981); la trota comune (*Salmo trutta*) e il salmone atlantico (*Salmo salar*) in Norvegia (Hastein *et al.*, 1981) e Gran Bretagna (Jones *et al.*, 1999).

La posizione tassonomica di *Pasteurella piscicida* è stata ulteriormente indagata da Gauthier e colleghi nel 2005. Analisi filogenetiche di sequenze della piccola subunità ribosomale, analisi di ibridazione DNA-DNA e di caratterizzazione biochimica hanno evidenziato una stretta vicinanza con la specie *Photobacterium damsela*. *Pasteurella piscicida* è stata quindi riassegnata al genere *Photocaterium* con il nome *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*.

### **1.2.2 Caratteristiche di *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* e trasmissione**

*Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida* è un batterio Gram negativo, alofilo, corto e robusto (0.5-1.3 x 0.7- 4.0µm), non-mobile, asporigeno. Il suo sviluppo viene inibito da concentrazioni di sale superiori al 5% e la temperatura di crescita ottimale è compresa tra 22,5°C e 30°C, nonostante cresca anche tra 15°C e 32,5°C. Le sue caratteristiche favoriscono l'insorgenza di gravi epizootie nelle stagioni calde, quando la temperatura dell'acqua raggiunge i 22-25°C, o quando la salinità si riduce al di sotto del 25-30‰ in seguito a lunghi periodi di pioggia (Magariños *et al.*, 1996a). Condizioni favorevoli ed aggravanti l'infezione sono inoltre l'elevata densità di popolazione, una bassa

concentrazione di ossigeno disciolto nell'acqua, un elevato grado di inquinamento e la concomitante presenza di patogeni opportunisti.

Relativamente alla diffusione ambientale dell'agente eziologico, è stata dimostrata la capacità di *Phdp* di entrare in uno stato quiescente nell'ambiente marino: in coltura il patogeno quiescente è in grado di riattivarsi rapidamente in seguito ad un arricchimento nutritivo del mezzo, mantenendo le medesime caratteristiche biochimiche, fisiologiche e sierologiche. Tale proprietà riveste un ruolo significativo nella comparsa di epidemie di pasteurellosi in popolazioni ittiche apparentemente mai venute a contatto con il patogeno (Magariños *et al.*, 1994a). Studi condotti da Hawke (1994) e Magariños e colleghi (1995) hanno confermato l'ambiente acquatico come uno dei mezzi di trasmissione di *Phdp*. In questi lavori, l'insorgenza della patologia è stata provocata sperimentalmente in ibridi di persico-spigola, in orata e nel rombo chiodato (*Schophthalmus maximus*) tramite immersione. La via di trasmissione più probabile sembra essere da pesce a pesce, attraverso le branchie. E' ritenuto possibile anche il contagio per via orale, attraverso l'alimento (Kawahara *et al.*, 1997). *Phdp* è in grado di resistere all'azione battericida del muco presente nella cute del pesce e di aderire ad esso, ciò ha portato a ipotizzare che il microrganismo patogeno utilizzi come porta d'ingresso la cute intatta dell'ospite sviluppandosi come patologia setticemica (Fouz *et al.*, 2000).

### **1.2.3 Meccanismi di virulenza**

La fotobatteriosi presenta manifestazioni sia acute che croniche. La forma acuta colpisce soprattutto soggetti molto giovani (tra 1 e 40 gr di peso corporeo) e determina in genere una mortalità molto elevata (80-90%). I pesci presentano nuoto atassico, letargia, non reagiscono alla presenza dell'uomo e manifestano evidenti segni di anoressia. A livello dei visceri, prevalentemente su fegato, milza e rene, si possono evidenziare lesioni necrotizzanti, emorragie e aggregati batterici liberi o all'interno dei

fagociti, nei capillari e negli spazi interstiziali. L'epitelio branchiale presenta aree di necrosi e discrinia, causa di insufficienza respiratoria. La forma cronica colpisce più frequentemente soggetti adulti, con mortalità del 30%. Si possono osservare caratteristici noduli biancastri o tubercoli, localizzati in reni, milza e, con dimensioni minori, anche a livello epatico (Magariños *et al.*, 1996a).

La considerovole patogenicità di *Phdp* è da ricondurre a diversi meccanismi a elevata virulenza. Le capacità di adesione e invasione sono essenziali nelle prime fasi dell'infezione (Romalde *et al.*, 2002). Nonostante il patogeno mostri una moderata capacità di legame alle linee cellulari di pesce, è in grado di aderire efficacemente all'intestino di orata (Magariños *et al.*, 1996b). La presenza di una capsula di materiale polisaccaridico non influisce sull'esposizione delle strutture di adesione batteriche ai recettori cellulari, ma conferisce resistenza all'azione battericida del siero, incrementando la letalità per l'ospite (Magariños *et al.*, 1996c).

La scarsa invasività osservata è compensata dalla capacità di sopravvivere per almeno 5 giorni in cellule sia fagocitiche che no (Noya *et al.*, 1995a; Acosta *et al.*, 2009). Relativamente all'attività battericida delle cellule fagocitiche e, di conseguenza, all'abilità di controllare l'infezione, sono state osservate in orata differenze sulla base della dimensione degli animali. Gli stadi giovanili risultano essere altamente suscettibili all'infezione, mentre gli animali con peso superiore ai 50 gr sono relativamente più resistenti (Noya *et al.*, 1995b). La sopravvivenza intracellulare di *Phdp* fornisce un'efficace protezione alle risposte dell'ospite, specifiche o no e agli agenti antimicrobici esogeni (es. antibiotici). Inoltre, i microrganismi intracellulari danneggiano le cellule infette, con successiva liberazione dei batteri nel terreno di coltura e invasione delle cellule adiacenti.

Un fattore di virulenza fondamentale per *Phdp* è il sistema di sottrazione del ferro mediato da un sideroporo ad elevata affinità. La capacità di acquisire ferro dall'emina e

dell'emoglobulina è essenziale per la crescita del patogeno all'interno dell'ospite e quindi fondamentale per lo sviluppo dell'infezione. Il ferro esercita inoltre una funzione di regolazione nella sintesi di alcuni enzimi proteolitici come le gelatinasi e le caseinasi (Magariños *et al.*, 1994b).

Altri fattori di virulenza che esercitano un ruolo importante nella patogenesi della fotobatteriosi sono i prodotti extracellulari a elevata attività fosfolipasica, citotossica ed emolitica (Magariños *et al.*, 1992). È stata inoltre rilevata l'esistenza di una proteina con attività apoptotica codificata da un plasmide, avente come bersaglio neutrofilo e macrofagi intraperitoneali, che conduce alla necrosi secondaria (Costa-Ramos *et al.*, 2011; do Vale *et al.*, 2005; do Vale *et al.*, 2003).

#### **1.2.4 Trattamento e prevenzione**

L'impiego di adeguate tecniche di allevamento, idonee condizioni igienico-sanitarie e ridotti livelli di stress, sembrano avere un importante ruolo nella prevenzione della pasteurellosi, anche se non risolutivo (Toranzo *et al.*, 1991).

I primi studi sulla sensibilità in vitro di *Phdp* agli agenti chemoterapici sono stati effettuati da ricercatori giapponesi negli anni '70 e hanno evidenziato la sensibilità del microorganismo a penicillina, cloramfenicolo, tetraciclina e colistina. In studi successivi tutti i ceppi testati sono risultati sensibili a novobiocina, ampicillina, acido ossolinico, nitrofurantoina e rimetropin-sulfametossazolo, mentre sono risultati resistenti a streptomycin, eritromicina e canamicina (Magariños *et al.*, 1996a). È comunque necessario tenere presente che la somministrazione di farmaci protratta oltre un certo periodo di tempo porta allo sviluppo di fenomeni di farmaco-resistenza (Aoki, 1988). L'utilizzo di antibiotici andrebbe inoltre limitato per l'impatto negativo che eventuali residui possono avere sul consumatore.

Una strategia di tipo preventivo è l'immunoprofilassi. I risultati di test di vaccinazione su popolazioni di orata durante i primi stadi di sviluppo provano che l'immunoprofilassi

è efficace nel prevenire l'infezione (Hanif *et al.*, 2005; Magariños *et al.*, 1994c; Magariños *et al.*, 1999). La vaccinazione rappresenta però un costo aggiuntivo per l'allevatore, garantisce una protezione temporanea, vista la bassa competenza immunologica degli stadi giovanili e può inoltre avere delle conseguenze negative per gli organi linfoidei immaturi degli stadi larvali, come l'immunosoppressione.

Una strategia preventiva, complementare e alternativa, è la selezione di pesci geneticamente resistenti alla patologia. Questo tipo di selezione ha due vantaggi rispetto all'immunoprofilassi: i pesci resistenti hanno probabilità bassa o nulla di sviluppare la malattia; la presenza di una uniforme e limitata proporzione di pesci resistenti riduce l'opportunità di trasmissione della patologia, diminuendo il rischio di infezione per gli individui suscettibili al batterio (Antonello *et al.*, 2009).

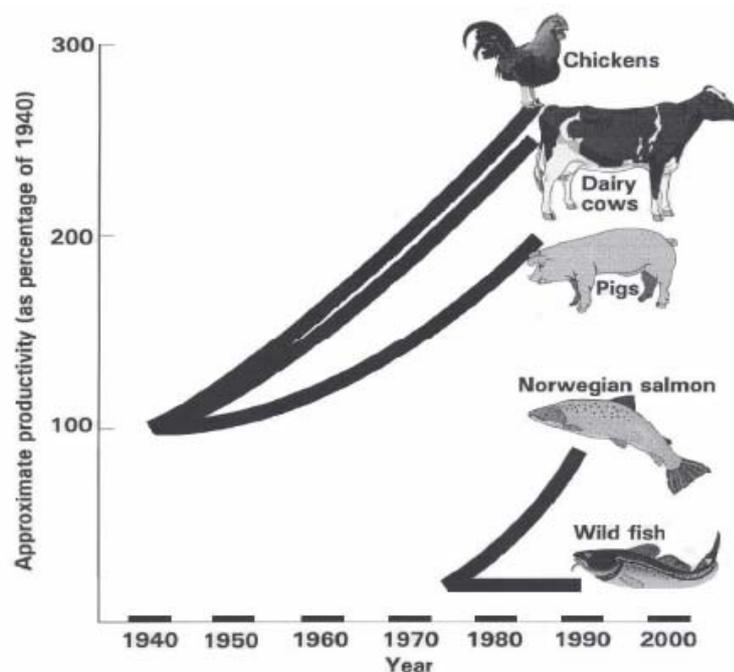
### **1.3 Miglioramento genetico in acquacoltura**

Il contributo dell'acquacoltura alle forniture mondiali di pesce, crostacei, molluschi e altri animali acquatici ha subito un incremento costante, aumentando dal 3,9% della produzione totale nel 1970 fino al 27,1% nel 2000 e al 32,4% nel 2004 (45,5 milioni di tonnellate). Una proiezione per l'anno 2030 ha stimato un contributo quasi raddoppiato per i prodotti derivati dall'acquacoltura (83 milioni di tonnellate) a fronte di una produzione costante per il comparto della pesca (93 milioni di tonnellate) (FAO, 2006).

Nonostante l'enorme sviluppo del settore, molte delle attività di allevamento hanno mantenuto una gestione scarsamente tecnologica e le conoscenze relative alle tecniche di riproduzione e selezione non sono sfruttate pienamente. Solamente negli ultimi anni vi è stato un aumento nell'applicazione delle tecnologie di allevamento e l'importanza economica del miglioramento genetico per questo comparto è stata riconosciuta (Gjedrem, 2005).

Friars (1998) ha affermato che l'esperienza maturata in numerosi anni di applicazione delle tecniche di riproduzione per gli animali terrestri, può rappresentare un'enorme opportunità per il settore dell'allevamento ittico. I progressi nelle popolazioni allevate, attraverso l'accoppiamento controllato e la selezione, sono stati accumulati utilizzando la variabilità naturale. Le prime stime dei parametri genetici e i progressi nella selezione indicano che simili risultati possono essere ottenuti anche in acquacoltura (Gjedrem, 2005).

Lo sviluppo del miglioramento genetico per gli animali allevati ha visto una ripresa dopo la seconda guerra mondiale, quando la conoscenza e le tecnologie disponibili sono aumentate; l'allevamento ittico non è stato in grado di sfruttare tali vantaggi durante questo periodo, essendo l'industria ai suoi albori (Gjedrem, 1997). In Figura 1.2 è possibile osservare l'aumento della produttività delle pratiche di allevamento nel corso degli ultimi anni.



**Figura 1.2** Aumento della produttività delle pratiche di allevamento dopo la seconda guerra mondiale (Gjedrem, 1997)

Nonostante l'acquacoltura appaia relativamente lontana rispetto alle specie terrestri, Gjedrem (1997) ha interpretato la forte pendenza della produzione del salmone come potenziale esistente per la produttività, che potrebbe uguagliare o addirittura superare l'incremento osservato per gli animali terrestri. Tale tesi viene supportata dalla provata capacità dei pesci, in particolare delle specie carnivore, di convertire, due o tre volte più efficacemente rispetto a maiali e polli, l'energia derivata dall'alimento a proteina edibile per l'uomo. L'acquacoltura potrebbe quindi diventare estremamente competitiva con l'agricoltura, sviluppando e migliorando efficacemente le tecniche di allevamento (Gjedrem, 2000). Una caratteristica che contribuisce ulteriormente allo sviluppo della ricerca per il miglioramento genetico delle specie acquatiche è l'elevata fecondità. La possibilità di ottenere una numerosa progenie, da un numero limitato di individui, rappresenta uno scenario ideale per lo studio di diversi caratteri in famiglie che condividono uno (famiglie *half-sib*) o entrambi (famiglie *full-sib*) i genitori (Refstie, 1990).

A oggi, la maggior parte dei progressi in acquacoltura sono stati ottenuti attraverso le buone pratiche di gestione relative alla dieta, allo stato di salute, al benessere e alla qualità dell'acqua. Il miglioramento di questi fattori, per quanto importanti, ha avuto come risultato la sola ottimizzazione dell'ambiente di allevamento. Le strategie di riproduzione coinvolgono gli animali e la loro genetica; qualsiasi miglioramento ottenuto risulta quindi essere biologico. Un ambiente ottimizzato per l'allevamento va in ogni caso mantenuto, ma la selezione per un tratto di interesse, come la rapidità nell'accrescimento, un basso indice di conversione alimentare o la resistenza alle patologie rappresenta, per l'acquacoltura, un maggiore potenziale economico (Tave, 1993).

Gli elementi sopra descritti evidenziano come l'applicazione di tecniche di miglioramento genetico, finalizzata all'aumento della produttività, costituisca un'importante opportunità per l'allevamento ittico.

### **1.3.1 La variabilità genetica**

L'individuazione degli animali da cui deriva la progenie migliore, generazione dopo generazione, implica necessariamente la conoscenza della variabilità esistente tra loro. Questa varietà, e il suo impiego nelle strategie riproduttive e di selezione, sono di fondamentale importanza per il miglioramento genetico. I programmi di selezione si propongono di migliorare specifici caratteri, che possono essere di tipo qualitativo o quantitativo. I caratteri quantitativi non possono essere divisi in categorie distinte e possiedono una distribuzione continua, dove le differenze sono più una questione di grado che di tipo; si suppone siano regolati da un elevato numero di geni, ciascuno con una piccola influenza sul tratto. I fenotipi quantitativi sono generalmente importanti dal punto di vista economico-produttivo, degli esempi sono la lunghezza e il peso.

Falconer (1981) ha suddiviso le influenze che determinano il valore fenotipico osservato in genotipiche e ambientali, dove il genotipo rappresenta la particolare combinazione di geni di un individuo mentre l'ambiente comprende tutte le variabili non genetiche:

$$\text{Valore fenotipico (P)} = \text{Valore genotipico (G)} + \text{Effetto ambientale (E)}$$

Nel miglioramento genetico, l'interesse è incentrato nella variazione associata ad un particolare carattere, dato che la variabilità fenotipica osservata è il risultato del contributo di diverse componenti (Tave, 1993):

$$V_P = V_G + V_E + V_{G,E}$$

dove  $V_G$  rappresenta la variabilità genotipica,  $V_E$  quella ambientale e  $V_{G,E}$  l'interazione esistente tra le due.

La variabilità genetica è di primario interesse per i programmi di selezione poiché l'obiettivo di tutte le strategie riproduttive consiste nella modificazione del patrimonio genetico di una popolazione, allo scopo di aumentarne la produttività.

La variabilità genetica può, a sua volta, essere divisa in tre componenti; varianza additiva, di dominanza ed epistatica:

$$V_G = V_A + V_D + V_I$$

La varianza additiva ( $V_A$ ) rappresenta la componente più importante. La varianza di dominanza ( $V_D$ ) è il risultato dell'interazione tra coppie di alleli in un singolo locus mentre quella epistatica (o di interazione,  $V_I$ ) deriva dall'interazione di alleli tra o all'interno di loci multipli. Gli effetti additivi dei geni vengono ereditati quantitativamente da una generazione alla successiva; la varianza additiva, che rappresenta anche la varianza dei *breeding value* (\*1), è la principale causa di somiglianza tra consanguinei e quindi l'elemento determinante delle caratteristiche genetiche osservate in una popolazione e della sua risposta alla selezione (Falconer, 1981; Gjedrem, 2005). Di conseguenza, il rapporto tra la variazione additiva e quella fenotipica ( $V_A/V_P$ ) fornisce un'indicazione della misura in cui i fenotipi sono determinati dal patrimonio genetico dei genitori (ereditabilità:  $h^2$ ) e del tasso al quale il progresso genetico è stato ottenuto.

\*1. Breeding value: quantità misurabile che rappresenta la prestazione di un individuo misurata attraverso le prestazioni dei suoi figli.

### **1.3.2 La selezione assistita da marcatori**

Un tempo, la selezione di individui di una determinata specie sulla base di caratteristiche fenotipiche, allo scopo di aumentarne la produttività in allevamento, era una strategia molto praticata che ha permesso di ottenere notevoli benefici economici. Sebbene siano stati ottenuti alcuni miglioramenti significativi nella produttività, la scelta di uno specifico fenotipo, ignorando la struttura genetica dei caratteri di interesse, ha portato anche alla selezione di caratteristiche indesiderate (Dekkers *et al.*, 2002). La selezione basata sul fenotipo presenta molte limitazioni: i caratteri stimati possono essere a bassa ereditabilità, osservabili in un solo sesso, richiedere il sacrificio dell'animale, risentire dell'interazione genotipo-ambiente o manifestarsi tardivamente, anche dopo il periodo riproduttivo. Vi sono inoltre alcuni caratteri, come la resistenza ai patogeni, che possono essere studiati mediante una selezione basata unicamente sul genotipo oppure su una correlazione di quest'ultimo con il fenotipo.

Negli ultimi anni, è stata riconosciuta l'importanza della genetica molecolare per comprendere la natura genetica dei caratteri quantitativi, identificando specifiche regioni di geni o cromosomi che influenzano tali caratteristiche (Andersson, 2001).

Esistono differenti tipi di marcatori molecolari per evidenziare le varianti geniche esistenti in una popolazione. I marcatori genetici sono utilizzati per isolare geni, localizzarli sui cromosomi e determinarne l'espressione, per lo studio e la mappatura dei genomi e sono inoltre fondamentali per attuare una selezione assistita da marcatori o MAS (Marker Assisted Selection) (Duhnam, 2004). La MAS è una tecnica di selezione diretta, che si basa sull'associazione fra un carattere e un marcatore. Questa tecnica, oltre a rendere la selezione indipendente dall'interazione fenotipo-ambiente, permette la selezione ad uno stadio di sviluppo molto precoce, poiché non è necessario attendere l'espressione fenotipica del carattere.

A oggi, la varietà dei marcatori biochimici e molecolari disponibili per lo studio della genetica delle specie acquatiche rappresenta un'importante opportunità. La possibilità di esaminare il DNA di un individuo valutandone il rapporto con la popolazione, in modo da stabilire il suo pedigree e la famiglia di appartenenza e utilizzarli nella strategia riproduttiva, rappresenta un grosso vantaggio in qualsiasi programma mirato al miglioramento genetico. L'utilizzo di marcatori molecolari per tracciare il profilo genetico di singoli animali, per l'attribuzione dei genitori o per stabilire la diversità genetica utile per la selezione di caratteri economicamente rilevanti, rappresenta un grande potenziale per i programmi di miglioramento genetico e per la gestione delle strategie riproduttive (Lai, 2001). Nel settore dell'acquacoltura, una particolare tipologia di marcatori molecolari ha visto un diffuso impiego grazie alla sua versatilità: i microsatelliti.

#### 1.3.2.1 I marcatori microsatelliti

I microsatelliti sono sequenze genomiche contenenti un modulo di 2-5 nucleotidi ripetuto per decine di volte, fino ad una lunghezza massima della successione di 200 paia di basi (Rassmann *et al.*, 1991). Sono distribuiti nel genoma di tutti gli eucarioti, prevalentemente nelle regioni non codificanti e presentano un alto grado di polimorfismo di lunghezza dovuto a differenze nel numero di ripetizioni del modulo interno.

I microsatelliti sono marcatori nucleari ipervariabili: sono stati identificati fino a 50 alleli per singolo locus, l'eterozigosità media è del 50% e per alcuni loci raggiunge picchi del 100%. Il grado elevato di variabilità dipende da un tasso di mutazione molto alto, fino a  $1 \times 10^{-2}$  eventi mutazionali per generazione, con un valore di retromutazione altrettanto consistente che può permettere il ritorno all'allele di partenza in poche generazioni (Amos *et al.*, 1996). L'alto tasso di mutazione è stato imputato ad errori della DNA polimerasi che può andare incontro ad eventi di slittamento durante la replicazione,

scivolando indietro e replicando una seconda copia dello stesso nucleotide, oppure saltando oltre uno o più nucleotidi e determinando la perdita di uno o più moduli (Schlötterer and Tautz, 1992). Un altro fattore che determina l'alto tasso di mutazione, forse maggiormente della DNA polimerasi (se si considera che esiste un sistema di correzione che opera in vivo riducendo gli errori di duplicazione), è stato riconosciuto nei meccanismi di ricombinazione tra alleli di diversa lunghezza che, durante l'appaiamento meiotico dei cromosomi omologhi, danno crossing over diseguale generando nuovi alleli.

L'elevato grado di polimorfismo, l'ereditarietà codominante (\*2), l'elevato numero e la distribuzione nel genoma, rendono i microsatelliti marcatori molecolari di grande interesse per molti studi di tipo genetico (Dunham, 2004).

Il polimorfismo e l'ereditarietà codominante permettono di ottenere precisi profili genetici e aumentano l'accuratezza delle mappe, incrementando l'informazione genetica e permettendo di tracciare accuratamente la discendenza di singoli individui o famiglie (Waldbieser and Wolters, 1999). La maggiore conservazione delle regioni fiancheggianti i repeats, rendono i microsatelliti adatti per lo studio del differenziamento genetico anche tra specie filogeneticamente vicine (Goldstein *et al.*, 1995).

Questa versatilità ha promosso l'utilizzo dei marcatori microsatelliti in diversi settori dell'acquacoltura: la determinazione dei rapporti di parentela (Castro *et al.*, 2007), gli effetti del fenomeno dell'inbreeding (Brown *et al.*, 2005) e la stima della diversità e della variabilità nelle popolazioni (Karaïskou *et al.*, 2009; Arabaci *et al.*, 2010).

\*2. Nella ereditarietà codominante, entrambi gli alleli sono espressi in un soggetto eterozigote. Il profilo omozigote può essere quindi distinto dai profili eterozigoti, permettendo una facile stima delle frequenze alleliche in una popolazione.

### **1.3.3 Le mappe genomiche**

Le mappe genomiche permettono di ottenere maggiori informazioni relative al genoma di individui appartenenti ad una specie di interesse, descrivendo l'ordine di loci genetici o di marcatori e la distanza tra loro su ciascun cromosoma. Vi sono due modi per mappare il genoma, utilizzando mappe fisiche oppure genetiche (di *linkage*), classificate in base ai metodi impiegati per la loro costruzione e all'unità di misura adoperata per valutare la distanza tra i marcatori. Lo scopo di realizzare delle mappe è duplice: la conoscenza dell'organizzazione dei geni sui cromosomi e l'isolamento e clonazione di geni d'interesse.

