

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze degli Alimenti, Nutrizione Animale e Sicurezza
Alimentare - SANASA

Ciclo XXIV

Settore Concorsuale di afferenza: 07/G1

Settore Scientifico disciplinare: AGR/20

**L'ALLEVAMENTO DELLA SOGLIOLA COMUNE (*Solea solea* L.):
RIPRODUZIONE CONTROLLATA E NUOVI SVILUPPI DI
NUTRIZIONE E ALIMENTAZIONE IN FASE LARVALE E GIOVANILE**

Presentata da: Luca Parma

Coordinatore Dottorato:

Chiar.mo

Prof. Roberto Rosmini

Relatore:

Chiar.mo

Prof. Pier Paolo Gatta

Esame finale anno 2012

Indice

Abstract.....	5
Abstract - English form	6
Capitolo I - Introduzione generale.....	7
1.1 La sogliola comune (<i>Solea solea</i>): specie candidata per l'allevamento	8
1.2 Principali criticità del ciclo di produzione.....	9
1.3 Obiettivi principali.....	10
1.4 Bibliografia.....	10
Capitolo II – Riproduzione in cattività	13
2.1 Introduzione.....	14
2.2 Materiali e Metodi	15
2.2.1 Riproduttori, cattura e mantenimento.....	15
2.2.2 Marcatura e sessaggio.....	17
2.2.3 Alimentazione e performance di accrescimento	17
2.2.4 Induzione della riproduzione	18
2.2.5 Campionamento di uova e larve	18
2.2.6 Assegnazione parentale e studio della variabilità genetica	19
2.2.7 Analisi statistiche delle performance zootecniche	20
2.3 Risultati.....	21
2.3.1 Accrescimenti.....	21
2.3.2 Identificazione dei riproduttori che hanno contribuito alla produzione di larve F1	22
2.3.3 Determinazione della variabilità genetica della prole	24
2.4 Discussioni e conclusioni	25
2.5 Bibliografia.....	28
Capitolo III - Qualità delle uova: composizione lipidica e tenore di acidi grassi	31
3.1 Introduzione.....	32
3.2 Materiali e Metodi	33
3.2.1 Gestione e alimentazione dei riproduttori	33
3.2.2 Campionamento di uova e larve	33
3.2.3 Determinazione della percentuale di fertilità	34
3.2.4 Incubazione delle uova per la determinazione degli indici di sopravvivenza embrionale	34
3.2.5 Valutazione degli acidi grassi e delle classi fosfolipiche nel corso della stagione riproduttiva	35

3.2.6	<i>Test di stress</i>	35
3.2.7	<i>Analisi chimiche</i>	36
3.2.8	<i>Analisi statistiche</i>	37
3.3	Risultati.....	38
3.3.1	<i>Emissioni di uova e percentuale di fertilità</i>	38
3.3.2	<i>Caratterizzazione qualitativa e quantitativa di lipidi e acidi grassi</i>	38
3.3.3	<i>Relazioni intercorrenti tra i lipidi e gli acidi grassi delle uova con gli indici di sopravvivenza embrionale</i>	41
3.3.4	<i>Andamento quantitativo degli acidi grassi nel corso della stagione riproduttiva</i> ...	47
3.4	Discussioni e conclusioni.....	53
3.5	Bibliografia.....	57
Capitolo IV - Alimentazione larvale e svezzamento precoce mediante l'utilizzo di diete commerciali		62
4.1	Abstract.....	63
4.2	Introduction.....	63
4.3	Materials and methods.....	65
4.3.1	<i>Experimental feeding regimes</i>	65
4.3.2	<i>Larvae origin, rearing methods and sampling</i>	67
4.3.3	<i>Growth and survival</i>	69
4.3.4	<i>Estimation of eye migration stage</i>	69
4.3.5	<i>Stress test</i>	70
4.3.6	<i>Water quality</i>	70
4.3.7	<i>Chemical analyses</i>	71
4.3.8	<i>Statistical analyses</i>	71
4.4	Results.....	72
4.5	Discussion.....	78
4.6	References.....	82
Capitolo V - Espressione genica di enzimi digestivi in larve di sogliola comune (<i>Solea solea</i>)		87
5.1	Introduzione.....	88
5.2	Materiali e metodi.....	88
5.2.1	<i>Larve, allevamento e campionamenti</i>	88
5.2.2	<i>Estrazione dell'mRNA, creazione di cDNA e cloning delle sequenze</i>	89
5.2.3	<i>qRT-PCR</i>	90
5.3	Risultati.....	90
5.4	Discussioni e conclusioni.....	94