#### 1.3.3.1 Mappe fisiche

La mappa fisica viene costruita attraverso tecniche di biologia molecolare che analizzano direttamente i frammenti di DNA e posizionano sequenze contenenti geni distintivi. Una mappa fisica comprende marcatori o regioni fisicamente identificabili, descrive l'ordine e la distanza tra due marcatori, misurata in numero di nucleotidi e viene costruita senza l'analisi della ricombinazione genica.

Sono state sviluppate un gran numero di tecniche di mappatura fisica ma le più importanti sono: le mappe di restrizione, l'indridazione in situ con fluorescenza (FISH) e la mappatura mediante STS (*sequenze tagged site*). Le mappe di restrizione localizzano la posizione dei siti di taglio delle endonucleasi di restrizione all'interno di una molecola di DNA. Nella FISH la posizione di specifiche sequenze è determinata ibridando sui cromosomi intatti una sonda, associata ad un fluorocromo, che contiene il marcatore. Infine, la mappatura mediante STS prevede il posizionamento di brevi sequenze mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR) o per ibridazione di frammenti genomici. Gli STS sono corti segmenti di DNA, lunghi circa 60-1000 bp, che rappresentano dei punti di riferimento da cui partire per l'esplorazione del genoma e del sequenziamento (Brown, 2004).

### 1.3.3.2 Mappe di linkage

Le mappatura genetica o di associazione si basa sull'uso di tecniche genetiche per costruire mappe che mostrano la posizione nel genoma dei geni e di altre caratteristiche delle sequenze. Le distanze vengono determinate in base alla frequenza con cui due marcatori localizzati sulla stesso cromosoma (sintenici) sono ereditati insieme. Gli alleli di loci molto vicini sul cromosoma, infatti, hanno una probabilità maggiore di essere ereditati insieme rispetto a quelli presenti su loci distanti. Un'unità di mappa genetica, o centiMorgan (cM), rappresenta la distanza tra due geni per i quali un prodotto della meiosi su cento è ricombinante. È importante tenere presente che interferenza e crossing-over multipli possono rendere la relazione tra frequenza di ricombinazione e distanza di mappa genetica non lineare.

Le mappe che usano come marcatori i geni sono mappe a bassa densità, pertanto non sempre informative. Nella costruzione di una mappa di *linkage* si utilizzano preferibilmente sequenze di DNA definite come marcatori genetici molecolari. Affinché un marcatore possa essere usato per costruire mappe genetiche deve essere polimorfico. L'elevato grado di polimorfismo, l'ereditarietà codominante, l'elevato numero e la distribuzione nel genoma rendono i microsatelliti i marcatori di elezione per la costruzione di mappe di associazione.

## 1.4 La genomica funzionale e il suo contributo all'acquacoltura

Tutti gli esseri viventi portano nel loro genoma precise istruzioni sulla loro struttura, crescita e funzione. La genomica è il settore delle scienze biologiche che si occupa di studiare e decodificare queste istruzioni.

Sebbene la funzione del DNA sia quella di custodire l'informazione ed assicurarne la corretta trasmissione alle generazioni successive, questa viene costantemente modulata da processi dinamici che ne influenzano l'attività e l'effetto. La difficoltà maggiore sta nel comprendere le complesse interazioni tra i geni, i loro prodotti e l'ambiente.

La genomica funzionale è una branca delle scienze che ha lo scopo di determinare quale gene è responsabile di un determinato cambiamento/carattere fenotipico, permettendo di capire i meccanismi di controllo molecolare dei processi biologici e fisiologici, della risposta alle patologie e agli stimoli ambientali.

L'applicazione della genomica, della trascrittomica, della proteomica e di nuove "omics" emergenti può offrire un contributo tangibile al miglioramento del benessere animale nonché alla comprensione dei processi biologici che determinano le caratteristiche fenotipiche (tasso di crescita, presenza/assenza deformità, suscettibilità patologie ecc.) che hanno un'importanza considerevole in acquacoltura, sia dal punto di vista economico che qualitativo.

Negli ultimi hanno avuto un forte sviluppo studi di genetica e genomica su specie ittiche modello quali zebrafish (*Danio rerio*, Teh *et al.* 2005), tetraodon (*Tetraodon nigroviridis*,; Crollius, 2006) e fugu (*Takifugu rubripes*; Clark *et al.* 2001). Recentemente i genomi di altre due specie di teleostei, stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) e medaka (*Oryzias latipes*, Takeda *et al.* 2008), sono stati interamente sequenziati (<http://www.ensembl.org>). Il rapido sviluppo della genomica funzionale nelle specie ittiche considerate modello apre la strada a validi studi di tipo comparativo;

con l'accumulo di informazioni su queste specie, infatti, la caratterizzazione anche di specie non modello, ma comunque di forte interesse economico, è ora possibile.

L'orata è una specie di grande interesse commerciale, in particolare per l'acquacoltura del Mediterraneo; appartiene all'ordine dei Perciformi, il più ricco in numero di specie (circa 10.000) ma piuttosto povero in termini di informazioni e strumenti genomici disponibili.

Il crescente interesse per questa specie ha prodotto numerosi studi in diversi settori quali l'immunologia, l'endocrinologia, la morfologia scheletrica e la fisiologia del muscolo. Negli ultimi anni sono stati inoltre sviluppati una serie di strumenti genomici. Una prima mappa di ibridi da radiazione (RH) è stata costruita e successivamente migliorata con oltre 1000 marcatori (Senger *et al.*, 2006; Sarropoulou *et al.*, 2007). Franch e colleghi (2006) hanno prodotto una mappa di *linkage* a media densità, ulteriormente sviluppata in questo progetto di ricerca (Massault *et al.*, 2010).

Un progetto di sequenziamento di BAC-end è stato recentemente completato (Kuhl *et al.*, 2011). Relativamente agli approcci *high-throughput* per lo studio di espressione genica, un primo microarray a cDNA è stato sviluppato nel 2005 (Sarropoulou *et al.*, 2005). Successivamente, una seconda piattaforma *microarray* a oligonucleotidi è stata prodotta da Ferrareso e colleghi (2008), ulteriormente aggiornata con nuove sequenze pubbliche di trascritti unici durante questo progetto di dottorato.

#### **1.4.1 Approcci *high-throughput*: DNA microarray**

Lo studio dei profili di espressione genica mediante la tecnologia *microarray* è tra le tecnologie maggiormente utilizzate nella branca della genomica funzionale. I *microarray* a DNA possono essere descritti come una serie ordinata di frammenti di acidi nucleici noti posizionati su un supporto solido e che fungono da “*detector*” molecolari. L'ibridazione di molecole di DNA o RNA fluorescenti su queste *slide*,

contenenti migliaia di “*detector*”, permette di identificare e quantificare un numero elevatissimo di molecole di RNA o DNA alla volta.

A seconda delle dimensioni e della loro complessità, le piattaforme *microarray* sono strumenti utili per identificare la risposta dell'intero trascrittoma a diverse condizioni fisiologiche o sperimentali. I *microarray* per lo studio dei profili di espressione possono essere fabbricati mediante lo spottaggio di cloni di cDNA o prodotti di PCR o mediante la sintesi, direttamente sul supporto, di oligonucleotidi.

Sia le piattaforme a cDNA che quelle a oligo-DNA permettono l'analisi di migliaia di geni contemporaneamente, rendendo possibile una descrizione globale del fenomeno sotto osservazione e permettendo, quindi, di definire le alterazioni geniche che stanno alla base di condizioni patologiche o di identificare i profili di espressione che caratterizzano diverse condizioni di interesse. Assieme ad altri strumenti di genomica funzionale *high-throughput*, lo studio dell'espressione genica tramite *microarray* permette un approccio obiettivo ed imparziale (libero da ipotesi iniziali) a diversi tipi di problematiche, dove l'unico assunto di base è che i geni rappresentati nella piattaforma cambino il livello di espressione in relazione alle diverse condizioni sperimentali.

Numerose piattaforme *microarray* sono state sviluppate, oltre che per l'uomo, per un elevato numero di specie “modello”. Poiché fino a poco tempo fa non venivano considerate modelli sperimentali “ideali”, questo genere di tecnologia non era stata estesa alle specie ittiche a eccezione di una ridotta elite rappresentata da *D. rerio*, *T. nigroviridis*, *T. rubripes* e *O. latipes*.

In breve tempo questa tecnologia ha, tuttavia, avuto uno sviluppo esponenziale portando alla progettazione e applicazione di piattaforme *microarray*, sia a cDNA che a oligonucleotidi, per quasi 20 diverse specie di teleostei (Miller *et al.*, 2008) appartenenti a 3 diversi ordini (*Ostariophysi*, *Protacanthopterygi*, *Acanthopterygi*).

### 1.4.2 Studio di geni significativi per la risposta alle patologie

L'insorgenza di patologie costituisce un problema che danneggia notevolmente la produttività in acquacoltura. Al momento della schiusa, il sistema immunitario dei pesci è immaturo e lo sviluppo completo degli organi linfoidei non viene raggiunto fino a metamorfosi avvenuta. Gli stadi di sviluppo precoci (larvali e giovanili) risultano quindi estremamente suscettibili alle infezioni, che rappresentano una delle più importanti cause di elevata mortalità in allevamento.

La comprensione dei meccanismi molecolari, coinvolti nella risposta alle patologie, contribuisce alla conoscenza di un processo biologico chiave per le specie ittiche allevate e offre la prospettiva di generare nuove strategie preventive e terapeutiche, applicabili al miglioramento dell'acquacoltura.

L'esito di un'infezione può dipendere in gran parte dagli eventi che si succedono dopo il riconoscimento del patogeno. L'attivazione dei linfociti B e T e del sistema del complemento porta a una massiccia produzione di fattori umorali che regolano il reclutamento delle cellule del sistema immunitario nel sangue e nei tessuti infetti. Da questi eventi, deriva l'organizzazione della risposta antimicrobica, comprensiva dei meccanismi effettori e della neutralizzazione e smaltimento delle tossine endogene ed esogene, dei patogeni, delle cellule danneggiate e dei loro componenti. La risposta all'infezione costituisce una trama complessa, che varia considerevolmente da individuo a individuo. Esistono differenti tipi di scenario, con esiti efficaci o negativi (Škugor *et al.*, 2009).

La genomica funzionale, e in particolare gli approcci “*whole-genome*”, sono in grado di offrire una comprensione dettagliata dei complessi processi tissutali e cellulari che sottendono all'attivazione del sistema immunitario. Negli ultimi anni un elevato numero di studi, sia *in vitro* che *in vivo*, si sono concentrati nell'analisi, tramite microarray, dei profili di espressione genica della risposta alle patologie in specie ittiche di interesse

commerciale. Le ricerche sono state dirette sulle risposte a malattie generate da batteri (Rise *et al.*, 2004; Peatman *et al.*, 2007; Vanya Ewart *et al.*, 2008), virus (Jørgensen *et al.*, 2008; MacKenzie *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009; LeBlanc *et al.*, 2010), funghi (Roberge *et al.*, 2007) e parassiti (Matsuyama *et al.*, 2008; Wynne *et al.*, 2008; Škugor *et al.*, 2009). I trascritti che, in seguito a infezione sperimentale, mostrano consistenti alterazioni nei livelli di espressione possono essere considerati geni candidati per successivi studi funzionali e utilizzati per monitorare stato di salute e capacità di reazione degli stadi precoci di sviluppo.

## 1.5 Scopo del lavoro

L'impatto negativo della crescente attività di pesca sulla fauna ittica e in generale sull'ambiente marino rende necessaria una maggiore cautela nello sfruttamento di tali risorse naturali, ed impone che il crescente fabbisogno alimentare trovi una risposta alternativa attraverso la pratica dell'acquacoltura. Sebbene questa industria abbia avuto un notevole sviluppo rispetto al passato, diverse limitazioni non sono state ancora superate; in particolar modo l'elevata mortalità larvale, il lento accrescimento di alcune specie e la forte suscettibilità alle patologie. L'applicazione delle tecnologie genomiche, incrementando la conoscenza dei meccanismi molecolari responsabili di caratteristiche fenotipiche importanti per la produttività in acquacoltura, offre l'opportunità di rendere più efficiente questo settore.

La pasteurellosi, setticemia batterica associata al microrganismo Gram negativo *Photobacterium damsela* subsp. *piscida*, rappresenta un problema sanitario rilevante per l'allevamento intensivo di *S. aurata*. Gli stadi larvali e giovanili sono altamente suscettibili all'infezione che ha conseguenze generalmente fatali (Hawke *et al.*, 2003), con importanti perdite economiche per gli allevamenti colpiti. Un approccio promettente per prevenire la patologia consiste nell'utilizzo di marcatori genetici per la selezione di linee di animali maggiormente resistenti al patogeno. La possibilità di ottenere linee selezionate ridurrebbe i costi di allevamento e renderebbe meno frequenti gli interventi farmacologici, garantendo un prodotto di migliore qualità.

L'obiettivo del progetto di ricerca è quello di identificare loci genetici direttamente coinvolti nella determinazione della resistenza alla fotobatteriosi ittica negli stadi giovanili di orata o loci che sono in stretta associazione fisica (*linkage*) con i loci che determinano la resistenza (*Quantitative trait loci* o QTL). Lo studio si è sviluppato su due linee di ricerca: una basata sulla genomica strutturale, l'altra basata sulla genomica funzionale.

Una popolazione di 500 individui, generata da 8 maschi e 5 femmine, è stata sottoposta a infezione sperimentale con *Phdp* e, successivamente, genotipizzata utilizzando un set di 151 marcatori microsatelliti. Dalla scansione del genoma così ottenuta è stata elaborata una nuova mappa di *linkage* ed eseguita un'analisi di QTL per due caratteri con distribuzione continua, la lunghezza al momento del decesso e la sopravvivenza, e per due caratteri binari, la sopravvivenza al giorno 7 e al giorno 15, associati ai maggiori picchi di mortalità.

Il progetto ha previsto l'aggiornamento della piattaforma microarray a oligonucleotidi (60-meri) precedentemente sviluppata da Ferraresso e colleghi (2008). Una nuova clusterizzazione è stata eseguita su 67977 sequenze pubbliche di trascritti unici per ottenere 25125 sequenze, di cui 6421 nuove rispetto la precedente versione. La piattaforma è stata utilizzata per l'analisi di espressione genica nel rene cefalico di orata, in seguito ad infezione sperimentale con *Phdp*. Analisi statistiche dei risultati ottenuti sono state condotte allo scopo di identificare i trascritti la cui espressione risulti essere significativamente alterata negli individui colpiti da infezione.

Utilizzando un approccio comparativo, la posizione dei QTL più significativi e i geni differenzialmente espressi sono stati localizzati nel genoma completo di *G. aculeatus*, a supporto di una più accurata analisi genetica che porti all'individuazione di potenziali marcatori per la selezione di linee con aumentata resistenza alla fotobatteriosi.



**2. IDENTIFICAZIONE DI LOCI GENETICI  
ASSOCIATI ALLA RESISTENZA ALLA  
FOTOBATTERIOSI ITTICA  
IN ORATA**



## 2.1 INTRODUZIONE

La fotobatteriosi, causata dal batterio *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*, è una patologia infettiva che colpisce diverse specie ittiche dei mari temperati. Per la maggior parte degli allevamenti intensivi di orata (*S. aurata*) essa rappresenta un reale problema sanitario, causando tassi di mortalità che possono raggiungere il 90-100% delle popolazioni infette (Hawke *et al.*, 2003). L'insorgenza di patologie costituisce uno dei principali problemi legati alla produttività in acquacoltura. La morte di interi lotti di produzione procura ingenti perdite economiche, così come la potenziale infezione degli stadi giovanili potrebbe comportare un rischio per l'intero allevamento.

Una comune strategia per controllare le infezioni consiste nella cura farmacologica e nell'eliminazione degli animali malati, insieme alla disinfezione delle strutture. Un approccio alternativo è rappresentato dal prevenire l'infezione, aumentando le difese immunitarie dei pesci tramite vaccinazione o selezione genetica. In generale, la prevenzione delle patologie negli allevamenti ittici intensivi non è solo una questione economica, ma anche etica e ambientale. L'obiettivo a lungo termine della ricerca in questo settore è quello di sviluppare le conoscenze fondamentali per il raggiungimento di uno stato di salute e benessere ottimali per gli animali allevati, senza danneggiare l'ambiente a causa dell'eccessivo utilizzo di farmaci antibatterici (Van Muiswinkel *et al.*, 1999).

Recentemente, Antonello e colleghi (2009) hanno documentato in orata l'esistenza di variabilità genetica per la sopravvivenza a seguito di un'infezione sperimentale con *Phdp* e calcolato l'ereditabilità della resistenza all'infezione, risultata però piuttosto bassa (0.12-0.45). Manifestandosi la malattia sotto forma di sporadiche epizootie e non di infezioni endemiche, la stima del carattere sopravvivenza appare difficile e dispendiosa.

Le caratteristiche sopra riportate fanno della selezione assistita da marcatori la strategia migliore per l'attuazione di programmi di miglioramento genetico per questo tratto (Dekkers *et al.*, 2002) basandosi, per la scelta dei genitori della nuova generazione, sulle informazioni molecolari. La MAS, per prima cosa, richiede l'individuazione delle regioni genomiche associate al carattere quantitativo di interesse o mappaggio di QTL (*Quantitative Trait Loci*). L'informazione può essere utilizzata sia per la riproduzione selettiva, sia per l'individuazione di geni che influenzano la resistenza alla patologia finalizzata alla comprensione delle basi biologiche del carattere. La conoscenza più approfondita dei meccanismi di risposta può inoltre contribuire alla progettazione di nuovi trattamenti farmacologici o altre terapie.

Il mappaggio di QTL in orata è facilitato dalla rapida evoluzione degli strumenti genomici per questa specie e, in generale, per le specie ittiche allevate (Canario *et al.*, 2008). Come anticipato precedentemente, attraverso lo sviluppo di un'ampia gamma di marcatori microsatelliti è stata costruita una prima mappa di *linkage* (Franch *et al.*, 2006), ulteriormente sviluppata in questo studio. La stessa tipologia di marcatori molecolari è stata qui utilizzata per effettuare una scansione del genoma di orata, finalizzata all'individuazione di loci genetici associati alla resistenza alla fotobatteriosi ittica. I dati sperimentali ottenuti sono stati elaborati in collaborazione con il Roslin Institute, afferente all'Università di Edinburgo.

## 2.2 MATERIALI E METODI

### 2.2.1 La popolazione sperimentale

Il gruppo considerato per questo studio fa parte di una popolazione più grande di pesci, allo stadio giovanile, precedentemente sottoposti ad un'infezione sperimentale (*challenge*) con *Phdp*, per la stima dell'ereditabilità della resistenza alla patologia (Antonello *et al.*, 2009).

Gli animali sono stati procurati dall'allevamento "Valle Ca' Zuliani" (Monfalcone, Italia). Le uova fertilizzate, prodotte da quattro differenti gruppi di riproduttori (256 individui in totale), sono state raccolte e conservate in un acquario dedicato. Tutti i riproduttori derivano da popolazioni selvatiche: due gruppi composti da individui del mare nord Adriatico (AD1 e AD2, 75 individui ciascuno) e due da un misto di individui del mare Adriatico e Atlantico (ADAT1 e ADAT2, 53 individui ciascuno). Gli animali provenienti dall'Adriatico sono stati raccolti nel medesimo sito e momento, mentre quelli Atlantici sono stati raccolti, durante lo stesso campionamento, lunghe le coste a sud della Spagna.

Dopo la schiusa, le larve sono state allevate secondo procedure standard e tenute in acquario fino al raggiungimento dei 110 giorni di età. Successivamente, è avvenuto il trasferimento degli individui all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Legnaro, Italia) per l'infezione sperimentale e la divisione in due vasche areate (A e B), ciascuna con 800 litri di acqua marina (salinità 35‰) ricircolante e temperatura costante di 19°C, per la produzione di due replicati indipendenti. Dopo una settimana di acclimatamento, i pesci sono stati infettati sperimentalmente con un ceppo altamente virulento di *Phdp* (249/ittio99) (Zappulli *et al.*, 2005). Il monitoraggio della mortalità è avvenuto giornalmente, per 19 giorni. Completato il *challenge*, i genotipi di 7 loci

microsatelliti di 1753 individui e di tutto il gruppo di riproduttori, sono stati utilizzati per l'assegnazione di parentela.

### **2.2.2 Misurazione dei fenotipi**

La rimozione dei pesci deceduti è avvenuta giornalmente e la data di morte registrata per ciascun individuo. Gli animali sopravvissuti a esperimento terminato sono stati registrati come morti al giorno 20.

Per la determinazione della lunghezza dei pesci al momento del decesso, o al ventesimo giorno per quelli sopravvissuti, sono state impiegate immagini digitali. Considerato che la misura degli animali è stata annotata solo *post mortem*, non può essere considerata indipendente dal tempo di sopravvivenza.

Visto la particolare dinamica dell'andamento dell'infezione, due ulteriori caratteristiche (binarie) sono state prese in considerazione: la sopravvivenza al settimo e al quindicesimo giorno, dove agli animali vivi è stato dato un punteggio di uno mentre a quelli morti di zero.

### **2.2.3 Progettazione dell'analisi di QTL**

Per il mappaggio di QTL è stata adottato un disegno sperimentale che prevede due *step*, elaborato da Massault e colleghi (2008).

Il primo *step* implica l'accumulo di campioni di DNA e dati fenotipici per un elevato numero di individui. L'infezione sperimentale ha coinvolto in tutto 3577 animali; da 1753, campionati casualmente, è stato estratto il DNA, successivamente utilizzato per la genotipizzazione di 7 loci microsatelliti, da cui l'assegnazione di paternità. Per 1257 individui è stato possibile risalire univocamente ai genitori (Antonello *et al.*, 2009) impiegando il software PAPA (Duchesse *et al.*, 2002). Per il mappaggio di QTL sono stati selezionati 500 individui, allo scopo di analizzare le famiglie *full-sib* più numerose (Massault *et al.*, 2008). Gli animali considerati costituiscono la progenie di 8 maschi e 6 femmine e compongono 17 famiglie *full-sib* (Tabella 2.1).

Dam	Sire								Total
	147	153	159	165	169	174	178	180	
136	-	-	-	-	-	-	7	-	7
151	151	-	-	-	-	-	35	-	186
160	59	-	-	-	-	-	8	4	71
168	-	-	-	-	-	-	18	-	18
170	-	7	6	-	19	-	20	-	52
172	54	-	21	20	-	27	19	25	166
Total	264	7	27	20	19	27	107	29	500

**Tabella 2.1** Struttura e numerosità delle famiglie half-sib e full-sib selezionate per il mappaggio di QTL

La famiglia *full-sib* più numerosa conta 151 individui, tre famiglie hanno dimensione media (da 35 a 59 individui) e le altre si compongono di un numero di animali inferiore. Considerando le famiglie che condividono solo il padre (*paternal half-sib*) si osservano due grandi gruppi: uno generato dal maschio 147, costituito da 264 individui e l'altro dal maschio 178, con 107 figli. Le 6 famiglie rimanenti contano meno di 30 animali. Le famiglie che condividono solo la madre (*maternal half-sib*) possono essere divise in 6 gruppi: due di grandi dimensioni (madre 151 con 186 figli e madre 172 con 160 figli), due medi (con 71 e 52 figli) e due piccoli (30 individui totali).

#### 2.2.4 La mappa genetica

I marcatori microsatelliti sviluppati precedentemente da Franch e colleghi (2006), per la costruzione della mappa di *linkage* di prima generazione (circa 290), sono stati testati sui riproduttori della popolazione selezionata per questo studio, per indagare il loro polimorfismo. Dei 151 loci selezionati e riportati in Appendice 2A, 87 avevano già trovato collocazione nella prima mappa di *linkage*, mentre 64 sono stati adottati per la prima volta in questo progetto.

I 500 individui precedentemente individuati sono stati quindi genotipizzati con 151 marcatori microsatelliti. Sulla base dei profili ottenuti, è stata costruita una mappa genetica utilizzando il programma CRI-MAP v.2.4

(<http://compgen.rutgers.edu/multimap/crimap>). Per prima cosa, attraverso l'opzione *two-point* (LOD score > 3), sono stati individuati i marcatori associati in modo significativo; i gruppi di *linkage* sono stati costruiti utilizzando l'opzione *build*. Facendo riferimento alle informazioni della prima mappa di associazione (Franch *et al.*, 2006), l'opzione *all* del programma è stata impiegata per posizionare i nuovi marcatori in un ordine predeterminato, ricavato dai marcatori già pubblicati. Successivamente, i risultati ottenuti sono stati valutati attraverso l'opzione *flipsn* (elevata a 4 marcatori); individuate le alternative nell'ordine non significativamente differenti, è stata selezionata la combinazione con più elevata probabilità.

### 2.2.5 Mappaggio di QTL

Per il mappaggio di QTL sono stati adottati due diversi approcci: un'analisi di regressione *half-sib*, che ha permesso di individuare QTL e genitori segreganti e un'analisi della varianza, per la stima dell'effetto dei QTL a livello di popolazione.

L'analisi di regressione *half-sib* utilizzata per l'identificazione dei QTL associati a crescita e sopravvivenza a 7, 15 giorni e a *challenge* terminato è stata implementata come descritto da Knott e colleghi (1996) ed è disponibile online sul sito web GridQTL (<http://gridqtl.org.uk>). Sugli stessi dati sono state eseguite due analisi separate, una per la stima degli effetti dei QTL segreganti nei maschi e l'altra per quelli segreganti nelle femmine. Il modello utilizzato è il seguente:

$$y_{ij} = \alpha_i + \beta_i x_{ij} + e_{ij}$$

dove  $y_{ij}$  rappresenta il fenotipo dei figli,  $\alpha_i$  la media della famiglia  $i$ ,  $\beta_i$  il coefficiente di regressione della famiglia  $i$ ,  $x_{ij}$  la probabilità di ereditare l'aplotipo 1 dei genitori condizionato dall'informazione sui marcatori ed  $e_{ij}$  l'effetto residuo.

Il contenuto informativo e la varianza fenotipica spiegata dai QTL sono stati calcolati come descritto da Knott e colleghi (1996). Per ciascun gruppo di *linkage*, è stata fornita la statistica F per la posizione più probabile così come le soglie 5% *chromosome-wide* (putativo) e 5% *genome-wide* (significativo) per determinare la significatività del QTL trovato. Le soglie sono state calcolate utilizzando test di permutazione e gli intervalli di confidenza utilizzando analisi di bootstrap.

L'analisi della varianza (Gorge *et al.*, 2000) è stata eseguita per i caratteri crescita e sopravvivenza, entrambi distribuiti in modo continuo. Il modello utilizzato è il seguente:

$$y = Xb + Zu + Zv + e$$

dove y rappresenta il fenotipo dei figli, X la matrice di incidenza che mette in relazione i fenotipi con gli effetti ambientali sistemati, b il vettore con le soluzioni per gli effetti sistemati, Z la matrice di incidenza che collega gli animali al fenotipo, u il vettore per l'effetto poligenetico additivo, v il vettore per l'effetto dei QTL additivo ed e il vettore per l'effetto ambientale. La log-verosimiglianza (*loglikelihood*) è stata successivamente confrontata con il modello in assenza di QTL, utilizzando un test del rapporto di log-verosimiglianza (LRT), che segue una distribuzione chi quadrato con un grado di libertà.

$$LRT = 2 (\text{loglikelihood (modello con QTL)} - \text{loglikelihood (modello senza QTL)})$$

## 2.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

### 2.3.1 La mappa genetica

Dei 151 marcatori microsatelliti genotipizzati in 500 animali, 140 sono stati mappati in 24 gruppi di *linkage* (LG), lo stesso numero di cromosomi descritti per il set aploide di orata (Cataudella *et al.*, 1980). La lunghezza della mappa prodotta, riportata in Appendice 2B, è di 1041.3 centiMorgan (cM) e lo spazio medio tra i marcatori di 5.8 cM. La mappa di prima generazione (Franch *et al.*, 2006) conteneva 198 marcatori, la cui distanza media era 6.8 cM, per una lunghezza totale di 1241.9 cM. Confrontando le due mappe, si osserva una concordanza per la maggior parte dei gruppi di *linkage*. Le uniche eccezioni sono rappresentate da: (i) il marker *Ad75*, inizialmente incluso nel LG9 ora nel LG23; (ii) il LG22, non presente nella mappa di questo progetto; (iii) il LG18 che ora include i vecchi LG18 più LG26.

Le differenze osservate sono facilmente giustificabili prendendo in considerazione la mappa RH di orata (Senger *et al.*, 2006; Sarroupoulou *et al.*, 2007), in cui sono stati localizzati 99 loci utilizzati per questo studio. In questo modo è stato possibile ancora la nuova mappa di *linkage* alla mappa fisica (Tabella 2.2). La posizione originale del marcatore *Ad75* nel LG9 non era stata stabilita con certezza (Franch *et al.*, 2006) e inoltre, se confrontato con gli altri marcatori dello stesso LG, si collocava in un diverso gruppo RH (RH25 al posto di RH23; Sarroupoulou *et al.*, 2007); è lecito quindi ipotizzare che la posizione attuale sia quella corretta. Il LG22 nella prima mappa aveva dimensioni ridotte e conteneva solo due marcatori, non informativi per questo studio di popolazione. Sulla base della comparazione tra mappa RH (Sarroupoulou *et al.*, 2007) e la presente mappa di associazione, il LG22 potrebbe unirsi al LG8, appartenendo i marcatori di entrambi al medesimo gruppo RH (RH2).

	Linkage map																								
RH	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	23	24	25	
16	4																								
11		5																							
17			7																						
15				4																					
3					4																				
1						4																			
19							5																		
20								1																	
2									8																
22										3															
7											3														
13												4													
25													3												
8														2											
14															4										
21																4									
23																	1								
6																		4							
12																			8						
10																				3					
9																					3				
18																						2			
4																							4		
5																								4	
24																									6

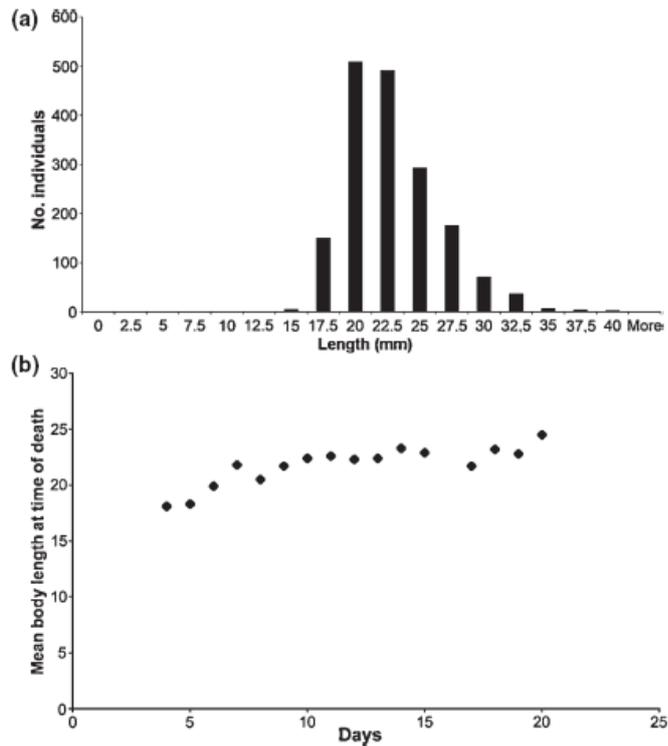
**Tabella 2.2** Oxford plot di confronto tra la mappa di linkage e quella RH di *Sparus aurata*

La fusione del LG18 con il LG26 in un unico gruppo (LG18) era stata predetta dalla mappa di ibridi da radiazione, contenente in un unico gruppo RH (RH12) i marcatori di entrambi i LG.

Nonostante la mappa di *linkage* elaborata in questo progetto contenga un numero di marcatori inferiore (140) rispetto la mappa di prima generazione (198), le dimensioni nettamente superiori della popolazione sperimentale (500 individui invece di 50) forniscono una migliore rappresentazione del genoma di orata. Infine, la localizzazione di 99 loci nella mappa RH offre l'opportunità di attuare un approccio genomico comparativo, potendo quest'ultima essere facilmente collegata a sequenze genomiche di altre specie ittiche (Sarropoulou et al., 2007).

### 2.3.2 Crescita e mortalità

La figura 2.1 illustra la distribuzione di tutti i valori di lunghezza dei pesci al momento del decesso (a) e la media dello stesso valore per gli animali rimossi lo stesso giorno, per un totale di 20 giorni e 500 animali (b).

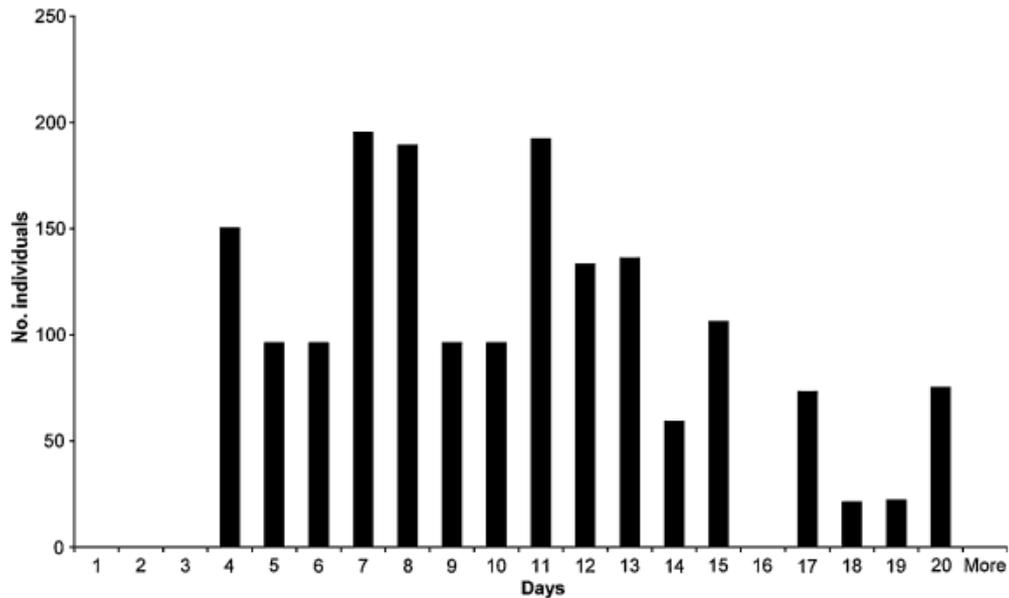


**Figura 2.1**

(a) Distribuzione del valore di lunghezza del corpo al momento del decesso

(b) Valore medio dei valori di lunghezza per giorno. Non sono stati registrati decessi fino al quarto giorno (nessuna misurazione per il giorno 16)

Antonello e colleghi (2009) avevano evidenziato, per l'intero gruppo sottoposto all'infezione sperimentale, due picchi di mortalità, uno al settimo giorno (11.4% di perdite) e uno di minore entità al quindicesimo. Nella sotto popolazione selezionata per questo studio sono stati osservati 3 picchi: uno al giorno 7/8, uno al giorno 11 e uno al giorno 15 (Figura 2.2). Analizzando la sopravvivenza a tempi diversi, piuttosto che il numero di decessi in un dato periodo, i giorni 7 e 15 sono stati scelti come soglie per distinguere tra mortalità precoce e tardiva. La scoperta di differenti QTL per tempi diversi del *challenge* potrebbe indicare una risposta bifasica all'infezione.



**Figura 2.2** Frequenze giornaliere dei decessi per 19 giorni di *challenge*

### 2.3.3 QTL per la resistenza alla fotobatteriosi

Il contenuto informativo, che misura l'informatività di un marcatore da 0 (bassa informatività) a 1 (elevata informatività), risulta in media 0.68 per l'analisi di regressione *half-sib* paterna (PHS) e 0.71 per quella materna (MHS). I valori sono generalmente buoni, tuttavia, al LG9 e al LG19 sono associati valori inferiori a 0.5 per le analisi *half-sib* rispettivamente, materna e paterna e solo paterna.

Le analisi per la sopravvivenza a 7, 15 giorni e a *challenge* terminato hanno evidenziato 2 QTL significativi *genome-wide* e 18 putativi *chromosome-wide*, distribuiti in 10 differenti gruppi di *linkage* (Tabella 2.3).

Il primo QTL significativo *genome-wide* è coinvolto nella resistenza alla patologia ed è stato associato al LG21, attraverso un'analisi di regressione PHS. Questo locus spiega il 4% della varianza fenotipica e il suo intervallo di confidenza copre l'intero gruppo di *linkage* (4 cM). Il risultato è stato confermato dall'analisi della varianza, che ha identificato un QTL per la sopravvivenza con LRT 15.2 nel LG21.

Trait <sup>1</sup>	Method <sup>2</sup>	LG <sup>3</sup>	Position <sup>4</sup>	F <sup>5</sup>	5% CW <sup>6</sup>	5% GW <sup>7</sup>	Effect (%) <sup>8</sup>	CI <sup>9</sup>
Significant								
Survival	PHS	LG21	2	3.4	2.1	3.4	4	0-4
Day 15	PHS	LG3	0	3.8	2.3	3.6	6	0-33
BLD	PHS	LG6	11	5.0	1.8	2.3	8	0-40
	MHS	LG6	19	3.9	1.9	3.3	5	2-47
Putative								
Survival	PHS	LG1	19	2.5	2.3	3.4	4	0-36
	PHS	LG3	0	2.3	2.10	3.4	4	0-33
	PHS	LG10	8	2.3	1.9	3.4	4	0-18
	PHS	LG19	3	2.5	2.5	3.4	7	0-37
	MHS	LG21	1	2.7	2.3	3.6	3	0-4
Day 7	PHS	LG1	32	2.6	2.2	3.3	4	0-36
	PHS	LG4	7	2.8	2.2	3.3	4	0-43
	MHS	LG5	27	2.9	2.7	4.2	3.5	0-44
	PHS	LG14	24	3.2	2.4	3.3	5	5-38
	PHS	LG19	0	3.3	2.0	4.2	7	0-37
	PHS	LG21	2	2.7	2.2	4.3	4	0-4
	MHS	LG21	1	3.6	2.6	4.2	4	0-4
Day 15	PHS	LG10	8	2.3	2.1	3.6	6	0-18
	PHS	LG13	2	3.2	2.3	3.6	5	0-59
	PHS	LG16	13	2.5	2.3	3.6	4	0-13
	PHS	LG19	18	3.1	3.1	3.6	9	0-37
	MHS	LG19	37	1.9	1.9	4	2	0-37
	MHS	LG21	2	3.9	2.2	4	4	0-4
BLD	MHS	LG4	4	3.0	2.0	3.4	4	0-43
	MHS	LG5	38	2.1	1.9	3.4	2.5	21-45
	PHS	LG8	7	2.2	1.8	2.7	5	0-25
	PHS	LG15	13	2.4	1.8	2.7	4	5-55

**Tabella 2.3** QTL significativi e putativi associati a crescita e resistenza alla fotobatteriosi ittica.

<sup>1</sup> Tratto di interesse: sopravvivenza, sopravvivenza al giorno 7, sopravvivenza al giorno 15 e lunghezza al momento del decesso (BLD)

<sup>2</sup> Metodo utilizzato: regressione *half-sib* paterna (PHS) o materna (MHS)

<sup>3</sup> Gruppo di *linkage*

<sup>4</sup> Posizione del QTL in centiMorgan

<sup>5</sup> Statistica F per il QTL

<sup>6</sup> Soglia di significatività 5% *chromosome-wide*

<sup>7</sup> Soglia di significatività 5% *genome-wide*

<sup>8</sup> Proporzione di varianza fenotipica spiegata dal QTL

<sup>9</sup> Intervallo di confidenza 95%

Il secondo QTL significativo interessa la sopravvivenza a 15 giorni, spiega il 6% della varianza fenotipica, ha un intervallo di confidenza che si estende all'intero cromosoma ed è stato collocato, di nuovo tramite PHS, nel LG3.

I QTL putativi per la resistenza all'infezione sono stati associati ai LG 1, 3, 9, 10, 19, tramite PHS e 21 tramite MHS.

Per la sopravvivenza al giorno 7 sono stati evidenziati QTL nei LG 1, 4, 14, 19, 5 e 21; i primi quattro utilizzando la regressione PHS mentre gli altri con MHS. La varianza fenotipica spiegata varia dal 3.5% al 5% e l'intervallo di confidenza generalmente copre tutto il LG.

La regressione PHS ha inoltre collocato i QTL putativi per la sopravvivenza al giorno 15 nei LG 10, 13, 16, 19 mentre quella MHS nei LG 19 e 21. I valori degli intervalli di confidenza sono elevati e la percentuale di varianza fenotipica spiegata oscilla tra il 4% e il 6%.

Il confronto dei risultati ottenuti per diversi tempi di sopravvivenza suggerisce che gli effetti di alcuni loci possano essere maggiori o addirittura esclusivi in fasi specifiche dell'infezione. Per esempio, i QTL collocati nei LG 4, 5 e 14 sono stati evidenziati solo per la sopravvivenza al giorno 7, mentre i QTL dei LG 16 e 12 sono associati solo alla sopravvivenza al giorno 15. È necessario, comunque, tenere presente che questi QTL rappresentano delle ipotesi e potrebbero non trovare conferma. La scoperta di QTL fase-specifici non è inaspettata, i meccanismi di resistenza alle patologie possono infatti comprendere due o più fasi (Koundandè *et al.*, 2008). Una prima linea di difesa potrebbe coinvolgere la risposta immunitaria innata mentre, successivamente, altri meccanismi, ad esempio di risposta adattativa, potrebbero avere un ruolo più rilevante. Un pattern bimodale è stato osservato anche per il gruppo più numeroso di individui analizzato da Antonello e colleghi (2009), rappresentato da un'infezione primaria post

esposizione sperimentale al patogeno e da una secondaria, conseguenza del rilascio di microrganismi dagli animali moribondi o già deceduti.

Gli effetti di alcuni QTL sembrano estendersi per l'intera durata del *challenge* essendo stati individuati per almeno due (QTL nei LG 1, 3, 10) o per tutti i tempi di sopravvivenza considerati, come nel caso dei QTL associati ai LG 19 e 21. Il QTL del LG 19 spiega tra il 7% e il 9% della varianza fenotipica, percentuali elevate per un QTL putativo. Per questo gruppo di *linkage* la famiglia del maschio 147 non ha potuto contribuire all'analisi, essendo il genitore non informativo per i marcatori associati.

Il LG21 raggiunge la significatività *genome-wide* solo per la sopravvivenza al termine del *challenge*, ma viene evidenziato anche ai giorni 7 e 15 di varianza fenotipica.

#### 2.3.3.1 Il marcatore *Id13*

Il LG21, associato alla resistenza alla patologia, presenta dimensioni ridotte e contiene tre marcatori. Esaminando i 23 pesci sopravvissuti alla fine dell'infezione sperimentale, 21 presentano almeno un allele 186 nella posizione del QTL. Tredici di questi animali, tutti con un allele 186, appartengono alla famiglia *full-sib* più numerosa in cui il QTL segrega nel padre 147. Utilizzando una tabella di contingenza e un test chi quadrato di Pearson (Tabella 2.4), è stato individuato il locus *Id13* come possibile marcatore associato alla resistenza alla patologia nella famiglia, con un valore di test di Pearson altamente significativo pari a 10.02 (P value < 0.002). Mentre nessun animale con l'allele paterno 177 è sopravvissuto (n = 62), i 13 individui con l'allele paterno 186 non sono deceduti durante il *challenge*, collegando così l'allele alla resistenza alla fotobatteriosi.

<i>Id13</i> genotype	Dead	Alive	Total
177-188	62	0	62
186-188	75	13	88
Total	137	13	150

**Tabella 2.4** Genotipi alternativi per il marcatore *Id13* e sopravvivenza a challenge terminato degli individui della famiglia full sib più numerosa

Come già detto precedentemente, il locus *Id13* mappa nel LG21, che corrisponde al gruppo RH18 (Sarropoulou *et al.*, 2007). La lunghezza di questo gruppo è di 822.9 cRAD<sub>3000</sub> che, in base allo studio di Senger e colleghi (2006) condotto sull'orata, si traduce in una dimensione di circa 35 megabasi (Mbp) (1 Mpb = 23.48 cRAD<sub>3000</sub>; lunghezza della mappa RH = 18781.14 cRAD<sub>3000</sub>; dimensione del genoma = 800 Mpb). La stima si accorda con il range di dimensione dei cromosomi ortologhi di altre specie ittiche (*Tetraodon nigroviridis* cromosoma 5, 13.3 Mbp; *Gasterosteus aculeatus* cromosoma 2, 23.3 Mbp; *Oryzias latipes* cromosoma 3, 36.6 Mbp; *Danio rerio* cromosoma 7, 76.9 Mbp) e si avvicina molto a quella delle specie aventi una dimensione del genoma simile (*Oryzias latipes*, 700 Mbp). Considerato che i loci *Eid36* e *Hd46* si collocano alle estremità opposte di RH18, il LG21 corrisponde circa a tutto il cromosoma e la sua dimensione ridotta non può essere la conseguenza di una scarsa copertura da parte dei marcatori molecolari. Risulta quindi verosimile l'ipotesi che il cromosoma associato al LG21/RH18 abbia un ridotto tasso di ricombinazione, ulteriormente supportata dai dati derivanti dalla prima mappa di *linkage* basata su un panel di mappatura totalmente non correlato; il LG21 comprendeva 4 loci in *linkage* completo e aveva una lunghezza di zero. Sebbene l'associazione dell'allele 186 al locus *Id13* con una maggiore resistenza alla fotobatteriosi sia certamente indicativa, è probabile sia il risultato di una ridotta ricombinazione nell'intero gruppo di *linkage*. Un basso tasso di ricombinazione nel LG21 rappresenta un vantaggio per la selezione assistita da marcatori, essendo l'associazione tra marcatori genetici e QTL più forte.

D'altra parte, per aumentare l'accuratezza nella mappatura del QTL per la sopravvivenza nel LG21 sarà necessario passare da un'analisi di linkage basata sulle famiglie, a una basata sulla popolazione. A tal proposito, lo schema “*mass-spawing*” per l'identificazione di QTL (Massault *et al.*, 2008) adottato per questo studio ha prodotto una popolazione sperimentale più grande, con oltre 250 famiglie *full-sib* generate da un elevato numero di riproduttori, tutti derivati da popolazioni selvatiche e quindi geneticamente non correlati.

#### **2.3.4 QTL per la crescita**

I QTL associati alla crescita sono riportati in Tabella 2.3. Un QTL significativo *genome-wide* è stato collocato nel LG6, attraverso un'analisi di regressione sia PHS che MHS. La percentuale di varianza fenotipica spiegata oscilla tra il 4%, per MHS e l'8%, per PHS. In totale, 299 animali su 500 derivano da famiglie *half-sib* paterne che segregano per questo QTL, mappato a 11 cM, in accordo con l'analisi PHS e a 19 cM secondo l'analisi MHS. In entrambi i casi l'intervallo di confidenza è molto ampio, non risulta quindi possibile trarre delle conclusioni relative all'esatta posizione. Il risultato è stato confermato dall'analisi della varianza, che ha identificato un QTL associato al LG6 con LRT 15.2, superando la soglia 1% *chromosome-wide*.

Altri due QTL putativi sono stati evidenziati tramite PHS nei LG 8 e 15, collegati ad una percentuale di spiegazione della varianza fenotipica pari, rispettivamente, al 5% e al 4%. Per entrambi i loci gli intervalli di confidenza hanno valori elevati e coprono l'intero gruppo di *linkage*.