5.5 Bibliografia.....	96
Capitolo VI - Influenza di diete contenenti differenti livelli proteici sulle performance di accrescimento in giovanili di Sogliola comune	99
6.1 Abstract.....	100
6.2 Introduction	100
6.3 Materials and methods.....	101
6.3.1 Diets	101
6.3.2 Fish, experimental set-up and sampling	103
6.3.3 Analyses of diets and body composition	104
6.3.4 Calculations	105
6.3.5 Liver histology	105
6.3.6 Statistical analyses.....	106
6.4 Results	106
6.5 Discussion.....	109
6.6 Conclusion.....	112
6.7 Acknowledgements	112
6.8 References	113
Documentazione fotografica.....	117
Pubblicazioni e partecipazioni a convegni	121

Abstract

In questa tesi sono illustrate alcune sperimentazioni finalizzate alla standardizzazione del ciclo produttivo della sogliola comune (*Solea solea*) in cattività. E' stato creato un parco di riproduttori selvatici ed è stata standardizzata la riproduzione ad un livello compatibile con la realtà produttiva del settore. Indagini genetiche di assegnazione parentale hanno evidenziato come alcuni esemplari siano stati predominanti negli accoppiamenti e nel conseguente contributo alla generazione della prole. Ciò ha determinato una diminuzione della variabilità genetica dei discendenti. La composizione quali-quantitativa degli acidi grassi delle uova è stata correlata con la sopravvivenza larvale nel corso di un'intera stagione riproduttiva. Tale composizione non ha subito importanti variazioni su scala temporale e sembra essere stata influenzata dall'alimentazione somministrata ai riproduttori nel periodo precedente alla riproduzione. Le analisi di interazione tra momento riproduttivo e qualità delle uova hanno confermato che è stato possibile ottenere uova di buona qualità in termini di sopravvivenza larvale nel corso di tutta la stagione riproduttiva. Larve di sogliola sono state svezzate precocemente 13 giorni dopo la schiusa riducendo l'impiego di cibo vivo a favore di micro diete commerciali. Tale svezzamento ha ridotto le performance di accrescimento, ma non la sopravvivenza e lo sviluppo della metamorfosi quando comparati ad un trattamento standard. La riduzione del cibo vivo ha ottimizzato i costi di produzione e migliorato l'igiene in vasca. L'ontogenesi di precursori di enzimi digestivi è stata determinata tramite PCR quantitativa. I risultati di espressione di tripsinogeno, chimotripsinogeno e amilasi hanno mostrato come tali enzimi rivestano un ruolo chiave nei processi digestivi delle prime fasi larvali. Esemplari giovanili hanno ottenuto un significativo maggiore indice di accrescimento e migliore indice di conversione quando alimentati con diete sperimentali contenenti un elevato tenore proteico. Un aumento dell'incidenza di vacuoli lipidici a livello epatico è stato osservato all'aumentare del tenore proteico della dieta.

Abstract - English form

The Thesis describes some experiments aimed at standardized the production cycle of common sole (*Solea solea*) in captivity. A wild broodstock was established and reproduction was set up in order to be comparable with a commercial hatchery. Genetics analyses of parentage assessment showed, as few specimens have been predominant in breeding behavior and in the offspring contribution . Loss of genetic variability was observed from parents to offspring. The qualitative and quantitative composition of eggs fatty acid was correlated with larval survival during an entire spawning season. This composition did not show important variation during time and seems to have been affected from the food supplied to broodstock before the spawning seasons. Analysis of interaction between breeding time and eggs quality confirmed that it was possible to obtain good eggs quality in term of larval survival overall the reproductive period. Larvae were weaned at 13 days post hatching (dph) using commercial microdiets while reducing live-feed utilization. A very early weaning affects growth performance but not survival rate and metamorphosis development compared to a standard treatment. A shorter live feed utilization improved tank hygiene and reduced production costs. Molecular ontogeny of digestive enzymes precursors was determinate by quantitative PCR. The results of trypsinogen, chymotripsinogen and amylase mRNA expression showed as these enzymes play a key role in the digestive processes of the first larval stages. Juveniles have obtained a significant higher specific growth rate and better feed conversion rate when fed experimental diet containing high protein content. Increased incidence of lipid droplets in hepatocytes was observed when dietary protein levels increased.