#### **2.3.5 QTL per la resistenza alle patologie in acquacoltura**

La scoperta di due QTL significativi e diversi ipotetici associati alla resistenza alla fotobatteriosi in orata può essere aggiunta alla lista dei QTL per la resistenza a diverse patologie, individuati in alcune specie ittiche di interesse per l'acquacoltura.

QTL con effetti importanti, che spiegano un'elevata proporzione della varianza fenotipica (25%-50%), sono stati descritti nel salmone, nella trota e nella platessa (Ozaki *et al.*, 2001; Fuji *et al.*, 2007; Houston *et al.*, 2008), con un numero di marcatori impiegati tra 50 e 80. La percentuale di variazione fenotipica spiegata dai QTL identificati in questo progetto risulta inferiore, variando tra il 2% e il 9%. Utilizzando una densità di marcatori simile a quella di questa ricerca (n = 139), Rodriguez e colleghi (2004) hanno ottenuto valori percentuali simili per i QTL associati alla resistenza alla necrosi ematopoietica infettiva in trota (in media 11%). Un altro studio sulla stessa specie relativo alla necrosi pancreatica infettiva (IPN), sviluppato da Ozaki *et al.* (2007) su 150 animali, ha riportato effetti minori (8%-15%). Inoltre, Moen e colleghi nel 2009 hanno stimato, nel salmone atlantico, una percentuale di variazione fenotipica spiegata dai QTL per IPN pari al 29%, inferiore a quella stimata da Houston *et al.* (2008).

La varietà nella proporzione della varianza fenotipica descritta in questi studi può essere ricondotta alla dimensione del campione; minore è la dimensione della popolazione esaminata, infatti, maggiore risulta la sovrastima dell'effetto del QTL. Quest'ultimo, inoltre, dovrebbe essere più elevato quando vengono presi in considerazione incroci fra linee divergenti (Ozaki *et al.*, 2001) rispetto a popolazioni *outcrossed*, come nel caso di questo studio. Anche la densità dei marcatori ha un ruolo nella capacità di rilevare gli effetti dei QTL (Kolbehdari *et al.*, 2005). Le differenze osservate potrebbero inoltre dipendere dalle caratteristiche biologiche delle specie. In alcune di queste, infatti, un determinato tipo di resistenza può essere influenzata da un gene in particolare mentre, in altre, da numerosi geni con effetti minori.

Una regione genomica frequentemente associata alla suscettibilità alle infezioni, anche nelle specie ittiche, è il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I) (e.g. Grimholt *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2008; Evans & Neff, 2009). La posizione del locus MHCI nei teleostei sembra essere conservata, dato che è

stato possibile mapparlo sui cromosomi omologhi di *G. aculeatus* (Cromosoma 10), *D. rerio* (cromosoma 19), e *O. latipes* (cromosoma 11), corrispondenti in orata ai gruppi RH19/20 e al LG 7. Nonostante MHC I non sia stato ancora mappato in *S. aurata*, è da notare che nessun QTL è stato associato al LG 7.

### **2.3.6 MAS e selezione genomica**

La possibilità di fare miglioramento genetico per la resistenza alle patologie nei pesci è stata dimostrata da Fjalestad e colleghi (2003), sebbene un approccio basato sulla selezione assistita da marcatori risulti essere una soluzione migliore per questo tipo di carattere in cui, per la scelta dei candidati, non può essere considerata alcuna misurazione. I risultati ottenuti dal mappaggio di QTL, anche se non integrati in uno schema di MAS, possono essere sfruttati per scoprire i meccanismi di resistenza all'infezione, identificando delle regioni genomiche che spiegano tratti complessi come la sopravvivenza.

Sonesson e Meuwissen (2009) hanno esaminato la possibilità di fare selezione genomica come strategia di riproduzione selettiva in acquacoltura, approccio che potrebbe risultare particolarmente efficace per caratteri come la resistenza alle patologie, considerando la sua tendenza ad eliminare la richiesta di dati sulla parentela. Le principali conclusioni dei due autori risultano in un più elevato guadagno genetico e in un minor tasso di *inbreeding*. Nonostante questo tipo di selezione potrebbe essere realizzabile nel salmone atlantico, a oggi, una sufficiente informazione genomica *high-throughput* non è altrettanto disponibile per la maggior parte delle specie acquatiche, inclusa l'orata. La selezione genomica in questa specie sembra essere piuttosto distante nel futuro, considerando il numero di marcatori attualmente disponibili, i costi della genotipizzazione di 50-100 K SNP e le spese di sviluppo della strutture richieste per la gestione di strategie riproduttive.

**3. PROFILO DI ESPRESSIONE  
GENICA DELLA RISPOSTA ALLA  
FOTOBATTERIOSI ITTICA IN ORATA**



### 3.1 INTRODUZIONE

L'acquacoltura e la maricoltura sono considerate essere i principali settori destinati a guidare l'incremento delle produzioni animali in Europa e nel mondo. Alla luce del notevole sviluppo che ha interessato queste attività negli ultimi decenni, un particolare interesse è stato rivolto recentemente al sistema immunitario dei teleostei. Lo scopo è quello di far luce sui ruoli che esso ricopre nella risposta delle specie allevate alle patologie e alle condizioni di stress, che caratterizzano in particolar modo gli allevamenti a carattere intensivo.

In questo studio, la tecnologia *microarray* è stata utilizzata per ottenere una visione d'insieme a livello genomico dei meccanismi di risposta alla fotobatteriosi ittica. Questo tipo di approccio permette una più approfondita comprensione delle reti geniche coinvolte nelle interazioni ospite-patogeno, sviluppando così la conoscenza relativa ad un processo biologico fondamentale per le specie allevate. Una serie di studi recenti sul salmone atlantico (Rise *et al.*, 2004; Vanya Ewart *et al.*, 2008), sulla trota arcobaleno (Gerwick *et al.*, 2007; MacKenzie *et al.*, 2008) e sul pesce gatto (Peatman *et al.*, 2007) hanno mostrato come specie ittiche diverse presentino risposte differenti a diversi tipi di batteri. Queste evidenze dovrebbero quindi portare a risposte fisiologiche/immunitarie alternative in vivo, che costituiscono la base per la sopravvivenza dell'organismo.

Come già anticipato in precedenza, Antonello e colleghi (2009) hanno documentato in orata l'esistenza di variabilità genetica per la sopravvivenza a seguito di un'infezione sperimentale con *Phdp* e calcolato l'ereditabilità della resistenza al patogeno (0.12-0.45). Inoltre, in questo progetto di ricerca sono stati evidenziati due QTL significativi e diversi ipotetici associati al medesimo carattere (vedi paragrafo 2.2.3). Vengono di seguito illustrati i risultati ottenuti utilizzando una versione aggiornata della piattaforma *microarray* a oligonucleotidi (60-meri), sviluppata da Ferrareso e colleghi (2008), per l'analisi di espressione genica nel rene cefalico di orata, in seguito ad infezione

sperimentale con *Phdp*. I geni differenzialmente espressi individuati e la posizione dei QTL più significativi per la resistenza alla patologia (vedi paragrafo 2.2.3) sono stati mappati nel genoma completo di *G. aculeatus*, alla ricerca di eventuali co-localizzazioni. I risultati ottenuti rappresentano un punto di partenza per un più accurato mappaggio di QTL, finalizzato all'individuazione di potenziali marcatori per la selezione di linee di animali con aumentata resistenza alla fotobatteriosi.

L'annotazione dei trascritti unici utilizzati per il disegno del *microarray* e l'analisi statistica dei dati sperimentali sono stati svolti in collaborazione con il Norwegian Institute of Food, Fisheries and Aquaculture Research (NOFIMA) di Ås (Norvegia).

### **3.1.1 La tecnologia Agilent**

La tecnologia Agilent produce *microarray* ad elevata densità tramite la sintesi *in situ* di sonde costituite di 60 nucleotidi (60meri); la sintesi degli oligo si basa sulla tecnologia Agilent *SurePrint™* definita anche *inkjet* (a getto di inchiostro) in quanto i singoli nucleotidi vengono depositi tramite il getto di micro gocce (del volume di circa 4 pL) di reagente (Hughes *et al.* 2001). La tecnologia Agilent si dimostra essere molto versatile in quanto permette lo sviluppo di piattaforme *custom* a partire da qualunque set di sonde e concede, inoltre, di adattare sia il protocollo di marcatura dei campioni, come anche la scansione e la procedura di analisi delle immagini, a seconda dei diversi disegni sperimentali. I protocolli di preparazione dei campioni possono, infatti, prevedere l'utilizzo di un singolo fluoroforo (Cy-3; approccio *One-color*) o di due (Cy-3 e Cy-5; approccio *Two-color*); nel primo caso i campioni appartenenti alle due diverse categorie vengono entrambi marcati con Cy-3 e ibridati a due array distinti (ibridazione non competitiva); nel secondo caso, invece, gli stessi campioni vengono marcati con due fluorofori distinti (Cy-3 e Cy-5) e successivamente co-ibridati nello stesso array (ibridazione competitiva).

## 3.2 MATERIALI E METODI

### 3.2.1 Infezione sperimentale, campioni biologici ed estrazione dell'RNA

La popolazione sperimentale per questo studio è stata fornita dall'allevamento ittico "Valle Ca' Zuliani" (Monfalcone, Italia). Le uova fertilizzate, prodotte da un singolo gruppo di riproduttori, sono state raccolte e conservate in un acquario dedicato. Dopo la schiusa, le larve sono state allevate secondo procedure standard e tenute in acquario fino al raggiungimento dei 110 giorni di età (peso 0.4-0.6 g). Successivamente è avvenuto il trasferimento degli individui all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (Legnaro, Italia), per l'infezione sperimentale. Settantotto individui in totale sono stati divisi in due vasche areate, ciascuna con 200 litri di acqua marina ricircolante (salinità 35 ‰), per l'esecuzione di due diversi *challenge*.

Il giorno antecedente all'esposizione al patogeno (*Phdp*), 8 individui (4 per vasca) sono stati campionati casualmente per verificare l'assenza del microrganismo, attraverso la valutazione istologica di rene cefalico, milza e fegato. Inoltre, il DNA totale è stato estratto, seguendo procedure standard, da tutti i campioni di milza per l'esecuzione di un test PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) finalizzato all'eventuale identificazione di *Phdp* (Zappulli *et al.*, 2005).

Complessivamente, 35 individui sono stati esposti al patogeno, per immersione di 30 minuti, in 50 litri di acqua marina areata, contenente  $2.89 \times 10^8$  CFU di un ceppo virulento di *Phdp* (249/ittio99; Zappulli *et al.*, 2005). Successivamente all'esposizione, tutti i pesci sono stati riportati nella vasca di origine. Un altro *challenge* in assenza di patogeno è stato eseguito, seguendo la stessa procedura sperimentale sopra riportata, su 33 pesci appartenenti alla seconda vasca. A 24 e 48 ore dopo l'esposizione, 5 animali raccolti dall'acquario di controllo e da quello realmente infetto sono stati sacrificati con un eccesso di anestetico, per un totale di 20 individui. Da questi animali è stato

prelevato il rene cefalico, conservato in *RNAlater* (Ambion, Austin, Texas) a -20°C fino all'estrazione dell'RNA.

L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit *RNAeasy Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), seguendo le indicazioni del produttore. La concentrazione di ciascun estratto è stata successivamente determinata mediante lettura spettrofotometrica con lo strumento NanoDrop® ND-100 (Nanodrop Technologies, Wilmington, USA). La qualità e l'integrità dell'RNA è stata inoltre stimata con l'utilizzo del 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA); l'*RNA Integrity Number* (RIN), indice che fornisce una determinazione numerica e quindi oggettiva dell'integrità del campione, è stato calcolato per ciascun estratto. Allo scopo di ridurre i bias sperimentali nell'analisi di microarray, solo campioni dotati di RIN superiore a 8 sono stati utilizzati per i successivi esperimenti. Sulla base dei valori di concentrazione e qualità degli RNA, 8 campioni, 4 controlli e 4 infetti a 24 e a 48 ore, sono stati selezionati per la marcatura e l'ibridazione.

### **3.2.2 Progettazione del *microarray* e annotazione funzionale**

La piattaforma *microarray* a oligo-DNA utilizzata per questo studio rappresenta un aggiornamento di quella sviluppata da Ferrarese e colleghi nel 2008. La selezione delle sequenze per il disegno delle sonde è partita dalla clusterizzazione di 67670 EST (*Expressed Sequence Tag*) e di 307 mRNA di *Sparus aurata* presenti in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>). Il set iniziale di trascritti è stato esaminato per escludere la presenza di vettori o elementi ripetuti utilizzando il software RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>) e il *database* di elementi ripetuti relativo alle specie ittiche. Successivamente, le sequenze sono state assemblate attraverso una strategia basata su analisi di Blast (Zhang *et al.*, 2000), per l'identificazione di quelle (*e-value* soglia =  $e^{-10}$ ) da includere nello stesso *cluster* e sull'utilizzo del programma Cap3 (Huang *et al.*, 1999), per effettuarne l'assemblaggio e produrre le sequenze consenso.

Diverse EST sono state considerate appartenere allo stesso *cluster* se sovrapposte per almeno 40 bp, con un'identità della regione sovrapposta di almeno il 90%. L'assemblaggio ha prodotto un set di 26288 diversi *cluster* elaborati nuovamente, mediante la stessa strategia, assieme ai 19734 trascritti unici sviluppati per la prima versione del *microarray* (Ferraresso *et al.*, 2008) per ottenere 26309 nuove sequenze. Allo scopo di ridurre la ridondanza, una nuova clusterizzazione è stata eseguita con il programma cd-hit-est (Li *et al.*, 2006), la sovrapposizione minima della sequenza più corta è stata impostata al 70% e l'identità al 90%. Il numero finale dei differenti *cluster* ottenuti corrisponde a 25125. Le corrispondenze tra l'*accession number* in GenBank e i nomi identificativi per le sonde contenute nel *microarray* sono riportate nel “*Platform data table*” (GPL11489) depositato in GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>).

La procedura di annotazione ha previsto diverse analisi di Blast; inizialmente, le sequenze sono state confrontate con il *database* proteico di uomo di Uniprot (<http://uniprot.org>) e Refseq (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Refseq>) e con quello proteico di zebrafish di Refseq, utilizzando l'opzione blastx (*e-value* soglia =  $e^{-20}$ ). Un'ulteriore ricerca nel *database* nucleotidico *non-redundant* di NCBI (*National Centre for Biochnology Information*) è stata effettuata, attraverso l'opzione blastn (*e-value* soglia =  $e^{-20}$ ), per i trascritti senza corrispondenze con i *database* proteici. I geni differenzialmente espressi evidenziati dalle analisi statistiche dei dati sperimentali sono state inoltre confrontati, utilizzando l'opzione blastx e una soglia di *e-value* meno stringente (*e-value* soglia =  $e^{-5}$ ), con il *database* proteico di uomo e zebrafish di Refseq e con quello proteico dei salmonidi (*Salmo salar* e *Salmo trutta*) di GenBank. Gli allineamenti ottenuti sono stati accuratamente esaminati.

Mediate le proteine di Refseq e Uniprot, il set di geni è stato collegato con la Gene Ontology (GO) (Ashburner *et al.*, 2000) e con InterPro, il *database* delle famiglie multi-geniche (Apweiler *et al.*, 2001), utilizzando rispettivamente l'annotazione di Gene

Ontolgy (<http://www.ebi.ac.uk/GOA>) (Camon *et al.*, 2003) e il sistema Sequence Retrieve (SRS) (Etzold *et al.*, 1996). Le sequenze proteiche umane di Uniprot sono state inoltre utilizzate per l'annotazione dei *pathway* definiti nell' enciclopedia dei geni di Kyoto (KEGG) (<http://www.genome.jp/kegg>) (Ogata *et al.*, 1999). Sequenze e relative annotazioni sono state raccolte nel nostro sistema bioinformatico STARS (Krasnov *et al.*, 2010).

Allo scopo di sviluppare una piattaforma *microarray* ad elevata densità, per ogni trascritto unico associato ad un'annotazione funzionale e con lunghezza superiore a 560 bp sono state disegnate due sonde, in entrambi gli orientamenti; il disegno è stato realizzato per mezzo dell'interfaccia Agilent eArray (<https://earray.chem.agilent.com/earray/>) che ha sfruttato algoritmi di uso esclusivo per il design di sonde costituite da 60 nucleotidi (60meri).

Le sonde sono state quindi sintetizzate *in situ*, utilizzando la tecnologia Agilent *SurePrint*<sup>TM</sup>, per la costruzione di una piattaforma di formato 4x44K che prevede la sintesi di quattro *microarray*, ciascuno costituito di circa 44.000 sonde, in un'unica *slide*. Ciascun *array* include sonde di controllo positivo e negativo.

### **3.2.3 Esperimenti di *microarray***

La marcatura e l'ibridazione di ciascun campione sono state eseguite in accordo al protocollo “*Agilent One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis*”; 500 ng di RNA totale sono stati amplificati e marcati con Cy3-dCTP e una miscela di 10 diversi RNA virali poliadenilati (*Agilent Spike-In Mix*) sono stati inoltre aggiunti a ciascun campione prima dell'amplificazione e marcatura allo scopo di poter monitorare, a posteriori, l'andamento di ciascuna fase dell'esperimento. Il cRNA (RNA complementare) marcato è stato quindi purificato con il kit Qiagen *RNAeasy Mini Kit* e la sua concentrazione, nonché l'attività specifica (pmol Cy3/ $\mu$ g cRNA), sono state valutate allo spettrofotometro NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000. Un totale di 1.650 ng di cRNA

marcato è stato quindi sottoposto a frammentazione, mediante l'aggiunta di 11  $\mu\text{l}$  di *Blocking Agent* (10X) e 2.2  $\mu\text{l}$  di *Fragmentation Buffer* (25X) a cui è seguita un'incubazione a 60°C per 30 min, e diluito per aggiunta di 55  $\mu\text{l}$  di *GE Hybridization buffer* (2X). Un volume totale di 100  $\mu\text{l}$  della soluzione di ibridazione è stato quindi depositato nel microarray, ciascuna slide è stata incubata a 65°C per 17 ore e successivamente sottoposta a lavaggio.

### **3.2.4 Acquisizione e analisi dei dati sperimentali**

Per la scansione degli array è stato utilizzato lo scanner Agilent “G2565BA DNA microarray scanner” ad una risoluzione di 5  $\mu\text{m}$ ; successivamente, il *software Feature Extraction 9.5.1* è stato impiegato per l'analisi delle immagini prodotte.

I risultati sperimentali sono stati elaborati attraverso STARS. I valori stimati per ciascuno spot sono stati filtrati seguendo il criterio  $(I/B) > 8$ , dove I rappresenta l'intensità di segnale mediana e B il *background*, sottratto a I. I campioni sono stati poi suddivisi in base al gruppo di appartenenza e, per ciascun gene, i singoli valori di intensità (I-B) sono stati divisi per il valore medio di tutti i campioni appartenenti allo stesso gruppo, ottenendo così dei rapporti di espressione (ER). La normalizzazione di questi  $\log_2\text{-ER}$  è stata effettuata attraverso una regressione locale ponderata (*Lowess – Locally weighted non-linear regression*). Per l'identificazione dei geni differenzialmente espressi (DEG) tra gli animali infetti e quelli di controllo, a 24 e 48 ore, è stato eseguito il test t di Student. Sono stati considerati differenzialmente espressi in maniera significativa quei geni associati ad un valore di  $p < 0.05$  e con un  $\log_2\text{-ER} \geq |1|$  (due volte), in almeno uno dei punti temporali considerati. I dati di fluorescenza ottenuti e utilizzati per questo studio sono stati depositati nel *database* GEO con *accession number* GSE2665.

### 3.2.5 Validazione dei dati di espressione mediante *Real-time* RT-PCR

Dieci geni *target*, risultati differenzialmente espressi negli esperimenti di *microarray* e un gene *reference* (fattore di elongazione 1-alpha di *Sparus aurata* o EF1-alpha) sono stati selezionati per l'analisi di espressione mediante *Real-time* RT-PCR, prendendo in considerazione il loro ruolo funzionale. Per ciascuno dei geni scelti i *primer* gene-specifici (Appendice 3A) sono stati disegnati con il *software* Primer Express (versione 2.0). Per poter disegnare i *primer* a cavallo di un introne, le giunzioni esone-introne dei trascritti di orata, ove possibile, sono state dedotte sulla base del confronto con le sequenze genomiche di omologhi in specie di teleostei per i quali i genomi sono stati interamente sequenziali e resi pubblici (*F. rubripes*, *T. nigroviridis*, *D. rerio* e *G. aculeatus*).

I campioni testati in *Real-time* RT-PCR sono gli stessi utilizzati negli esperimenti di *microarray*, incluso il calibratore. Cinquecento nanogrammi di RNA totale di ciascun campione è stato retrotrascritto a cDNA utilizzando l'enzima Superscript II (Invitrogen™); un'aliquota (2.5 µl) di cDNA diluito è stato quindi amplificato in un volume totale di 10 µl contenente 5 µl di KAPA SYBR FAST 2X (KAPA Biosystem, Woburn, MA) e 0,25 µl di ciascun *primer* gene-specifico (10 µM). Tutti gli esperimenti sono stati effettuati con lo strumento LightCycler® 480 (Roche Diagnostics); il protocollo di amplificazione ha previsto uno *step* iniziale di 2 min a 95°C, seguito da 45 cicli di 3'' a 95°C e 40'' a 60°C.

Per valutare l'efficienza di ciascun saggio, curve standard sono state costruite amplificando diluizioni seriali (1:2) dello stesso cDNA, utilizzato come calibratore (Mock-d1-17). Il valore di Cp (*Crossing point*) è stato impiegato per determinare la concentrazione relativa dei geni *target* in ciascun campione; tutte le quantificazioni sono state effettuate in duplicato e normalizzate al gene *reference* EF1-alpha (SAPD00802), anch'esso amplificato in doppio. Per la scelta di questo gene sono stati

esaminati 3 candidati comunemente utilizzati come *reference*, calcolando il coefficiente di variazione dei dati sperimentali tra i due gruppi di animali considerati (controlli e infetti). La scelta è ricaduta su EF1-alpha perché ampiamente riconosciuto come un gene *housekeeping* (Zheng *et al.*, 2010) e associato al più basso valore di coefficiente di variazione (CV 18.4%).

L'indice di correlazione tra i dati di espressione di *Real-time* RT-PCR e i *fold-change* (FC) di *microarray* è stato calcolato per ciascun gene, utilizzando il test di correlazione per ranghi di Spearman eseguito con il software SPSS versione 12.0. Valori di probabilità (p-value) inferiori a 0.05 sono stati considerati significativi.

### **3.2.6 Mappatura dei geni differenzialmente espressi in *Gasterosteus aculeatus***

Come descritto nel paragrafo 2.3.1, la maggior parte dei loci presenti nella mappa di *linkage* elaborata in questo studio sono stati localizzati nella mappa RH prodotta da Sarroupolu e colleghi (2007). In particolare, i gruppi di *linkage* 3 e 21, dove sono stati evidenziati i due QTL significativi per la resistenza alla fotobatteriosi, sono stati associati ai gruppi RH 17 e 18, rispettivamente. La corrispondenza tra questi gruppi RH e i cromosomi di *Gasterosteus aculeatus* è stata ricavata dal lavoro di genomica comparativa pubblicato da Sarroupolu e colleghi nel 2008.

I geni differenzialmente espressi, ricavati dai risultati di *microarray*, sono stati confrontati con le proteine di stickleback contenute nel *database* di Ensembl (<http://www.ensembl.org>), mediante analisi di blastx (*e-value* soglia =  $e^{-5}$ ). Le sequenze con un *match* significativo sono state successivamente posizionate nel genoma di *G. aculeatus*, utilizzando il *database* BioMart che si trova in Ensembl.

### 3.3 RISULTATI E DISCUSSIONE

#### 3.3.1 Esito dell'infezione sperimentale

La mortalità è stata monitorata fino al settimo giorno post infezione sperimentale. Al momento del campionamento (24 e 48 ore dopo l'esposizione al patogeno) non sono stati registrati decessi e, della popolazione sperimentale rimanente, 7 individui sono morti prima della fine dell'esperimento mentre 8 sono sopravvissuti. La causa del decesso è stata investigata attraverso una valutazione istologica e l'esecuzione di un test PCR-RFLP per l'identificazione del patogeno, come descritto nel paragrafo 3.2.1. Tutti i campioni esaminati hanno soddisfatto i criteri diagnostici per la fotobatteriosi. Nella popolazione di controllo, sottoposta al *challenge* in assenza di patogeno, non si sono verificati decessi per l'intera durata dell'esperimento. La valutazione istologica e il test PCR-RFLP effettuati per alcuni animali scelti casualmente da questo gruppo hanno confermato l'assenza di *Phdp*.

#### 3.3.2 Sviluppo del *microarray*

L'assemblaggio di tutti i trascritti disponibili di orata, dopo un controllo per la ridondanza dei *cluster*, ha prodotto un totale di 25125 sequenze, di cui 6412 nuove rispetto alla prima versione del trascrittoma (Ferraresso *et al.*, 2008).

Circa il 30% di questi *cluster* (7881) hanno mostrato un *match* significativo, in seguito a blastx, contro una proteina nota di uomo depositata nei *database* pubblici Refseq e Uniprot o contro una proteina nota di zebrafish depositata in Refseq. Un ulteriore incremento nel numero di trascritti annotati è stato ottenuto tramite blastn contro il *database* nucleotidico *non-redundant* di NCBI, arrivando ad un numero complessivo di sequenze di orata associate ad una proteina o ad un trascritto noto pari a 12315 (49%). Per queste e per 9182 trascritti con una lunghezza superiore a 560 bp sono state disegnate due sonde a oligonucleotidi in entrambi gli orientamenti. Il disegno è stato

completato con successo per 21382 sequenze con orientamento senso e 21269 sequenze antisenso, per un totale di 42651 sonde. Le sequenze di ciascuna sonda e altri dettagli della piattaforma *microarray* possono essere visionati nel “*Platform data table*” depositato in GEO (*accession number* GPL11489).

### **3.3.3 Analisi dei dati di espressione genica**

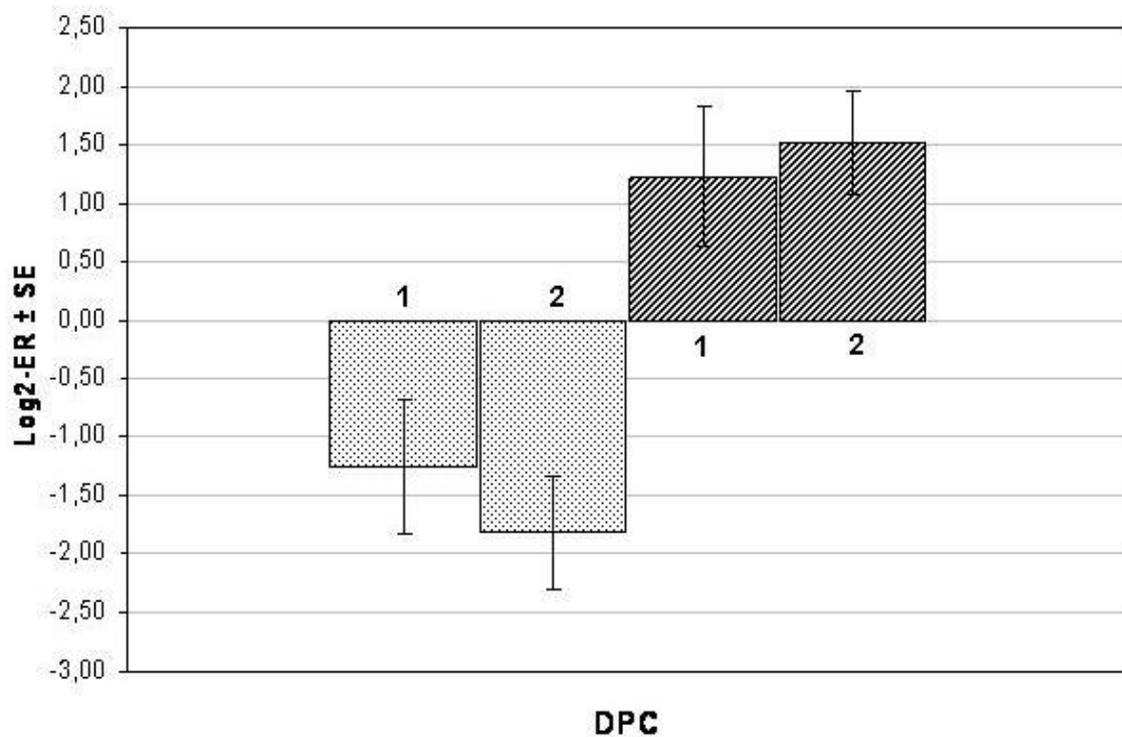
Obiettivo principale di questo studio è stata l’analisi a livello trascrizionale della risposta ad un’ infezione sperimentale, effettuata con un ceppo virulento di *Phdp*.

I livelli di espressione di 21497 trascritti nel rene cefalico, con orientamento senso e antisenso, sono stati confrontati con i valori mostrati dagli animali di controllo, 24 e 48 ore dopo l’esposizione al patogeno. L’utilizzo di animali sottoposti a un *challenge* in assenza del microrganismo ha permesso di ridurre l’influenza degli effetti causati dallo stress da manipolazione durante la pratica di esposizione per immersione.

In seguito alla normalizzazione dei dati, sono stati considerati differenzialmente espressi in maniera significativa quei geni associati ad un valore di  $p < 0.05$  e con un  $\log_2$ -ER (expression ratio)  $\geq |1|$  (due volte), in almeno uno dei punti temporali considerati. Un totale di 415 geni è risultato differenzialmente espresso di cui 293 significativamente sovraespressi e 123 significativamente sottoespressi. A 248 di questi è stato possibile associare un’annotazione funzionale, mediante analisi di blastx contro i *database* di sequenze proteiche (236 in totale, di cui 44 con una soglia di *e-value* meno stringente) o analisi di blastn contro il *database* nucleodico (12 in totale).

Prendendo in esame i primi due giorni del *challenge*, la variazione tra le differenze delle medie dei livelli di espressione osservati nei pesci infetti e nei controlli, a 24 e a 48 ore, è risultata essere significativa ( $p < 0.01$ , T-test). Per il 96% dei geni differenzialmente espressi in entrambi i giorni (complessivamente 40%) è stato osservato un andamento concorde con un aumento dei livelli di espressione nell’82% dei casi. Nonostante il numero dei geni sovraespressi in entrambi i giorni sia maggiore di quello dei

sottoespressi, esaminando i livelli medi di espressione, i trascritti sottoespressi mostrano valori di *fold-changes* più elevati (Figura 3.1).



**Figura 3.1** Livelli medi di espressione dei geni sovraespressi e sottoespressi durante i primi due giorni dopo il *challenge* con *Phdp* (DPC). I dati sono espressi come  $\log_2\text{-ER}$  (expression ratio)  $\pm$  SE

Per i geni differenzialmente espressi sono state effettuate le analisi di arricchimento per le categorie di GO e i *pathway* di KEGG; le categorie funzionali sono state selezionate utilizzando un test chi-quadrato, corretto secondo Yates ( $p < 0.05$ ). I risultati mostrano il coinvolgimento dei DEG principalmente nelle attività mitocondriali, nel ricambio delle proteine, nel metabolismo lipidico, nella risposta immunitaria e nelle attività delle citochine, nella risposta agli stress ossidativi e nei processi di trasduzione del segnale (Tabella 3.1).

Una selezione dei geni differenzialmente espressi più rappresentativi coinvolti nella risposta al patogeno è contenuta nella Tabella 3.2. L'iniziale riconoscimento di particolari molecole associate ai patogeni, come i lipopolisaccaridi, innesca una cascata biochimica che porta all'induzione di citochine pro-infiammatorie e di altri geni con

	No. genes	p Value <sup>a</sup>
<b>Gene ontology</b>		
Cytokine activity	3	0
Fatty acid metabolic process	6	0.0002
Immune response	6	0.0097
Lipid metabolic process	8	0.0226
Mitochondrion	34	0
Protein catabolic process	3	0.0025
Protein folding	9	0
Response to oxidative stress	4	0.0374
Small GTPase mediated signal transduction	7	0.0016
Ubiquitin-dependent protein catabolic process	7	0.0014
<b>KEGG</b>		
Aminoacyl-tRNA biosynthesis	3	0.0025
PPAR signaling pathway	4	0.0348
Pyrimidine metabolism	5	0.0053
Urea cycle and metabolism of amino groups	3	0.0222

<sup>a</sup>Yates' corrected chi square test

**Tabella 3.1** Analisi di arricchimento per le categorie di GO e i *pathway* di KEGG per i geni differenzialmente espressi. Un valore di  $p < 0.05$  è stato adottato come soglia per la selezione delle categorie funzionali significative

ruoli importanti nel sistema immunitario innato e, successivamente, all'attivazione del sistema immunitario adattativo, caratterizzato dal riconoscimento di antigeni specifici. Tutto ciò sfocia nel coordinamento della risposta antibatterica che comprende i *pathway* di trasduzione del segnale e i meccanismi effettori, la neutralizzazione e la pulizia delle tossine esogene ed endogene, dei patogeni, delle cellule danneggiate e dei loro componenti.

Genes	1 DPC	2 DPC
<b><i>Immune response</i></b>		
Bactericidal/permeability-increasing protein precursor	1.87	1.84
Fish-egg lectin	2.97	NS
Lectin	NS	1.93
C-type lectin, superfamily member 14 isoform 2	1.55	1.74
Mannose receptor, C type 2	-1.12	-1.38
Complement component 1, q subcomponent binding protein precursor	0.65	1.35
Major histocompatibility complex class II DAB	NS	2.51
High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I precursor	NS	1.65
CC chemokine	1.28	3.10
Chemokine (C-X-C motif) ligand 12a (stromal cell-derived factor 1)	1.15	1.53
Chemokine-like receptor 1	0.89	1.38
Suppressor of cytokine signaling 3	2.40	NS
Interleukin 10	1.41	1.42
Cytokine receptor family member b9	2.55	1.57
Allograft inflammatory factor 1 isoform 3	NS	1.68
Arginase, type I	NS	3.02
Ornithine decarboxylase mRNA	1.76	1.82
Arginase, type II precursor	2.03	1.62
Spermidine synthase	NS	1.31
Arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	1.30	1.63
Selectin E precursor	1.36	1.68
MER receptor tyrosine kinase precursor	1.44	NS
Annexin A3	0.55	1.38
Adenosine deaminase like	0.46	1.35
FK506-binding protein 1°	0.99	1.66
RAB35, member RAS oncogene family	1.10	0.96
Ras homolog gene family, member G	0.80	1.45
Ras homolog gene family, member F	NS	1.81
<b><i>Globins and iron metabolism</i></b>		
Hepcidin-1 precursor	5.04	3.77
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 9	1.94	1.23
Protoporphyrinogen oxidase	1.06	1.28
Hemoglobin subunit beta	1.10	NS
Zeta globin	1.57	NS
Epsilon globin	1.77	NS
Erythroblast membrane-associated protein precursor	NS	2.45

**Tabella 3.2** Selezione dei geni differenzialmente espressi più rappresentativi coinvolti nella risposta al patogeno, ricavati dal confronto tra i livelli di espressione genica di animali infetti e di controllo nelle prime 48 ore post *challenge* con *Phdp*. I geni significativamente sovraespressi o sottoespressi ( $p < 0.05$ , T-test;  $\log_2ER \geq |1|$ ) sono evidenziati con scale di rosso e di verde, NS sta per non significativo.

Genes	1 DPC	2 DPC
<b><i>Protein degradation</i></b>		
Ubiquitin specific protease 14 isoform b	0.60	1.29
Proteasome activator subunit 2	NS	1.41
Proteasome 26S ATPase subunit 5	NS	2.03
Cathepsin L.1	NS	1.36
Procathepsin L	NS	1.43
Matrix metalloproteinase 9	0.63	1.25
Protease, serine, 23 precursor	NS	-1.44
Nephrosin isoform 1	-0.78	-1.30
Similar to trout ovulatory protein-2	-0.95	-1.63
Alpha 2 type I collagen	NS	-2.19
Alpha 1 type I collagen preproprotein	NS	-2.09
Collagen alpha1 type VI	NS	-1.88
<b><i>Cellular and oxidative stress</i></b>		
Dual specificity phosphatase 1	1.28	NS
Hypoxia induced gene 1	1.22	1.22
Thioredoxin-like 1	0.74	1.40
Peroxiredoxin 1	NS	1.40
Cardiovascular heat shock protein	1.21	NS
Hsp70-interacting protein	NS	1.20
Heat shock 10kDa protein 1	NS	1.33
Heat shock 70kDa protein 9 precursor	1.13	1.66
Chaperonin	NS	2.03
Eukaryotic translation initiation factor 4E	0.61	1.33
MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2b	NS	-1.97
Cytochrome c	1.45	2.03
Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2	-0.45	-2.78
<b><i>Lipid and xenobiotic metabolism</i></b>		
Cytochrome P450, subfamily XIB polypeptide 2 precursor	2.19	NS
Cytochrome P450, subfamily XIA isoform a precursor	1.72	NS
Sulfotransferase family, cytosolic sulfotransferase 6	NS	1.39
Similar to Cyp11a1	2.19	2.64
Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 isoform 2	1.06	1.52
Pparg gene for PPAR gamma	NS	1.58
Acyl-CoA synthetase short-chain family member 1	1.58	1.65
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	0.83	1.66

**Tabella 3.2** Selezione dei geni differenzialmente espressi più rappresentativi coinvolti nella risposta al patogeno, ricavati dal confronto tra i livelli di espressione genica di animali infetti e di controllo nelle prime 48 ore post *challenge* con *Phdp*. I geni significativamente sovraespressi o sottoespressi ( $p < 0.05$ , T-test;  $\log_2ER \geq |1|$ ) sono evidenziati con scale di rosso e di verde, NS sta per non significativo.

Le analisi dei risultati di *microarray* mostrano elevati livelli di espressione per un ampio gruppo di geni coinvolti nella prima risposta immunitaria innata mentre la sola evidenza associata all'immunità acquisita è la sovraespressione della molecole del complesso maggiore di istocompatibilità II, che presenta i peptidi derivati dalle proteine extracellulari e interagisce con le cellule T *helper* CD4<sup>+</sup> (Randelli *et al.*, 2010).

Le lectine sono composti con funzione di difesa, coinvolti nel riconoscimento del patogeno e nell'attivazione della cascata del complemento (Aoki *et al.*, 2008). La via di attivazione delle lectine, diversamente da quella classica, non richiede la presenza di complessi antigene-anticorpo e può essere innescata direttamente dai lipopolisaccaridi (Boshra *et al.*, 2006). Diversamente da tutti gli altri componenti della superfamiglia delle lectine individuati in questo studio, il recettore per il mannosio (MR) è risultato essere regolato negativamente. Questo recettore è principalmente espresso dai macrofagi e dalle cellule dendritiche e si trova coinvolto nel processo omeostatico e nel riconoscimento del patogeno. Il suo legame è stato associato alla riduzione dei livelli delle citochine pro-infiammatorie e alla risoluzione dell'infiammazione (Gazi *et al.*, 2009). La *C1Q binding protein* (C1QBP) è una proteina espressa diffusamente, che interagisce con le teste globulari delle molecole C1Q del complesso C1 del sistema del complemento, inibendo la via di attivazione classica (Ghebrehiwet *et al.*, 2001). La sovraespressione di questo gene è stata riscontrata anche in salmoni atlantici con scarsa resistenza ad *Aeromonas salmonocida*, nel corso di un test di vaccinazione (Škugor *et al.*, 2009). È necessario tuttavia tenere presente che, a oggi, la caratterizzazione strutturale e funzionale della via della lectina e delle proteine C1Q nei teleostei è carente e che, quindi, il ruolo di queste molecole in questi animali è ancora speculativo (Boshra *et al.*, 2006).

Numerose citochine e chemochine hanno mostrato induzione. Le citochine chemiotattiche sono principalmente coinvolte nel reclutamento e nell'attivazione di

linfociti, molecole di adesione e antiossidanti (Aoki *et al.*, 2008). Il soppressore del segnale delle citochine 3 (SOCS3) e l'interleuchina 10 (IL-10) sono entrambi elementi di regolazione della via del segnale di questo gruppo di molecole. La proteina SOCS3, indotta dalle citochine, agisce all'interno di un tipico ciclo di *feedback* negativo finalizzato ad inibire la trasduzione del segnale delle citochine stesse (Wang *et al.*, 2008). L'interleuchina 10 è una citochina di regolazione principalmente coinvolta nella soppressione o nella deattivazione della risposta immunitaria; viene prodotta dai macrofagi e dalle cellule T-*helper* 2 (Th2) e T-regolatrici (TR). Questa proteina riveste un ruolo importante nel processo infiammatorio, inibendo alcune attività dei macrofagi e la produzione di alcune citochine (Randelli *et al.*, 2008). Nel 2007 Pinto e colleghi avevano già evidenziato in branzino la sovraespressione di IL-10, in seguito a un'iniezione intraperitoneale di un ceppo di *Phdp* disattivato dagli UV e il suo coinvolgimento nella risoluzione della risposta infiammatoria.

La sovraespressione dell'interleuchina 10 è connessa con l'induzione dell'arginasi-1, implicata nella sintesi delle poliammine. Le arginasi inducono uno spostamento del metabolismo dell'arginina dalla produzione di ossido nitrico (NO), mediante la sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS), alla produzione di L-ornitina, portando alla sintesi di poliammine attraverso l'enzima ornitina decarbossilasi (Stempin *et al.*, 2010). Le poliammine agiscono come regolatori negativi sui linfociti, sulla motilità dei neutrofili e sull'attività delle cellule *natural killer*. In particolare, la spermidina è stata associata ad una diminuzione nel rilascio di radicali liberi e sostanze ossidative da parte dei leucociti in rene cefalico di orata (Reynes-Becerril *et al.*, 2010). Il *burst* ossidativo rappresenta uno dei più importanti meccanismi battericidi nei pesci, creando un ambiente tossico intracellulare attraverso le specie reattive dell'ossigeno (Ellis, 1999). Le poliammine sono inoltre associate alla sovraespressione dell'epcidina, ormone collegato alla regolazione dell'omeostasi del ferro. L'epcidina blocca la liberazione di ferro da parte

di macrofagi, epatociti ed enterociti, causando una drastica riduzione dei suoi livelli nel plasma; ciò, nel corso di un'infezione, costituisce un potenziale meccanismo di difesa da parte dell'ospite, negando al batterio l'accesso a questo metallo fondamentale (Peatman *et al.*, 2007). È opportuno tuttavia segnalare che il trascritto sovraespresso associato a questo ormone presenta orientamento antisenso. Epcidina a parte, le analisi di *microarray* hanno evidenziato una debole regolazione del metabolismo del ferro. La regolazione negativa della produzione dell'ossido nitrico, con dimostrata attività protettiva nei confronti della fotobatteriosi in giovani orate (Acosta *et al.*, 2004) e la carenza di regolazione delle riserve di ferro potrebbero portare ad un aumento della suscettibilità al patogeno.

Diversi geni coinvolti nella regolazione dell'infiammazione e delle attività antibatteriche sono risultati sovraespressi. La E-selectina è una glicoproteina endoteliale, responsabile della migrazione di neutrofili e monociti e della loro adesione al sito infiammato (Lasky, 1992). Il recettore tirosin chinasi Mer sovrintende al legame dei macrofagi alle cellule apoptotiche e facilita la loro fagocitosi. In topo, il segnale generato porta ad una diminuzione dei livelli sierici del fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), come conseguenza di un *challenge* eseguito con LPS (Behrens *et al.*, 2003). Le annessine (ANXAs) sono state associate ad un'attività antinfiammatoria, ricondotta principalmente alla loro capacità di interferire con l'extravasazione dei neutrofili, dove viene espressa l'ANXA3 (Moss *et al.*, 2004). Proprietà antinfiammatorie sono state evidenziate anche per l'adenosina deaminasi (Kuno *et al.*, 2006). L'immunofillina FK506-*binding protein* 1A è risultata inibente per la via del segnale collegata ai fattori di crescita  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Wang *et al.*, 1996), una famiglia di citochine che, in base al tipo di cellule interessate e alle circostanze, può esercitare degli effetti sia positivi sia negativi sulla proliferazione dei linfociti e sulla capacità di risposta da parte delle citochine (Randelli *et al.*, 2008).

Durante la risposta infiammatoria i processi di trasduzione del segnale rivestono un ruolo fondamentale. Per numerosi membri della superfamiglia delle GTPasi Ras è stata rilevata una sovraespressione. Le GTPasi Rho (*Ras homolog*) regolano molti processi importanti in tutte le cellule eucariotiche, inclusi l'organizzazione del citoscheletro di actina, la trascrizione, la progressione del ciclo cellulare e il traffico di membrana (Kjøller *et al.*, 1999).

La fotobatteriosi porta a un'apoptosi diffusa e sistemica che progredisce in una necrosi secondaria, con conseguente rilascio di molecole citotossiche e danno tissutale (Costa-Ramos *et al.*, 2011). Lo studio dei profili di espressione ha messo in evidenza variazioni per molti geni codificanti per proteine della matrice extracellulare (ECM). I componenti del proteasoma coinvolti nel catabolismo proteico ubiquitina-dipendente, le proteasi lisosomiali catepsine e la metalloproteinasi di matrice (MMP) 9 hanno mostrato induzione. Le MMP rivestono un ruolo importante nel rimodellamento e nella distruzione della matrice extracellulare; in particolare, la MMP 9 può essere coinvolta in un'ampia gamma di processi quali la liberazione dalla ECM di fattori di crescita e citochine e il clivaggio e l'attivazione di queste ultime (Škugor *et al.*, 2008).

Una regolazione negativa è stata osservata per la serina proteasi, coinvolta nella progressione della necrosi (Proskuryakov *et al.*, 2003), ma anche per un membro delle proteine ovariche di trota, con attività inibitoria nei confronti della serina proteasi stessa (Coffman *et al.*, 2000). Anche la metalloproteinasi nefrosina, connessa con gli stadi tardivi di differenziamento dei granulociti, la migrazione cellulare e i processi di infiltrazione tissutale in carpe infettate sperimentalmente e in *zebrafish* (MacKenzie *et al.*, 2008) è risultata sottoespressa. In accordo con il processo di degradazione dei tessuti, numerosi tipi di collagene hanno mostrato una diminuzione nei livelli di espressione.

Lo stress ossidativo è in genere associato alla risposta infiammatoria; non è quindi inaspettata la presenza del termine di GO “*response to oxidative stress*” ad analisi di arricchimento completata. L’eccesso di specie reattive dell’ossigeno è inoltre collegato, più genericamente, allo stress cellulare. Numerosi geni codificanti per proteine coinvolte nella risposta allo stress, come le proteine da shock termico (Hsps), sono risultati indotti; tra questi, anche la proteina *hsp70-interacting*, che agisce come inibente endogeno della Hsp70 (Raynes *et al.*, 2000). L’affidabilità delle Hsp come indicatori di stress, di patologie o di problemi immunitari è stata tuttavia criticata, a causa dell’elevata variabilità dei livelli di espressione registrati a seconda della specie ittica considerata, dei tessuti, della stagione, dello stadio di sviluppo e delle fonti di stress (Iwana *et al.*, 2004). Il fattore eucariotico di inizio 4E (eIF4E) è un componente fondamentale del processo di traduzione e un importante modulatore della crescita e della proliferazione cellulare, coinvolto nella risposta delle cellule allo stress. Considerato che la sua attività viene limitata dalla chinasi *MAP kinase-interacting* (MNK) (Knauf *et al.*, 2001), la sua induzione e la conseguente inibizione di MNK potrebbero rappresentare un’evidenza di stress cellulare.