Capitolo I - Introduzione generale

1.1 La sogliola comune (*Solea solea*): specie candidata per l'allevamento

La sogliola comune (*Solea solea*, L.) è una specie ittica appartenente alla famiglia dei Soleidae che ha una distribuzione confinata all'oceano Atlantico Nord-Orientale, al Mare del Nord, al Mare Mediterraneo e al Mar Baltico occidentale. Vive su fondali sabbiosi costieri fino a 300 metri di profondità dove si nutre di vermi policheti, piccoli bivalvi, piccoli pesci e crostacei (Fisher et al., 1987). Generalmente solitaria, ha abitudini notturne mentre durante il giorno rimane immobile infossata nel sedimento marino (Cabral and Costas, 1999). Specie a sessi separati, la sogliola comune raggiunge la maturità sessuale tra il 3° e il 5° anno di vita con una lunghezza media di 35cm e un peso di 300-400g (Costa, 1991). Si riproduce in specifiche zone localizzate nelle diverse aree di provenienza, liberando uova pelagiche di 1.1-1.3 mm di diametro nella stagione invernale/primaverile tra febbraio e maggio (Paci et al., 1989). Dalle uova schiude una larva pelagica dalla simmetria corporea bilaterale che per circa 3 settimane si nutre di zooplancton che cattura nel medium marino. La metamorfosi larvale avviene tra il 13° e il 25° giorno dopo la schiusa (Palazzi et al., 2006) ed è caratterizzata da importanti trasformazioni della struttura corporea tra cui la migrazione dell'occhio sinistro sul lato destro del corpo. Da questo momento in poi la giovane post-larva assume la morfologia dell'adulto ed un comportamento bentonico.

La sogliola comune è una specie con un alto valore commerciale ed un'elevata importanza economica. E' uno dei pesci più richiesti dai mercati in Europa e quindi più ricercato dalle attività di pesca (Vallisneri et al., 2000). Attualmente il prezzo al dettaglio è nell'ordine dei 15-25 €/kg (Ismea, 2012) dipendente dalla taglia. Viene consumato fresco o filettato ed è caratterizzato da carni bianche-rosate di ottima qualità, dall'elevata digeribilità e da un buon profilo nutrizionale. Nel 2009 le catture totali di questa specie in Europa sono state di 40.153 tonnellate (Fao, 2009) ma gli stock naturali sono destinati a diminuire in un futuro prossimo per la crescente pressione di pesca. Queste caratteristiche fanno della sogliola comune un'eccellente candidata per entrare nel sistema della maricoltura. Un considerevole numero di lavori scientifici è stato pubblicato negli ultimi 2 decenni (Howell, 1997; Imsland et al., 2003) e differenti esperimenti sono stati condotti a livello di laboratorio o come progetti pilota per standardizzare l'allevamento della sogliola. Tali studi hanno fornito molteplici informazioni sulla biologia e sull'adattamento alla cattività ma ciò nonostante non è ancora presente una produzione di questa specie nel comparto dell'acquacoltura. Attualmente diversi centri di

ricerca e allevamenti europei stanno sviluppando progetti finalizzati a standardizzare l'allevamento sostenibile di questa specie come metodo per preservare gli stocks selvatici e diversificare le produzioni nazionali di acquacoltura.

1.2 Principali criticità del ciclo di produzione

La sogliola comune non è attualmente allevata su scala industriale per la mancanza di tecniche specifiche efficaci per questa specie che consentano di superare le fasi critiche del ciclo riproduttivo, larvale e dell'accrescimento degli esemplari giovanili. L'approvvigionamento di una costante quantità e qualità di uova fertili ottenute dalla riproduzione controllata è di vitale importanza per il successo e la continuità di tutto il ciclo d'allevamento. La sogliola spesso esibisce disfunzioni riproduttive in cattività tra cui la mancanza di sincronizzazione tra individui maschili e femminili che determina un ridotto tasso di fertilità delle uova (Howell et al., 2011). Un altro problema è la scarsa omogeneità con cui gli esemplari si riproducono in cattività. E' stato infatti osservato come all'interno di un gruppo di riproduttori solo alcuni esemplari partecipino all'accoppiamento. Ciò si traduce in una riduzione della variabilità genetica e quindi in un calo delle performance zootecniche della progenie (Blonk et al., 2009). Inoltre è stato osservato come le carenze nutrizionali dei riproduttori possano essere la causa di una scarsa qualità delle uova in termini di capacità di schiusa e sopravvivenza larvale (Lund et al., 2008).

Come per altri pesci piatti, la sogliola comune esibisce una delicata fase larvale caratterizzata da un complesso processo di metamorfosi che influisce notevolmente sulla gestione del suo allevamento. L'allevamento larvale della sogliola è considerato una delle fasi più critiche in condizioni intensive a causa di un aumento della mortalità nel corso della metamorfosi e dello svezzamento. La mancanza di adeguati protocolli alimentari ed efficaci tecniche di gestione ha spesso determinato un aumento del costo di produzione dei giovanili condizionando la sostenibilità delle fasi successive di allevamento.

Anche l'ingrasso presenta alcune difficoltà. Lo scarso accrescimento riportato di frequente negli allevamenti sperimentali è sicuramente un elemento determinante che limita l'espansione dell'allevamento intensivo di questa specie. La mancanza di informazioni sui requisiti nutrizionali, l'assenza di un mangime specie-specifico, il caratteristico comportamento alimentare e l'effetto della densità di allevamento sulle performance di

accrescimento (Day et al., 1997; Imsland et al., 2003; Schram et al., 2006; Piccolo et al., 2008; Sanchez et al., 2010) ne sono le principali cause.