I mitocondri rivestono un ruolo fondamentale nella determinazione del destino delle cellule sottoposte a stress. Questi organelli sono la fonte dell’ATP, il sito della respirazione cellulare e l’origine di numerosi fattori che promuovono la morte delle cellule (Proskuryakov *et al.*, 2003). I cambiamenti dei livelli di espressione sono risultati in una coordinata induzione dei geni codificanti per le proteine mitocondriali, coinvolte nei processi metabolici e nella sintesi e nel trasporto delle proteine. A conferma, la piruvato deidrogenasi chinasi, regolatore negativo del metabolismo, è sottoespressa.

L’eliminazione delle tossine esogene ed endogene, dei patogeni e dei componenti delle cellule danneggiate costituisce un meccanismo di difesa fondamentale. L’analisi dei dati

ha evidenziato elevati livelli di espressione per un gruppo di geni coinvolti nella detossificazione dei tessuti, molti dei quali appartenenti alla superfamiglia del citocromo P450 (CYP). Gli enzimi CYP-dipendenti hanno un ruolo fondamentale nel metabolismo ossidativo e nella biotrasformazione di un'ampia gamma di composti endogeni ed esogeni (Reynaud *et al.*, 2008). Škugor e colleghi (2009) hanno potuto osservare nei salmoni atlantici una correlazione tra la sovraespressione di questi geni e l'aumentata resistenza ad *Aeromonas salmonicida*.

Un'induzione generale è stata evidenziata per i geni coinvolti nel metabolismo lipidico. Il tessuto adiposo, oltre a ricoprire un ruolo centrale nell'accumulo e nel rilascio di energia, è anche coinvolto nelle attività del sistema immunitario e nel mantenimento dell'omeostasi, mediante la modulazione di proliferazione, differenziamento e apoptosi cellulare (Škugor *et al.*, 2010).

In accordo con quanto osservato da MacKenzie e colleghi (2008), l'induzione dei geni per le globine suggerisce l'attivazione del processo di emopoiesi, potenzialmente di eritropoiesi, meccanismo standard della risposta immunitaria non specifica nei pesci.

Le analisi dei risultati di *microarray* hanno mostrato un tipo di risposta all'infezione associata principalmente ai più immediati meccanismi del sistema immunitario innato che prevedono il riconoscimento del patogeno, la prima linea di difesa dell'ospite e risposte di tipo metabolico e stress-correlate. È presente, inoltre, una considerevole attivazione dei processi antinfiammatori allo scopo di controllare gli eccessivi danni collaterali ai tessuti dovuti alla risposta dell'ospite. La significativa predominanza di molecole antinfiammatorie, però, sembrerebbe provocare una riduzione dell'efficacia dei meccanismi immunitari responsabili dell'eliminazione del patogeno.

### 3.3.4 Validazione mediante *Real-time* RT-PCR

Allo scopo di validare i dati degli esperimenti di *microarray*, saggi di espressione in *Real-time* RT-PCR sono stati effettuati su un set di 10 geni, risultati essere differenzialmente espressi. I geni *target* per le analisi di PCR quantitativa (qPCR) sono stati selezionati tenendo in considerazione il loro potenziale ruolo nella risposta all'infezione causata da *Phdp*, preferendo quelli con presunta attività antimicrobica e associati a valori di *fold-change* (FC) relativamente elevati. Di questi geni, 9 sono risultati essere sovraespressi in seguito a infezione sperimentale mentre uno, la metalloproteinasi nefrosina, risulta essere sottoespresso. La correlazione tra i dati di qPCR e di *microarray* è stata calcolata confrontando i valori di espressione di ciascun gene *target* in tutti i campioni. Per quasi tutti i geni esaminati è stato ottenuto un coefficiente di correlazione positivo e statisticamente significativo (Tabella 3.3), la sola eccezione è rappresentata dalla metalloproteinasi di matrice 9 cui è stata associata una probabilità marginale ( $p = 0.06$ ).

		<b>Spearman's rho</b>
<b>SAPD ID</b>	<b>Gene Name</b>	
SAPD01350	Adenosine deaminase like	0.691(**)
SAPD01593	Annexin A3	0.668(**)
SAPD24516	Arginase, type II precursor	0.909(**)
SAPD27978	Bactericidal/permeability-increasing protein precursor	0.774(**)
SAPD24692	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12a	0.615(*)
SAPD00386	Interleukin 10	0.956(**)
SAPD23115	Matrix metalloproteinase 9	0.482
SAPD25191	Nephrosin isoform	0.535(*)
SAPD18557	<i>Paralichthys olivaceus</i> ornithine decarboxylase mRNA	0.788(**)
SAPD06058	Suppressor of cytokine signaling 3	0.776(**)

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

**Tabella 3.3** Correlazione tra i valori di espressione rilevati in *Real-time* RT-PCR e i dati sperimentali di *microarray*

Correlando tutti i *fold-change*, calcolati sui dati sperimentali di qPCR e di *microarray* per il gruppo dei controlli e degli infetti, risulta un coefficiente positivo e statisticamente significativo (Spearman's  $\rho=0.688$ ,  $p<0.00001$ ) nonostante, plottando i risultati associati a entrambi i metodi di analisi, sia possibile notare una più elevata sensibilità da parte della qPCR nella stima dei FC. Questa evidenza potrebbe essere giustificata dalle ridotte differenze tra i due gruppi sperimentali nei livelli di espressione che, con la sola eccezione della sonda SAPD06058, oscillano da 1.3 a 4 volte. Un difetto di accuratezza della tecnologia di *microarray* per geni associati a bassi livelli di alterazione viene comunemente riconosciuto. Solitamente, un cambiamento dei livelli di espressione di almeno 2 volte è considerato il limite sotto al quale i dati di *microarray* e di qRT-PCR cominciano a non correlare più (Morey *et al.*, 2006). Nel complesso, tuttavia, i dati ottenuti dalla PCR quantitativa confermano l'affidabilità dei risultati ottenuti con l'analisi di *microarray*.

### 3.3.5 Confronto tra geni differenzialmente espressi e genoma di *G. aculeatus*

Utilizzando la mappa RH di orata (Sarroupolu *et al.*, 2007), è stato possibile identificare gli omologhi dei LG3 e 21 nel genoma di *G. aculeatus*, rispettivamente, i cromosomi IX e II. Dei 415 geni differenzialmente espressi, 237 hanno mostrato un *match* significativo, in seguito a blastx, contro una proteina nota di stickleback depositata nel *database* pubblico Ensembl e sono stati successivamente posizionati nel genoma di *G. aculeatus* (tabella 3.4). Come previsto, la distribuzione dei geni nel genoma è piuttosto omogenea. Rispettivamente, 6 e 9 geni sono stati localizzati, per comparazione, nei cromosomi II e IX di stickleback. Questi geni, che apparentemente si collocano nelle stesse regioni dei QTL significativi, rappresentano un punto di partenza per raffinare la localizzazione dei QTL qui identificati e potrebbero rappresentare dei potenziali marcatori per la selezione di linee di animali maggiormente resistenti alla fotobatteriosi.

<i>Gasterosteus aculeatus</i> Group	N. SAPD DEG
1	11
2	6
3	13
4	12
5	15
6	13
7	21
8	6
9	9
10	9
11	14
12	15
13	5
14	6
15	11
16	5
17	11
18	7
19	5
20	16
21	6
<b>Scaffold</b>	21
<b>Tot. SAPD</b>	237

**Tabella 3.4**

Approccio genomico comparativo. Numero di geni differenzialmente espressi in orata corrispondenti a ciascun cromosoma di *Gasterosteus aculeatus*

## **4. CONCLUSIONI GENERALI**



Nonostante l'acquacoltura abbia fatto enormi progressi arrivando a proporre un prodotto di elevata qualità e a prezzi contenuti, rimangono ancora importanti problemi da risolvere come, per esempio, l'elevata mortalità degli stadi giovanili causata da malattie diverse malattie patologiche infettive. Un approccio promettente per controllare le infezioni è rappresentato dalla selezione, attraverso l'utilizzo di marcatori genetici, di linee di animali più resistenti ai patogeni, che permetterebbe la riduzione dei costi di allevamento e renderebbe meno frequenti gli interventi farmacologici, garantendo un prodotto di migliore qualità.

Obiettivo di questo programma di ricerca è stato l'identificazione, negli stadi giovanili di orata, di loci genetici coinvolti nella determinazione della resistenza alla fotobatteriosi ittica, o in stretta associazione fisica con essi, mediante un approccio genomico integrato.

La crescente importanza di *Sparus aurata* come specie di allevamento ha prodotto una serie di strumenti genomici che hanno dato un contributo fondamentale anche allo sviluppo di questo progetto. Attraverso la genotipizzazione di 151 marcatori microsatelliti in 500 animali, parte di una più ampia popolazione sperimentale utilizzata da Antonello e colleghi (2009) per la stima dell'ereditabilità della resistenza alla fotobatteriosi, è stato possibile individuare due QTL significativi e diversi ipotetici associati al medesimo carattere. I dati ottenuti sono inoltre stati utilizzati per elaborare una seconda versione della mappa di *linkage*, precedentemente sviluppata da Franch e colleghi (2006).

La linea di ricerca basata sulla genomica strutturale è stata integrata da uno studio di genomica funzionale, che ha previsto l'aggiornamento della piattaforma *microarray* precedentemente sviluppata da Ferraresso e colleghi (2008). Il piano sperimentale ha incluso lo studio di campioni di rene cefalico raccolti durante un'infezione sperimentale, effettuata con un ceppo altamente virulento di *P. damselae* subsp. *piscida*.

Sono stati analizzati i profili di espressione genica di 2 diversi gruppi di esemplari: animali di controllo e animali infetti, sottoposti a un *challenge* rispettivamente in assenza e in presenza di patogeno. Le analisi dei dati di *microarray* hanno evidenziato un tipo di risposta all'infezione associata principalmente ai più immediati meccanismi del sistema immunitario innato e una considerevole attivazione dei processi antinfiammatori, che ridurrebbero l'efficacia dei meccanismi immunitari responsabili dell'eliminazione del patogeno. I geni differenzialmente espressi individuati e la posizione dei QTL più significativi per la resistenza alla patologia sono stati mappati nel genoma completo di *G. aculeatus*, alla ricerca di eventuali co-localizzazioni. L'integrazione dei dati ottenuti dalla mappatura di QTL con quelli derivati dall'analisi dei profili di espressione genica della risposta all'infezione forniscono una migliore comprensione delle basi genetiche proprie del carattere qui considerato. I risultati di questo studio rappresentano una base importante per l'identificazione di potenziali marcatori per il monitoraggio della capacità di difesa immunitaria degli animali e per la selezione di linee con aumentata resistenza alla fotobatteriosi.

## BIBLIOGRAFIA

Acosta F, Vivas J, Padilla D, Vega J, Bravo J, Grasso V, Real F. **Invasion and survival of photobacterium damsela subsp. piscicida in non-phagocytic cells of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L.** *J Fish Dis* 2009, **32(6)**: 535-41.

Acosta F, Ruiz de Galarreta CM, Ellis AE, Díaz R, Gómez V, Padilla D, Real F. **Activation of the nitric oxide response in gilthead sea bream after experimental infection with *Photobacterium damsela subsp. piscicida*.** *Fish Shellfish Immunol* 2004, **16(5)**: 581-588.

Amos W, Sawcer SJ, Feakers RW, Rubinstein DC. **Microsatellites Show Directional Bias and Heterozigote Instability.** *Nature genetics* 1996, **13**: 390-391.

Andersson L. **Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals.** *Nature Reviews Genetics* 2001, **2**: 130-138.

Antonello J, Massault C, Franch R, Haley C, Pellizzari C, Bovo G, Patarnello T, de Koning DJ, Bargelloni L. **Estimates of heritability and genetic correlation for body length and resistance to fish pasteurellosis in the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.).** *Aquaculture* 2009, **298(1-2)**: 29-35.

Aoki T, Takano T, Santos M, Kondo H, Hirono I. **Molecular innate immunity in teleost fish: review and future perspectives.** *Fisheries for Global Welfare and Environment*, 5th World Fisheries Congress 2008, 263-276.

Aoki T. **Drug-resistance plasmids from fish pathogens.** *Microbiological Science* 1988, **5**: 219-223.

Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Birney E, Biswas M, Bucher P, Cerutti L, Corpet F, Croning MD, Durbin R, Falquet L, Fleischmann W, Gouzy J, Hermjakob H, Hulo N, Jonassen I, Kahn D, Kanapin A, Karavidopoulou Y, Lopez R, Marx B, Mulder NJ, Oinn TM, Pagni M, Servant F, Sigrist CJ, Zdobnov EM. **The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites.** *Nucleic Acid Res* 2001, **29**: 37-40.

Arabaci M, Yilmaz Y, Ceyhun SB, Erdogan O, Dorlay HG, Diler I, Akhan S, Kocabas M, Ozdemir K, Koyun H, Koncagul S. **A Review on Population Characteristics of Gilthead Seabream (*Sparus aurata*).** *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2010, **9(6)**: 976-981.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G. **The Gene Ontology Consortium.** *Nat Genet* 2000, **25**: 25-29.

Bakopoulos V, Peric Z, Rodger H, Adams A, Richards R.H. **First Report of Fish Pasteurellosis from Malta.** *Aquatic Animal Health* 1997, **9**: 26-33.

Bakopoulos V, Adams A, Richards RH. **Some biochemical properties and antibiotics sensitivities of *Pasteurella piscicida* isolated in Greece and comparison with strains from Japan, France and Italy.** *Journal of Fish Diseases* 1995, **18**: 1-7.

Baptista T, Romalde JL, Toranzo AE. **First epizootic of pasteurellosis in Portugal affecting cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*).** *Bulletin of the European Association of Fish Pathology* 1996, **1**: 92-95.

Behrens EM, Gadue P, Gong SY, Garrett S, Stein PL, Cohen PL. **The mer receptor tyrosine kinase: expression and function suggest a role in innate immunity.** *Eur J Immunol* 2003, **33(8)**: 2160-2167.

Boschi I, Randelli E, Buonocore F, Casani D, Fausto AM, Scapigliati G. **Transcription of T cell-related genes in teleost fish, and the european sea bass (*Dicentrarchus labrax*) as a model.** *Fish & Shellfish Immunol* 2010, doi:10.1016/j.fsi.2010.10.001.

Boshra H, Li J, Sunyer JO. **Recent advances on the complement system of teleost fish.** *Fish & Shellfish Immunol* 2006, **20(2)**: 239-262.

Brown RC, Woolliams JA, McAndrew BJ. **Factors influencing effective population size in commercial populations of gilthead seabream, *Sparus aurata*.** *Acquaculture* 2005, **247**: 219-225.

Brown TA. **Genomi.** Edises Edizioni, Napoli 2004.

Camon E, Barrell D, Brooksbank C, Magrane M, Apweiler R. **The Gene Ontology Annotation (GOA) Project--Application of GO in SWISS-PROT, TrEMBL and InterPro.** *Comp Funct Genomics* 2003, **4(1)**: 71-4.

Canario AVM, Bargelloni L, Volckaert F, Houston RD, Massault C, Guiguen Y. **Genomics Toolbox for Farmed Fish.** *Reviews in Fisheries Science* 2008, **16**: 3–15.

Candan A, Kucuker M.A, Karatas S. **Pasteurellosis in cultured seabass (*Dicentrarchus labrax*) in Turkey.** *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists* 1996, **16**: 150-153.

Castro J, Pino A, Hermida M, Bouza C, Chavarrías D, Merino P, Sánchez L, Martínez P. **A microsatellite marker tool for parentage assessment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*).** *Aquaculture* 2007, **272S1**: S210–S216.

Cataudella SP, Perin R, Sola L. **A chromosome study of eight Mediterranean species of Sparidae (*Pisces, Perciformes*).** *Genetica* 1980, **54**: 155–9.

Ceschia G, Quaglio F, Giorgetti G, Bertoja G, Bovo G. **Serious outbreak of pasteurellosis (*Pasteurella piscicida*) in euryhaline species along the Italian coasts.** *Abstracts 5th International Conference of the European Association of Fish Pathologists*, Budapest, Hungary, 1991, p.26.

Clark MS, Smith SF, Elgar G. **Use of the Japanese pufferfish (*Fugu rubripes*) in comparative genomics.** *Mar Biotechnol* 2001, **3**:S130-40.

Coffman MA, Pinter JH, Goetz FW. **Trout ovulatory proteins: site of synthesis, regulation, and possible biological function.** *Biol Reprod* 2000, **62(4)**: 928-938.

Costa-Ramos C, Vale AD, Ludovico P, Dos Santos NM, Silva MT. **The bacterial exotoxin AIP56 induces fish macrophage and neutrophil apoptosis using mechanisms of the extrinsic and intrinsic pathways.** *Fish Shellfish Immunol* 2011, **30(1)**: 173-181.

Crollius HR. **The tetraodon genome.** *Genome Dyn* 2006, **2**:154-64.

Crosetti D, Sola L, Allegrucci G, Libertini A. **Genetica in acquacoltura. Acquacoltura responsabile.** S. Cataudella e P. Bronzi (editori), Unimar-Uniprom 2001, Roma.

Dekkers JCM, Hospital F. **The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations.** *Nature Reviews Genetics* 2002, **3**: 22-32.

Dunham, RA. **Aquaculture and fisheries biotechnology – genetic approaches.** CABI publishing, Oxford 2004.

do Vale A, Silva MT, dos Santos NM, Nascimento DS, Reis-Rodrigues P, Costa-Ramos C et al. **AIP56, a novel plasmid-encoded virulence factor of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* with apoptogenic activity against sea bass macrophages and neutrophils.** *Mol Microb* 2005, **58(4)**: 1025-38.

do Vale A, Marques F, Silva MT. **Apoptosis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) neutrophils and macrophages induced by experimental infection with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*.** *Fish & Shellfish Immunol* 2003, **15**(2): 129-44.

Duchesne P, Godbout M, Bernatchez L. **PAPA (package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation.** *Molecular Ecology Notes* 2002, **2**: 191-193.

Ellis AE. **Immunity to bacteria in fish.** *Fish Shellfish Immunol* 1999, **9**:291-308.

Etzold T, Ulyanov A, Argos P. **SRS: information retrieval system for molecular biology data banks.** *Methods Enzymol* 1996, **266**: 114-28.

Evans ML, Neff BD. **Major histocompatibility complex heterozygote advantage and widespread bacterial infections in populations of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).** *Molecular Ecology* 2009, **18**: 4716–4729.

Falconer D.S. **Introduction to quantitative genetics – second edition.** Longman group limited, London 1981.

FAO Fishery Statistic (2006). **Fisheries and Aquaculture topics. Introduction of species.** [http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus\\_aurata/en](http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Sparus_aurata/en), gennaio 2011.

Farkas J, Olah J. **Occurrence of *Pasteurella* and *Streptococcus* in sheatfish (*Silurus glanis* L.) and common carp (*Cyprinus carpio* L.).** *Proceedings of the International Seminar on Fish*, J. Olah, K. Molnar, Z. Jeney (editori), 1981.

Ferraresso S, Vitulo N, Mininni AN, Romualdi C, Cardazzo B, Negrisolo E, Reinhardt R, Canario AVM, Patarnello T, Bargelloni L. **Development and validation of a gene expression oligo microarray for the gilthead sea bream (*Sparus aurata*).** *BMC Genomics* 2008, **9**: 580.

Fjalestad KT, Gjedrem T, Gjerde B. **Genetic-Improvement of Disease Resistance in Fish - an Overview.** *Aquaculture* 1993, **111**: 65–74.

Fouz B, Toranzo EA, Milan M, Amaro C. **Evidence that water transmits the disease caused by the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *Damsela*.** *Journal of Applied Microbiology* 2000, **88**: 531-535.

Franch R, Louro B, Tsalavouta M, Chatziplis D, Tsigenopoulos CS, Sarropoulou E, Antonello J, Magoulas A, Mylonas CC, Babbucci M, Patarnello T, Power DM, Kotoulas G, Bargelloni L. **A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L.** *Genetics* 2006, **174**: 851-61.

Fuji K, Hasegawa O, Honda K, Sakamoto T, Okamoto N. **Marker-assisted breeding of a lymphocystis disease-resistant Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*).** *Aquaculture* 2007, **272**: 291–5.

Friars GW. **Transfer of breeding technology from terrestrial agriculture to aquaculture.** *Bulletin of the aquaculture association of Canada* 1998, **98(3)**: 5-8.

Gauthier G, Lafay B, Ruimy R, Breittmayer V, Nicolas J, Gauthier M, Christen R. **Small subunit rRNA sequences and whole DNA relatedness concur for the reassignment of *Pasteurella piscicida* to the genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *Piscicida*.** *Internat Journ of System Bacteriol* 1995, **45**: 139-144.

Gazi U, Martinez-Pomares L. **Influence of the mannose receptor in host immune responses.** *Immunobiology* 2009, **214(7)**: 554-561.

Gerwick L, Corley-Smith G, Bayne CJ. **Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus.** *Fish & Shellfish Immunol* 2007; **22**:157-171.

George AW, Visscher PM, Haley CS. **Mapping quantitative trait loci in complex pedigrees: a two-step variance component approach.** *Genetics* 2000, **156**: 2081–92.

Ghebrehiwet B, Lim BL, Kumar R, Feng X, Peerschke EI. **gC1q-R/p33, a member of a new class of multifunctional and multicompartmental cellular proteins, is involved in inflammation and infection.** *Immunological Reviews* 2001, **180**: 65-77.

Gjedrem T. **Selection and breeding programs in aquaculture.** Springer, The Netherlands 2005.

Gjedrem, T. **Genetic improvement of cold-water fish species.** *Aquaculture research* 2000, **31**: 25-33.

Gjedrem, T. **Selective breeding to improve aquaculture production.** *World aquaculture* 1997, **28(1)**: 33-45.

Grimholt U, Larsen S, Nordmo R, Midtlyng P, Kjoeglum S, Storset A, Saebø S, Stet RJ. **MHC polymorphism and disease resistance in Atlantic salmon (*Salmo salar*); facing pathogens with single expressed major histocompatibility class I and class II loci.** *Immunogenetics* 2003, **55**: 210–9.

Goldstein DB, Ruiz-Linares A, Cavalli-Sforza LL, Feldman MW. **An Evaluation of genetic distances for use with Microsatellite loci.** *Genetics* 1995, **139**: 463-471.

Hanif A, Bakopoulos V, Leonardos I, Dimitriadis GJ. **The effect of seabream (*Sparus aurata*) broodstock and larval vaccination on the susceptibility by *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and on the humoral immune parameter.** *Fish Shellfish Immunology* 2005, **19**: 345-361.

Hastein T, Bullock GL. **An acute septicemic disease of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*) caused by Pasteurella-like organism.** *Journal of Fish Biology* 1976, **8**: 23-26.

Hawke JP, Thune RL, Cooper RK, Judice E, Kelly-Smith M. **Molecular and phenotypic characterization of strains of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from hybrid striped bass cultured in Louisiana, USA.** *Journal of Aquatic Animal Health* 2003, **15(3)**: 189-201.

Hawke JP. **Pathogenesis and virulence of *Pasteurella piscicida* in hybrid striped bass (*Morone saxatilis* x *Morone chrysops*).** *International symposium on Aquatic Animal Health*, Seattle, Washington, 1994.

Houston RD, Haley CS, Hamilton A, Guy DR, Tinch AE, Taggart JB, McAndrew BJ, Bishop SC. **Major Quantitative Trait Loci Affect Resistance to Infectious Pancreatic Necrosis in Atlantic Salmon (*Salmo salar*).** *Genetics* 2008, **178**: 1109–15.

Huang X, Madam A. **CAP3: a DNA sequence assembly program.** *Genome Res* 1999; **9**: 868-77.

Hughes TR, Mao M, Jones AR, Burchard J, Marton MJ, Shannon KW, Lefkowitz SM, Ziman M, Schelter JM, Meyer MR, Kobayashi S, Davis C, Dai H, He YD, Stephaniants SB, Cavet G, Walker WL, West A, Coffey E, Shoemaker DD, Stoughton R, Blanchard AP, Friend SH, Linsley PS: **Expression profiling using microarrays fabricated by an ink-jet oligonucleotide synthesizer.** *Nat Biotechnol* 2001, **19**:342-7.

Iwama GK, Afonso LO, Todgham A, Ackerman P, Nakano K. **Are hsps suitable for indicating stressed states in fish?** *J Exp Biol* 2004, **207(Pt 1)**: 15-19.

Janssen WA, Surgalla MJ. **Morphology, physiology and serology of *Pasteurella* species pathogenic for white perch (*Roccus americanus*).** *Journal of Bacteriology* 1968, **96(5)**: 1606-1610.

Johnson NA, Vallejo RL, Silverstein JT, Welch TJ, Wiens GD, Hallerman EM, Palti Y. **Suggestive association of major histocompatibility IB genetic markers with resistance to bacterial coldwater disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Marine Biotechnology* 2008, **10**: 429–37.

Jones MW, Cox DI. **Clinical disease in seafarmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) associated with a member of the family *Pasteurellaceae* – a case history.** *Bulletin of the European Association of Fish pathologists* 1999, **19**: 75.

Jørgensen SM, Afanasyev S, Krasnov A. **Gene expression analyses in Atlantic salmon challenged with infectious salmon anemia virus reveal differences between individuals with early, intermediate and late mortality.** *BMC Genomics* 2008, **9**: 179.

Karaiskou N, Triantafyllidis A, Katsares V, Abatzopoulos TJ, Triantaphyllidis C. **Microsatellite variability of wild and farmed populations of *Sparus aurata*.** *J Fish Biol* 2009, **74(8)**:1816-25.

Kawahara E, Kusuda R. **Location of *Pasteurella piscicida* antigens in tissues of yellowtail *Seriola quinqueradiata* vaccinated by immersion.** *Bullet of the Jap Soc of Scient fisher* 1997, **54**: 1101-1105.

Kjøller L, Hall A. **Signaling to rho GTPases.** *Exp Cell Res* 1999, **253(1)**: 166-179.

Knauf U, Tschopp C, Gram H. **Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2.** *Mol Cell Biol* 2001, **21(16)**: 5500-5511.

Knott SA, Elsen JM, Haley CS. **Methods for multiplemarker mapping of quantitative trait loci in half-sib populations.** *Theoretical and Applied Genetics* 1996, **93**: 71–80.

Kolbehdari D, Jansen GB, Schaeffer LR, Allen BO. **Power of QTL detection by either fixed or random models in halfsib designs.** *Genetics, Selection, Evolution* 2005, **37**: 601–14.

Koudandé OD, Thomson PC, Bovenhuis H, Iraqi F, Gibson JP, van Arendonk JAM. **Biphasic survival analysis of trypanotolerance QTL in mice.** *Heredity* 2008, **100**: 407–14.

Krasnov A, Timmerhaus G, Afanasyev S, Jørgensen SM. **Development and assessment of oligonucleotide microarrays for Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* 2010, doi:10.1016/j.cbd.2010.04.006.

Kubota SS, Kimura M, Egusa S. **Studies of a bacterial tuberculoidosis of the yellowtail. Symptomatology and histopathology.** *Fish Pathology* 1970, **4**: 111–118.

Kuhl H, Sarropoulou E, Tine M, Kotoulas G, Magoulas A, Reinhardt R. **A Comparative BACMap for the Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata* L.).** *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011, doi:10.1155/2011/329025.

Kuno M, Seki N, Tsujimoto S, Nakanishi I, Kinoshita T, Nakamura K, Terasaka T, Nishio N, Sato A, Fujii T. **Anti-inflammatory activity of non-nucleoside adenosine deaminase inhibitor FR234938.** *Eur J Pharmacol* 2006, **534(1-3)**: 241-249.

Lai L (2001). **Genetic markers for aquatic domestication and selective breeding programs. Biotechnology-aquaculture interface: the site of maximum impact workshop.** [www.nps.ars.usda.gov/static/arsoibiotecws2001/contributions/Lai.htm](http://www.nps.ars.usda.gov/static/arsoibiotecws2001/contributions/Lai.htm), gennaio 2011.

Lasky LA. **Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation.** *Science* 1992, **258(5084)**: 964-969.

LeBlanc F, Laflamme M, Gagné N. **Genetic markers of the immune response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) to infectious salmon anemia virus (ISAV).** *Fish & Shellfish Immunology* 2010, **29**: 217-232.

Lewis DH, Crumbles LC, McConnell S, Flowers AI. ***Pasteurella*-like bacteria from an epizootic in menhaden and mullet from Galveston bay.** *Journal of Wildlife Diseases* 1970, **6**: 160-163.

Li W, Godzik A. **Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences.** *Bioinformatics* 2006; **22(13)**:1658-9.

MacKenzie S, Balasch JC, Novoa B, Ribas L, Roher N, Krasnov A, Figueras A. **Comparative analysis of the acute response of the trout, *O. mykiss*, head kidney to in vivo challenge with virulent and attenuated infectious hematopoietic necrosis virus and LPS-induced inflammation.** *BMC Genomics* 2008, **9**:141.

Magariños B, Romalde JL, Barja JL, Nunez S, Toranzo AE. **Protection of gilthead seabream against pasteurellosis at the larval stages.** *Bulletin of the European Association of Fish Pathology* 1999, **19**: 159-161.

Magariños B, Toranzo AE, Romalde JL. **Phenotypic and pathobiological characteristics of *Pasteurella piscicida*.** *Annual review of fish diseases* 1996a, **6**: 41-64.

Magariños B, Romalde JL, Noya M, Barja JL, Toranzo AE. **Adherence and invasive capacities of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*.** *FEMS Microbiol Lett* 1996b, **138(1)**: 29-34.

Magariños B, Bonet R, Romalde JL, Martínez MJ, Congregado F, Toranzo AE. **Influence of the capsular layer on the virulence of *Pasteurella piscicida* for fish.** *Microb Pathog* 1996c, **21(4)**: 289-97.

Magariños B, Pazos F, Santos Y, Romalde JL, Toranzo AE. **Response of *Pasteurella piscicida* and *Flexibacter maritimus* to skin mucus of marine fish.** *Diseases of Aquatic Organisms* 1995, **21**: 103-108.

Magariños B, Romalde JL, Barja JL, Toranzo AE. **Evidence of a dormant but infective state of the fish pathogen *Pasteurella piscicida* in seawater and sediment.** *Applied and Environmental Microbiology* 1994a, **60**: 180-186.

Magariños B, Romalde JL, Lemos ML, Barja JL, Toranzo AE. **Iron uptake by *Pasteurella piscicida* and its role in pathogenicity for fish.** *Appl Environ Microbiol* 1994b, **60(8)**: 2990-8.

Magariños B, Romalde JL, Santos Y, Casal JF, Barja JL, Toranzo AE. **Vaccination trials on gilthead seabream (*Sparus aurata*) against *Pasteurella piscicida*.** *Aquaculture* 1994c, **120**: 201-208.

Magariños B, Santos Y, Romalde JL, Rivas C, Barja JL, Toranzo AE. **Pathogenic activities of live cells and extracellular products of the fish pathogen *Pasteurella piscicida*.** *J Gen Microbiol* 1992, **138(12)**: 2491-8.

Massault C, Franch R, Haley C, de Koning DJ, Bovenhuis H, Pellizzari C, Patarnello T, Bargelloni L. **Quantitative trait loci for resistance to fish pasteurellosis in gilthead sea bream (*Sparus aurata*).** *Animal Genetics* 2010, doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02110.x

Massault C, Bovenhuis H, Haley C, de Koning DJ. **QTL mapping design for aquaculture.** *Aquaculture* 2008, **285**: 23-29.

Matsuyama T, Fujiwara A, Nakayasu C, Kamaishi T, Oseko N, Tsutsumi N, Hirono I, Aoki T. **Microarray analyses of gene expression in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* leucocytes during monogenean parasite *Neoheterobothrium hirame* infection.** *Dis Aquat Organ* 2007, **75(1)**: 79-83.

Meiri I, Gothilf Y, Zohar Y, and Elizur A. **Physiological changes in the spawning gilthead seabream, *Sparus aurata*, succeeding the removal of males.** *Journ of Experiment Zool* 2002, **292**: 555–564.

Miller KM, Maclean N. **Teleost microarrays: development in a broad phylogenetic range reflecting diverse applications.** *Journal of Fish Biology* 2008, **72**: 2039–2050.

Miller KM, Winton JR, Schulze AD, Purcell MK, Mling TJ. **Major histocompatibility complex loci are associated with susceptibility of Atlantic salmon to infectious hematopoietic necrosis virus.** *Environmental Biology of Fishes* 2004, **69**: 307–16.

Moen T, Baranski M, Sonesson AK, Kjøglum S. **Confirmation and fine-mapping to infectious pancreatic necrosis in Atlantic salmon (*Salmo salar*): population-level associations between markers and trait.** *BMC Genomics* 2009, **10**: 368.

Morey JS, Ryan JC, VanDolah FM. **Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR.** *Biol Porced Online* 2006, **219(2)**: 201-215.

Moss SE, Morgan RO. **The annexins.** *Genome Biol* 2004, **5(4)**: 219.

Noga EJ. **Fish Disease. Diagnosis and Treatment.** *Mosby-Year Book Inc*, Missouri 1996.

Noya M, Magariños B, Toranzo AE, Lamas J. **Sequential pathology of experimental pasteurellosis in gilthead seabream *Sparus aurata*. A light- and electron-microscopic study.** *Diseases of Aquatic Organisms* 1995a, **21(3)**: 177-86.

Noya M, Magariños B, Lamas J. **Interactions between peritoneal exudate cells (PECs) of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *Pasteurella piscicida*. A morphological study.** *Aquaculture* 1995b, **131(1-2)**: 11-21.

Ogata H, Goto S, Sato K, Fujibuchi W, Bono H, Kanehisa M. **KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.** *Nucleic Acids Res* 1999, **27(1)**: 29-34.

Ozaki A, Khoo SK, Yoshiura Y, Ototake M, Sakamoto T, Dijkstra JM, Okamoto N. **Identification of additional quantitative trait loci (QTL) responsible for susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus in rainbow trout.** *Fish Pathology* 2007, **42**: 131-40.

Ozaki A, Sakamoto T, Khoo S, Nakamura K, Coimbra MRM, Akutu T, Okamoto N. **Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPN) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Molecular Genetics and Genomics* 2001, **265**: 23-31.

Park KC, Osborne JA, Montes A, Dios S, Nerland AH, Novoa B, Figueras A, Brown LL, Johnson SC. **Immunological responses of turbot (*Psetta maxima*) to nodavirus infection or polyriboinosinic polyribocytidylic acid (pIC) stimulation, using expressed sequence tags (ESTs) analysis and cDNA microarrays.** *Fish & Shellfish Immunology* 2009, **26**: 91-108.

Peatman E, Baoprasertkul P, Terhune J, Xu P, Nandi S, Kucuktas H, Li P, Wang S, Somridhivej B, Dunham R, Liu Z. **Expression analysis of the acute phase response in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) after infection with a Gram-negative bacterium.** *Developmental and Comparative Immunology* 2007, **31**: 1183-1196.

Pepitone C, Massari F, Thomas M. **I pesci delle acque costiere italiane.** L'EPOS 1995.

Pinto RD, Nascimento DS, Reis MIR, do Vale A, dos Santos NMS. **Molecular characterization, 3D modelling and expression analysis of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-10.** *Molecular Immunol* 2007, **44(8)**: 2056-2065.

Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. **Necrosis: a specific form of programmed cell death?** *Exp Cell Res* 2003, **283(1)**: 1-16.

Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G. **Cell markers and determinants in fish immunology.** *Fish & Shellfish Immunol* 2008, **25(4)**: 326-340.

Rassman K, Schlotterer C, Tautz D. **Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-base DNA fingerprinting.** *Electrophoresis* 1991, **12**: 113-118.

Ravagnan G. **Vallicoltura integrata.** Edagricole 1992, Bologna.

Raynes DA, Guerriero V. **Isolation and characterization of isoforms of HspBP1, inhibitors of Hsp70.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1490(1-2)**: 203-207.

Refstie, T. **Application of breeding schemes.** *Aquaculture* 1990, **85**: 163-169.

Reyes-Becerril M, Ascencio-Valle F, Tovar-Ramírez D, Meseguer J, Esteban MA. **Effects of polyamines on cellular innate immune response and the expression of immune-relevant genes in gilthead sea bream leucocytes.** *Fish Shellfish Immunol* 2010, doi:10.1016/j.fsi.2010.10.011.

Reynaud S, Raveton M, Ravanel P. **Interactions between immune and biotransformation systems in fish: a review.** *Aquat Toxicol* 2008, **87(3)**: 139-145.

Rise ML, Jones SR, Brown GD, von Schalburg KR, Davidson, WS, Koop BF. **Microarray analyses identify molecular biomarkers of Atlantic salmon macrophage and hematopoietic kidney response to *Piscirickettsia salmonis* infection.** *Physiol Genomics* 2004, **20**: 21–35.

Roberge C, Páez DJ, Rossignol, O, Guderley H, Dodson J, Bernatchez, L. **Genome-wide survey of the gene expression response to saprolegniasis in Atlantic salmon.** *Mol Immunol* 2007, **44**: 1374–1383.

Rodriguez F, LaPatra S, Williams S, Famula T, May B. **Genetic markers associated with resistance to infectious hematopoietic necrosis in rainbow trout and**

steelheads trout (*Oncorhynchus mykiss*) backcrosses. *Aquaculture* 2004, **241**: 93–115.

Romalde J. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* : An integrated view of a bacterial fish pathogen. *Int Microbiol* 2002, **5**: 3-9.

Sarropoulou E, Nousdili D, Magoulas A, Kotoulas G. **Linking the genomes of nonmodel teleosts through comparative genomics.** *Mar Biotechnol* 2008, **10(3)**: 227-233.

Sarropoulou E, Franch R, Louro B, Power DM, Bargelloni L, Magoulas A, Senger F, Tsalavouta M, Patarnello T, Galibert F, Kotoulas G, Geisler R. **A gene-based radiation hybrid map of the gilthead sea bream *Sparus aurata* refines and exploits conserved synteny with *Tetraodon nigroviridis*.** *BMC Genomics* 2007, **7**:8:44.

Sarropoulou E, Kotoulas G, Power DM, Geisler R. **Gene expression profiling of gilthead sea bream during early development and detection of stress-related genes by the application of cDNA microarray technology.** *Physiol Genomics* 2005, **23**: 182-191.

Schlötterer C, Tautz D. **Slippage synthesis of simple sequence DNA.** *Nucleic Acids Research* 1992, **20**: 211-215.

Senger F, Priat C, Hitte C, Sarropoulou E, Franch R, Geisler R, Bargelloni L, Power D, Galibert F. **The first radiation hybrid map of a perch-like fish: the gilthead seabream (*Sparus aurata* L).** *Genomics* 2006, **87**: 793-800.

Škugor S, Škugor A, Todorčević M, Torgersen J, Ruyter B, Krasnov A. **Exposure to lipopolysaccharide induces immune genes in cultured preadipocytes of Atlantic salmon.** *Fish Shellfish Immunol* 2010, **29(5)**: 817-824.

Škugor S, Jørgensen SM, Gjerde B, Krasnov, A. **Hepatic gene expression profiling reveals protective responses in Atlantic salmon vaccinated against furunculosis.** *BMC Genomics* 2009, **10**: 503.

Škugor S, Glover KA, Nilsen F, Krasnov A. **Local and systemic gene expression responses of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) to infection with the salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*).** *BMC Genomics* 2008, **9**: 498.

Snieszko SF, Bullock GL, Hollis E, Boone JG. ***Pasteurella* sp. from an epizootic of white perch (*Roccus americanus*) in Chesapeake Bay tidewater areas.** *Journal of Bacteriology* 1964, **88**: 1814-1815.

Sonesson AK, Meuwissen T. **Testing strategies for genomic selection in aquaculture breeding programs.** *Genetics selection evolution* 2009, **41**: 37.

Stempin CC, Dulgerian LR, Garrido VV, Cerban FM. **Arginase in parasitic infections: macrophage activation, immunosuppression, and intracellular signals.** *J Biomed Biotechnol* 2010, **2010**: 683485.

Takeda H. **Draft genome of the medaka fish: a comprehensive resource for medaka developmental genetics and vertebrate evolutionary biology.** *Dev Growth Differ* 2008, **1**: S157-66.

Tave, D. **Genetics for fish hatchery managers – 2nd edition.** Van Norstrand Reinhold, New York 1993.

Teh C, Parinov S, Korzh V. **New ways to admire zebrafish: progress in functional genomics research methodology.** *Biotechniques* 2005, **38**: 897-906.

Toranzo AE, Magariños B, Romaldo JL. **A review of the main bacterial fish diseases in mariculture system.** *Aquaculture* 2005, **246**: 37-61.

Toranzo AE, Barreiro S, Casal JF, Figueras A, Magariños B, Barja JL. **Pasteurellosis in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata*): first report in Spain.** *Aquaculture* 1991, **99**: 1-15.

Tung MC, Tsai SS, Ho LF, Huang ST, Chen SC. **An acute septicemic infection of Pasteurella organism in pond-cultured Formosa snake-head fish (*Channa maculata* Lacepede) in Taiwan.** *Fish Pathology* 1985, **20**: 143-148.

Van Muiswinkel WB, Wiegertjes GF, Stet RJM, 1999. **The influence of environmental and genetic factors on the disease resistance of fish.** *Aquaculture* 1999, **172**: 103–110.

Vanya Ewart K, Williams J, Richards RC, Gallant JW, Melville K, Douglas SE. **The early response of Atlantic salmon (*Salmo salar*) macrophages exposed in vitro to *Aeromonas salmonicida* cultured in broth and in fish.** *Dev Comp Immunol* 2008, **32**: 380–390.

Waldbieser GC, Wolters WR. **Application of polymorphic microsatellite loci in a channel catfish, *Ictalurus punctatus*, breeding program.** *Journal of the world aquaculture society* 1999, **30**: 256-262.

Wang T, Secombes CJ. **Rainbow trout suppressor of cytokine signalling (SOCS)-1, 2 and 3: Molecular identification, expression and modulation.** *Molecular Immunol* 2008, **45(5)**: 1449-1457.

Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Donahoe PK. **The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors.** *Cell* 1996, **86(3)**: 435-444.

Wynne JW, O’Sullivan MG, Stoned G, Cooka MT, Nowak BF, Lovell DR, Taylor RS, Elliott NG. **Resistance to amoebic gill disease (AGD) is characterised by the transcriptional dysregulation of immune and cell cycle pathways.** *Developmental and Comparative Immunology* 2008, **32**: 1539–1560.

Zappulli V, Patarnello T, Patarnello P, Frassinetti F, Franch R, Manfrin A, Castagnaro M, Bargelloni L. **Direct identification of *Photobacterium damsela* subspecies *piscicida* by PCR-RFLP analysis.** *Diseases of Aquatic Organisms* 2005, **65(1)**: 53-61.

Zhang Z, Schwartz S, Wagner L, Miller W. **A greedy algorithm for aligning DNA sequences.** *J Comput Biol* 2000; **7(1-2)**: 203-14.

Zheng W, Sun L. **Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real time RT-PCR analysis of gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*).** *Fish & Shellfish Immunol* 2010, doi:10.1016/j.fsi.2010.12.014.



## *APPENDICI*



## APPENDICE 2A

Lista dei 151 marcatori microsatelliti utilizzati per lo studio di QTL: nome del locus, sequenze dei primer forwar e reverse, lunghezza dell'amplicone e temperatura di annealing dei primer

Locus name	Accession number	Forward primer	Reverse primer	PCR length	T°
<i>Ad05</i>	DQ851244	TGATCACACTCTATACAGGCTC	GTGTGCCATTTTCTCCA	136	54
<i>Ad21</i>	DQ851241	TTCACACACTCCCTCCTTC	GAAGACAGCACCACCGAGAC	216	54
<i>Ad54</i>	DQ851243	AGCCACTTAGGTGCATTCAA	TTGTACACAGTGTCCAGAAATA	227	54
<i>Ad66</i>	DQ851245	ACGAAGCTGTTGGT GAGTCT	GACGACTTCTCTGACGG	153	54
<i>Ad75</i>	DQ851246	CAGACGAGAGAGGGACTTGG	ATCTCCTGTGAGGCTGAGA	213	54
<i>Ad86</i>	DQ851248	TTCTCCCTCCTCTCCACTCA	CCTGCTTCTCTATGCCTCG	165	54
<i>Bd06</i>	DQ851259	GGCTGTAAAACCTGCTGCACCTGG	CCTGAAACAAGCCGGACTCTC	248	58
<i>Bd08</i>	DQ851260	CCACCTCGTTCTCCATCT	CATCATGTTGTGCTCCTCAGTGG	174	54
<i>Bd14</i>	DQ851261	TGCAGTGTCAAGGAAAAACCA	GCCATTATCAATCACTAACATGC	237	54
<i>Bd36</i>	DQ851264	AGGTTTCTCTGCTGTCTGCC	TCCCTCCTCTTTCATTTCCA	110	54
<i>Bd54</i>	DQ851266	CACGATGAACTATCAATACTCTGC	CCCACCTCTGTTTATGCGGT	118	54
<i>Bd58</i>	DQ851267	CAGCGATGAGTAAGCCAGAGT	ACAATCCCAATCTCGCTGC	233	54
<i>Bd63</i>	DQ851269	GTGCCTCGCCTGTAATGTTT	TGGGGGTGAGAATGAGATGT	238	54
<i>Bd68</i>	DQ851270	CAGATCATGACTCAGGGGC	GGACCAGAACCAGGACAGG	104	54
<i>Bd75</i>	DQ851273	GCAGACAGGCTTGAGTGACA	GCAGTTCAATACACGGCACA	188	58
<i>Bd77</i>	DQ851274	TTTGTGTGACACGTTGGTTC	TCGTAGTACAGTGTGTGTTGGC	162	54
<i>Bl04</i>	DQ851276	TCCGTGACTCTGTCTACCA	TCTTTGTCCGCATGTTTAC	114	54
<i>Bl09</i>	DQ851277	CCAGGGAGAGCTTTCATCTT	GCGTTAAATGCATAAACAGCTAAG	119	54
<i>Bl10</i>	DQ851278	TCTCCACCACCTGCAGTTTT	ACCGCCATCTTTGCTCTTTA	212	54
<i>Bl15</i>	DQ851279	CACCAATCACTCGGCTTAC	GCAGCTAAAAGCTACTGGGAGA	162	54
<i>Bl18</i>	DQ851280	GTGATGCGCTCTGGGTTTTA	CTTTCCTCTCCCGTCTCTC	90	54
<i>Bl36</i>	DQ851281	GAGGACAACTGTTGAAAAACG	AGGCCAGACGAGTGGTCA	201	54
<i>Bl39</i>	DQ851282	CTCCTGCTGCTGAACTCCT	GCATAGCGCGTACCACAAAAGT	210	54
<i>Bl43</i>	DQ851283	AATGGAATGTCATGGGAGA	CCTCACCTAGCAGGAAGC	115	54
<i>Bt14</i>	DQ851293	ACTCCTCTGATCACTCCCGC	TTGCCACATATGCCATTATGAG	122	58
<i>Bt34</i>	DQ851294	GCGTGAATAATCAGCTCGGAG	ATTCGCGGTCAGGATTGACA	170	54
<i>Cld03</i>	DQ851301	CGTTCATGGATGATGACTCAG	TGAGCTCATGGCTAACTGTG	101	54
<i>Cld10</i>	DQ851302	GGCGGGACACAGTGAGATAG	TCTCGCTCTCTTGCCTTTC	165	54
<i>Cld11</i>	DQ851303	TACCGGTGACAGATGTGAGTC	AACACCTCCTGTATGTTTG	214	54
<i>Cld14</i>	DQ851304	ATGTGAGTGCACACGTGGAG	TGTGAAGCGTGGTTAGCAAG	162	54
<i>Cld21</i>	DQ851305	CAAGTCACACACACGCACAC	ACAACGAAGGACGACAAAAGG	107	58
<i>Cld24</i>	DQ851306	GAGGAGCAGATCCCTCACTG	CCACAGCAAAAGAGGAAGAGA	216	54
<i>Cld26</i>	DQ851307	CTTCTGCTGCTGTTGTTTCTG	CACAAACCAGTTCACAAAGAGC	202	54
<i>Cld29</i>	DQ851308	GTCCGATTTTCCGATGTTGT	CTGCAGGGAGGAAACAAGAC	159	54
<i>Cld32</i>	DQ851310	GGCGTCTGTCTGACTGCAT	GCTGTCATCTGTAAGCTGCAT	155	54
<i>Cld44</i>	DQ851312	AGGTCCGTGGTGTGACTGAT	TCGTCCACTGATTTCTGACG	160	54
<i>Cld48</i>	DQ851313	TGAATCTGACGCTCTTACGG	AAGCATGTTTACGGGTACG	105	54
<i>Cld52</i>	DQ851314	AGTGGGGAGGATCTCTGGAT	GCTTCGGTCTGAAAGAGGAA	151	54
<i>Cld65</i>	DQ851315	TCAATGACACCCAGAGGACA	CGTGGATGGCACAATATAGG	219	54
<i>Cld71</i>	DQ851316	CAACGCGGTGAAGACTACCT	GCTCAGTGTGTTGACAGAAAATG	105	54
<i>Cld84</i>	DQ851317	CCGCTGAAAGCCGTATCTAT	GCCTTACTGCATTAGGGATTACA	163	54
<i>Dd10</i>	DQ851322	TTCTTTCTCAGGACACTGGC	ATAGGGACAGGAGCTGAGGC	100	58
<i>Dd16</i>	DQ851323	CACATTTAGGGCACCATATCC	GGGAATCTCTGTCTGTCTGG	92	54
<i>Dd41</i>	DQ851324	ATGGCCCTGTGTGTCTAGA	GCTGAAGCTCGCCTTATGAC	206	54
<i>Dd56</i>	DQ851326	GTTGTGCTGGTAGTGCTGGA	AGCCCTGACACTCCCTCATA	208	54
<i>Dd63</i>	DQ851328	GGCGAAAATACAGATGCAGA	CGCAGAGATGGTAGAGGCA	298	54
<i>Dd77</i>	DQ851330	GTGATGAGGACAATGATGCG	GACCAGTGGGGTGATGTTTC	147	54
<i>Dd84</i>	DQ851331	AACAGATCGGACCGAGGAC	TGGTGAATTATCACTCCGGG	168	54
<i>Did03</i>	DQ851333	CACATCCAAAAGCCTCATTT	GTCCGGATGAGCTTTGAGT	119	54
<i>Did04</i>	DQ851334	TGTGATCTGCAGGGAGAGA	GTCTTGTGGTGATCGTTGG	155	58
<i>Did07</i>	DQ851335	CGCGACAACAGTCAGGAGTA	CAGACGCACACAGAAACACA	98	54
<i>Did09</i>	DQ851336	GCGGCAAAATTAATCCACAT	GGGGTCAGAAGAACCTGACA	159	54
<i>Did14</i>	DQ851338	AGATTGGCCTGTGATCCTTG	GTACAAACCATCCCGCTGTC	101	54

## APPENDICE 2A

Lista dei 151 marcatori microsatelliti utilizzati per lo studio di QTL

Locus name	Accession number	Forward primer	Reverse primer	PCR length	T°
<i>Did16</i>	DQ851339	AGGTTGTAGATCGGAGTGTGA	AATCAAACGTTGCTCCGAGT	117	54
<i>Did19</i>	DQ851341	CTCTGCCAGTCTTGTGGTT	CCCCCTGTATCGTCACAT	215	54
<i>Did22</i>	DQ851342	GCCTTTGCAACAAGCCTTTA	GGTGATGTGGGAGTGAGAT	215	54
<i>Did24</i>	DQ851343	GCTTCACTGACCCTGAGACA	GGCTGAAAACGTGGTTTTGT	114	54
<i>Did31</i>	DQ851345	CATGGGACCACTGGGAACTA	TCATTTGGGGCTCTCATTTT	152	54
<i>Ed01</i>	DQ851349	TTGGCTATGCTTGCAGAATG	TGTCAACAGGAGGTGTATC	234	54
<i>Ed02</i>	DQ851350	CTGGGCTGAAAGGAGTGTGC	GAAACAGGGATGGTAAACG	215	54
<i>Ed31</i>	DQ851351	CTGAAGCGGAGAGATTGAGG	AACATCTGTCTGGACTCAACC	163	54
<i>Eld02</i>	DQ851354	TGGACAAACAATCAAGTCG	CCTCCTCATGATGGTAAGC	160	54
<i>Eld04</i>	DQ851355	CACCTCTGCAGAGGTGTGA	GGAGACCGAGGCTGGTATAA	113	54
<i>Eld05</i>	DQ851356	TGAGCAGTCTTTGAGCTCTCC	GCCATAGAGCAGGACTGGAC	159	54
<i>Eld06</i>	DQ851357	TGTGGTTGTAAACAAGCAT	TATTTACGCCCCATGTGTA	215	54
<i>Eld08</i>	DQ851358	TCCACGTGTTTCTGTTGAC	CACACAACAAGCAGAGAGACG	167	54
<i>Eld11</i>	DQ851360	AGAGACGAACCGAAGAGCTG	GCAGAAGAGAGACGAGTTACCA	166	54
<i>Eld14</i>	DQ851362	ACACTGACCTCCCATCAAC	CACCTGCAGAGTTGCTCAG	153	54
<i>Eld17</i>	DQ851363	GGGGAAGTGACACACGTTTT	CTCTGCGGCAGTGTGATTT	206	54
<i>Eld36</i>	DQ851364	CGGAATGACTGATGCTAGTGG	GATTTGTGAGAACGGGCTGT	117	54
<i>Eld37</i>	DQ851365	TTGTTGTAGGCGGTGATGTG	CAGAGGCATCAGGAGTAAACG	167	58
<i>Eld38</i>	DQ851366	TGAGTTCATGCACCCTCTGA	TGTCATTCTGTCGGAGGAGA	207	54
<i>Eld39</i>	DQ851367	GTCGGAGAGGAGAGCTGAAA	CACACACTCCGCTTTATCTGA	204	54
<i>Eld41</i>	DQ851368	CACAGATCCCATCGTTTTGT	ACGACCTCAACCTCATAACGC	119	54
<i>Fd48</i>	DQ851374	ACAGCCAGAGGACTGGAGAG	GACAAGGGGACAGGAGTGAG	215	58
<i>Fd78</i>	DQ851375	TGCTCAGAGAAAGTTACAGCAG	GACAGGTATGAGCACAACGG	107	54
<i>Fd81</i>	DQ851377	AAATGTGCTTTCCGAGCTGT	CTCAACTGAGCCCTCTGTCC	159	54
<i>Gd46</i>	DQ851380	CCACAGGTTTATCCCCAG	GGAGGGAATTATGCAGAGGG	110	54
<i>Gd64</i>	DQ851382	CCTGAGGAGTTTACAACCC	CATTTACTGCCATTTGCTGAA	100	54
<i>Hd10</i>	DQ851389	GGCAGGATAGACAGTCAAGG	GTTCCGCTGATTGATGGGAGT	115	54
<i>Hd15</i>	DQ851390	TCATGCGCACTTTCTTCATT	ATAAATCACCCAAACCCCTCC	162	54
<i>Hd28</i>	DQ851393	ACTGCGGTTGCTTGCTCT	GCAGAAGCAGTAATGGTGCAT	168	58
<i>Hd39</i>	DQ851395	ATTGAAAAGTTTTGCCGCGAG	AGACAGACACATGACCAGC	120	54
<i>Hd49</i>	DQ851398	TCAGTGATTTGTGCATGCTG	TGCAGCAAGGAGACAGGTAA	156	54
<i>Hd70</i>	DQ851399	AGCAACCGGCTTCTTTTAT	GAACACCTGGATGGAAGAGG	157	58
<i>Hd91</i>	DQ851401	AAAGAACAGCAGGAACGACC	AATGAAGCGGAGGAAAGTT	169	58
<i>Id39</i>	DQ851407	GCACCAAACAGACAGCTGAA	GAAAAGGGAGGATCGGTGT	103	58
<i>Bd26</i>	FN811852	GACTGAAACCTCAACCCTGT	TTTGACACCACTCAGACGA	193	54
<i>Bd33</i>	FN811853	CATCGCAGGTCTGTTGAAAC	GCCACTGATGCCAGCTTAG	148	54
<i>Bd52</i>	FN811854	CAGTTTTGCTGTTTCATGCCTT	ACTGTGGTTGCCCTCTATGC	171	54
<i>Bld22</i>	FN811855	TGCCAGTCTGTGAGTGCAA	AACAACCAAGGAGTAGCTGTG	155	54
<i>Bld37</i>	FN811856	AGTTGCCGTGTGATTTCTT	CATGTGCACGATTGTGTCTG	118	54
<i>Cld12</i>	FN811857	ACGAACCAGGACTGCAACAT	GAGCTGTGGTGTGTTGTGTC	210	54
<i>Cld38</i>	FN811858	TATCAAGTCGGTCCCTCAC	GATCTCCAAGGTCCATGTGC	105	54
<i>Cld45</i>	FN811859	GCTTGCTTTATTGTCTGTCTCG	TCCTCCATCTACCTACACGTCA	210	54
<i>Cld49</i>	FN811860	ACCTCGTCAGCGATCCATAC	GGCTGCCACTAGTTTCTGTC	116	54
<i>Cld93</i>	FN811861	CCCAACAACCCGTTCCAG	CACCTGGGTCATTAGCTGTG	201	54
<i>Did02</i>	FN811862	CACACAACAGAAAACCTGAGAGG	GAAGCTCGACTGTGCTGTG	120	54
<i>Did10</i>	FN811863	TGTGTGTGAGAGGACGTATGC	ATCGGCGACGTTGAAAAAT	107	54
<i>Did13</i>	FN811864	TGAGCTTCACTCAAATGGTC	GGTCTCTATGGCAGCCGTTA	218	54
<i>Did23</i>	FN811865	GCATTAAGCTCCTCCTGGTT	CCTGATGGCACCCCTCATT	202	54
<i>Did69</i>	FN813189	GTGGGAGCTCTGCTGGAG	TCTCTATCGCCTCCTTCTCG	233	54
<i>Did70</i>	FN813190	TGACTGTAGAACGCTGCAA	CCTAGCTGCAACCATCCACT	230	54
<i>Did71</i>	FN811866	ACTGTGTTTCTGCCTTTGC	TGCTGTCTCCTCCCTCTACC	173	54
<i>Did74</i>	FN813192	ATGACCCATCAAAGCTGCTC	CGTTTACCTCAGACCTCAGCA	170	54
<i>Ed22</i>	FN811867	AACTACAGTGTGTCAGGGTG	TTCCACACTCTCTGCGTC	170	54
<i>Ed35</i>	FN811868	TCACAGAGTGGACCAGGTT	AGCACATGGGAAGGTAATGAA	115	54
<i>Eld03</i>	FN811869	ACCTTATCAGCTGCGCACAC	AGGATCTGCCAGGGTAAAC	220	54

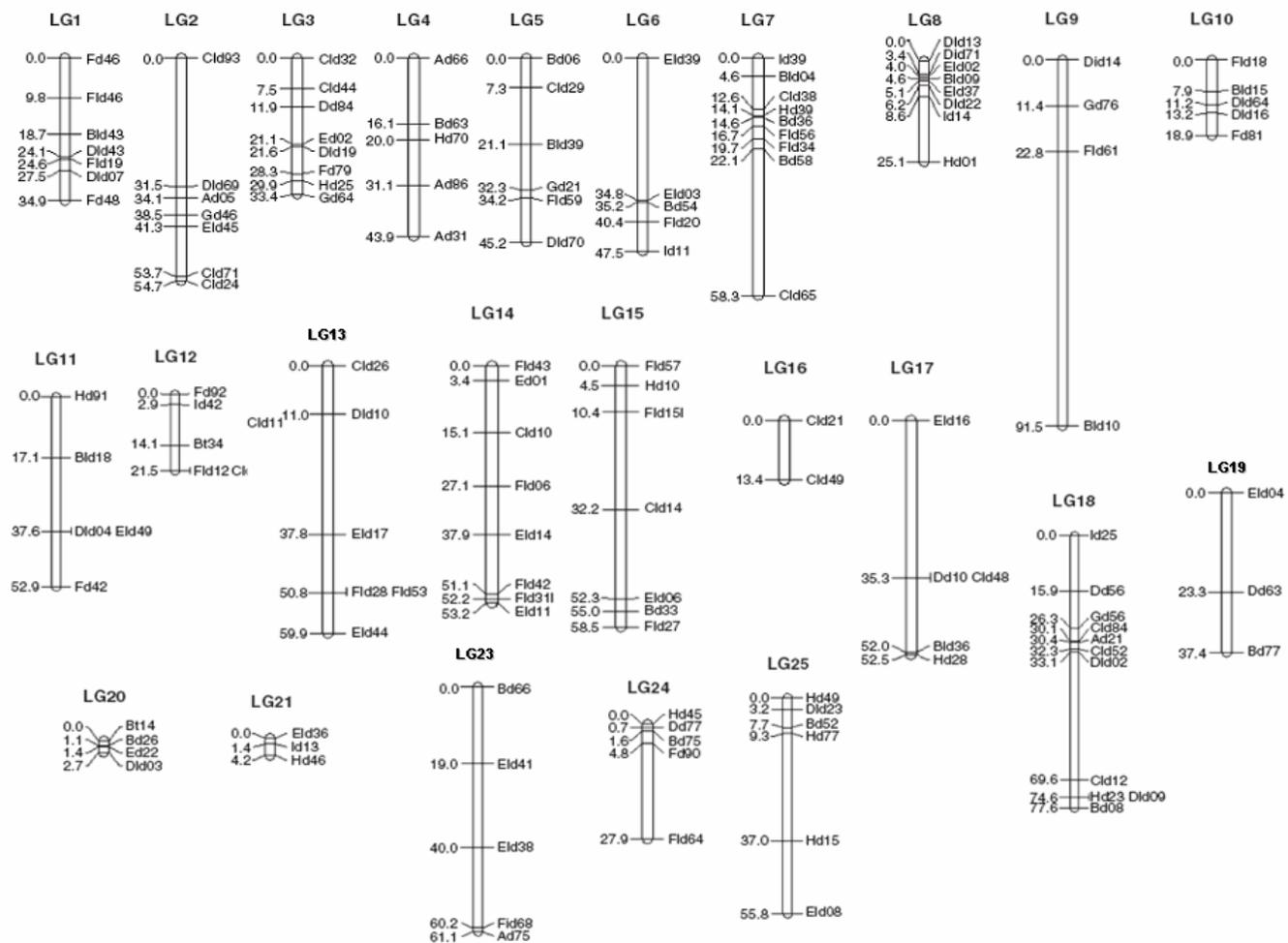
## APPENDICE 2A

Lista dei 151 marcatori microsatelliti utilizzati per lo studio di QTL

Locus name	Accession number	Forward primer	Reverse primer	PCR length	T°
<i>Eld16</i>	FN813193	GTTCAGGGCCTCCTCCTTAC	TGTCAGGTGAAACATTCTGCA	154	58
<i>Eld44</i>	FN813194	TGACCCTGAGGTTTCCTGAT	GCTCTGTGATGGAGCTTGTA	110	54
<i>Eld45</i>	FN813195	TTTTAATGAAGGACACGCACA	CGATGCTCATCACCATCAGA	171	54
<i>Eld49</i>	FN813196	GCAGGTTGGGACAAAACATAA	GGGCATTGACATCAACAGAA	168	54
<i>Fd42</i>	FN811870	CCCTGGGTCATTATTTGTGA	CCTCCTGCCTCTGACCAAT	209	54
<i>Fd46</i>	FN811871	GCAGTTCCTCATTGACTTGATG	TGGACCAATTTCTGGAGTATG	168	54
<i>Fd79</i>	FN811872	CCACAACACATGACCTCCAG	TGGCTTGGTCACTGCTCAG	100	54
<i>Fd90</i>	FN811873	CTGAGGAGATGGAGGAGACG	GAAACACAAAACAAAAGCCATCA	220	58
<i>Fd92</i>	FN811874	AGGCATTTTGTCATGAGGG	CTGGGTTGGAGAGCTCAGAT	110	54
<i>Fld06</i>	FN813197	CGGTCCCTGTTCCCTAACCT	GCCAGAGTGAGAGGCAGAAT	96	54
<i>Fld08</i>	FN813198	CATCTCTGAGTACAGTCACTGTGTTG	CCATTCACAGCCAGCCTTT	101	54
<i>Fld12</i>	FN811876	ATCTCCCGCTGCATAAAC	GGGAAGGAGTGGAGAACAG	162	54
<i>Fld15</i>	FN813201	CACCTCAATTTATCCAGCTCCA	TGTCGCTGTGAAGGCTAATG	101	54
<i>Fld18</i>	FN813202	TGCGTTCGTTCCGTATACAT	CCATTTCAATCTGGCCCTCA	175	54
<i>Fld19</i>	FN811877	GCGAAACCTAAGGCCTCATT	CATGGGACCAGTGGGAACTA	167	58
<i>Fld20</i>	FN813203	GCCTTTCCTCTGACATGAC	ACCATGCTCATCGCCAAG	241	54
<i>Fld27</i>	FN811878	ATGTGCGCTGCTTTAACCTC	CTCACCAGGCAATTTCTGC	176	54
<i>Fld28</i>	FN813204	ACCCTTACAGAAAGGCTAGCTTAAA	ACATCAGCTAGCCATGTTTC	85	54
<i>Fld31</i>	FN811879	GACGAGTTACCAACAGGTTAATCTA	GAAAATCACACAAGTGGATGC	100	54
<i>Fld34</i>	FN813205	ACACATGCATGCACACAAAC	ACAGAATCCCTGCAGCTCTC	101	54
<i>Fld42</i>	FN811880	ACTGACCTCTTGCCCTCCTC	CTGAGACGTGAAGAAGAAATCAA	236	58
<i>Fld43</i>	FN813206	CGTTAGTCACCCAGCCAAC	TGCATTTACCCTCCAGCTCT	264	54
<i>Fld46</i>	FN811881	GACTTTCCAAGCCATCTTTG	ATACGCAAGCCAAACAGGTA	110	54
<i>Fld53</i>	FN811875	TCCCCGAACACGCATATATTA	TGGAAATGAAAAGCCATGAA	246	54
<i>Fld56</i>	FN813207	TCAACAGCCATATTGCTCCA	CTGTGTGGGCAAGGTAATCA	176	54
<i>Fld57</i>	FN813208	CGATCCAGAAAGACCCTGCT	CAGTTTGATAGCTGAGCGTTTG	230	54
<i>Fld59</i>	FN811882	GCAACAGGGAGAGACCTCAA	CAGCGAGCAGCACAGATTTA	239	54
<i>Fld61</i>	FN813209	CGCTTACGGAGGTGAGAGT	GACCGGCTCCAGTTTGTCTA	178	54
<i>Fld64</i>	FN811883	TGGAGATGATCAACGGACAG	CCACCTTAGGAGAAACACAGG	103	54
<i>Gd21</i>	FN811884	TCCAGTTCTACATTCGCC	CATGCAGCATATCAGCTTCC	150	54
<i>Gd60</i>	FN811885	CAACATGCCACAACAGAAGG	AGCAGCCAGCTTACCTAAG	281	58
<i>Gd78</i>	FN811886	GGTGGTGGAAATGAGATGCT	AGCACGGATCACTGGCTAAT	161	54
<i>Hd01</i>	FN811887	GCAGTATTGTCCTTATAATGTGCG	TGTGTCCCAGCATGTTAGA	216	54
<i>Hd23</i>	FN811888	TGGTTGAGAAACAAGTTCCC	GAAGAAGAAGATCCTGGCCG	167	54
<i>Hd25</i>	FN811889	ACATCTCTCTCGGAGCCCTT	TAACGGGGAGGCAGGAATTA	207	58
<i>Hd45</i>	FN811890	ATACACCAGGCAGGCATAGG	ATCTCAATAAGCCCCGCT	154	54
<i>Hd46</i>	FN811891	CTTTACCTCTGCCTTCCCCT	CCGTTACTGAACAGGCAACA	219	54
<i>Hd77</i>	FN811892	CAATCCATTTCCAAAAGGTG	GGATGAGTGACAGGGTCTGG	205	54
<i>ld11</i>	FN811893	GGTGCTCAAAGTGACCGTTT	CATCAATCCCCTGCCTTG	120	54
<i>ld13</i>	FN811894	AAATGTTAGCAAACGTGCC	CCTGAGTAACATAGAATCACAATGC	184	54
<i>ld14</i>	FN811895	GAAAACAGAGCGGGACAGAG	CTTCGAACTGTGGAGGGAAG	220	58
<i>ld25</i>	FN811896	CCCAGGGCCTATTGTTATT	CTGGTGGACAGGGAGTCATT	207	54
<i>ld42</i>	FN811897	TTTACAGCCCTCTCTCAGC	AAAGGCAAGAGGAGCACAA	165	58

# APPENDICE 2B

Mappa genetica in centiMorgan per i 24 gruppi di linkage



## APPENDICE 3A

Coppie di *primer* gene-specifiche disegnate per i 10 geni *target* selezionati per la validazione in *Real-time* RT-PCR dei dati di *microarray*

SAPD	GENE	PRIMER
SAPD00386	Interleukin 10	<b>Forward</b> TGGAGGGCTTTCCTGTCAGA <b>Reverse</b> TGCTTCGTAGAAGTCTCGGATGT
SAPD01350	Adenosine deaminase like	<b>Forward</b> TCAGCATCCTGCAGAATAAGAA <b>Reverse</b> AGGTCGTAAGGGCTGAAATG
SAPD01593	Annexin 3	<b>Forward</b> ACTTCAAAGCAGAGGAGGATGTG <b>Reverse</b> CGTCTTTTCTGTCGTGCCAA
SAPD06058	Suppressor of cytokine signaling 3	<b>Forward</b> CAATGAGCAGCAGCATCTTGG <b>Reverse</b> CGTCTTGGAGGCAAAGGTCTTAT
SAPD18557	Ornithine decarboxylase	<b>Forward</b> GAGTCCTGCCTGTTGGAAGT <b>Reverse</b> CTTAGTGGGCATCTCCAAGC
SAPD23115	Matrix metalloproteinase 9	<b>Forward</b> CCGAGCGAACTTCTCTACACATT <b>Reverse</b> CTGTCATATTCTTTCCCCAGGAA
SAPD24516	Arginase, type II precursor	<b>Forward</b> TGGAACGCCAGTCAACGGA <b>Reverse</b> CGACAGCAGACCTGTGTTATGGA
SAPD24692	Chemokine (C-X-C) motif	<b>Forward</b> AGCTGTTGACGCTCTTGGCT <b>Reverse</b> GCTGATGGGCTTTGCTTGTG
SAPD25191	Nephrosin isoform 1	<b>Forward</b> TTGCTAGAGAAGGCCAATAGGAA <b>Reverse</b> GGCATTGCTATGTCTCCAAACA
SAPD 27978	Bactericidal/permeability-increasing protein precursor	<b>Forward</b> TCAACATCCGCCATTGACTTG <b>Reverse</b> CCTTATGGTTCCCGATGTTGTAA



## ***Ringraziamenti***

*Desidero ringraziare il mio supervisore Professor Luca Bargelloni e la Fondazione Cassa di Risparmio di Padova e Rovigo che hanno reso possibile la realizzazione di questo progetto di ricerca.*

*Al Professor Aleksei Krasnov, grazie infinite per avermi accolto, supportato e incoraggiato nel mio lavoro.*

*Un ringraziamento va alla Dottoressa Franch e alla Dottoressa Ferrareso per aver messo a disposizione la loro preziosa esperienza e per il loro fondamentale aiuto.*

*Grazie a Elena, Sara, Lisa, Maria Elena ed Elisa per avermi supportato in questi anni di cambiamento e avermi fatto scoprire il gusto della condivisione, nella bellezza della diversità di ciascuna.*

*Ad Andrea, per saper camminare al mio fianco con pazienza e dolcezza, grazie.*