1.3 Obiettivi principali

Questo studio si propone di descrivere le attività di ricerca condotte nell'arco di 3 anni finalizzate alla standardizzazione del ciclo di allevamento della sogliola comune (*Solea solea*). In particolare sono state approfondite le tecniche di riproduzione in cattività attraverso l'analisi dell'andamento delle performance riproduttive ottenute nel corso degli anni. Lo studio del comportamento riproduttivo e della variabilità genetica della progenie è stato condotto al fine di migliorare la qualità degli avannotti mediante la selezione genetica dei riproduttori. Il profilo degli acidi grassi delle uova è stato messo in rapporto alla sopravvivenza larvale e all'alimentazione dei riproduttori al fine di definire i quantitativi ottimali di micronutrienti che maggiormente regolano tali processi. Sono stati messi a punto differenti protocolli di alimentazione larvale con l'obiettivo di migliorare la sopravvivenza e gli accrescimenti post-svezzamento, riducendone i costi di gestione. Infine è stata condotta una prova sperimentale su esemplari giovanili per determinare gli effetti di differenti livelli proteici della dieta sulle performance di accrescimento, sulla conversione dell'alimento e sugli effetti istologici a livello epatico. Tutti i protocolli operativi sono stati condotti nel rispetto delle norme vigenti in materia di benessere animale, secondo l'approvazione del Comitato Etico Scientifico dell'Università di Bologna come definito dalla Direttiva Europea 86/069/ECC.

1.4 Bibliografia

- Blonk, R.J.W., Komen, J., Kamstra, A., Crooijmans, R.P.M.A., van Arendonk, J.A.M., 2009. Levels of inbreeding in group mating captive broodstock populations of Common sole, (*Solea solea*), inferred from parental relatedness and contribution. *Aquaculture*, 289, 26-31.
- Cabral, H. and Costa, M.J., 1999. Differential use of nursery areas within the Tagus Estuary by sympatric soles *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Environmental Biology of Fish.* 56, 389–397.

- Costa, F., 1991. Atlante dei pesci dei mari italiani, Mursia Editore, Milano.
- Day, O.J., Howell, B.R., Jones, D.A., 1997. The effect of dietary hydrolysed fish protein concentrate on the survival and growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.), during and after weaning. *Aquaculture Research* 28, 911-921.
- FAO, 2009. www.fao.org/fishery/species/3367/en.
- Fischer, W., Bauchot, M.L., and Schneider, M., 1987. Fiches FAO d'identification des espèces pour les besoins de la pêche (Révision 1). Méditerranée et mer Noire. Zone de pêche 37. 1. Vegetaux et Invertébrés. Publication préparée par la FAO (Project GCP/INT/422/EEC). Rome, FAO : 760 pp.
- Howell, B.R., 1997. A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture* 155, 359–369.
- Howell, B. R., Conceição, L.E.C., Prickett, R., Canavate, P., Mananos, E., Dinis, M.T., Valente, L., 2011. Proceedings of the V Workshop on the Cultivation of Soles. Centre of Marine Science (CCMAR), University of the Algarve, Faro, Portugal.
- Imstrand, A.K., Foss A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P. White P., 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13, 379–408.
- Ismea, 2012. www.ismea.it.
- Lund, I., Steinfeldt, S.J., Suhr, K.I., Hansen, B.W., 2008. A comparison of fatty acid composition and quality aspects of eggs and larvae from cultured and wild broodstock of common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture Nutrition* 14, 544-555.
- Paci, S., Cau, A., Deiana, A. M., Salvatori, S., 1989. Osservazioni sulla biologia di *Solea vulgaris*. Quensel della classe di età 0+ in un'area costiera della Sardegna. *Oebalia*, 15 (2), N. S.: 725-734.
- Palazzi, R, Richard, J., Bozzato, G., Zanella, L., 2006. Larval and juvenile rearing of common sole (*Solea solea* L.) in the Northern Adriatic (Italy). *Aquaculture*, 255, 495-506.
- Piccolo, G., Marono, S., Bovera, F., Tudisco, R., Caricato, G., Nizza, A., 2008. Effect of stocking density and protein/fat ratio of the diet on the growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture Research* 39, 1697-1704.
- Sánchez, P., Ambrosio P.P., Flos, R., 2010. Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 300, 93–101.
- Schram, E., Van der Heul, J.W., Kamstra, A., Verdegem, M.C.J., 2006. Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture* 252, 339-347.

Vallisneri, M., Piccinetti, C., Stagni, A.M., Colombari, A., Tinti, F., 2000. Dinamica di popolazione, accrescimento, riproduzione di *Solea vulgaris* (Quensel 1806) nell'alto Adriatico. *Biologia del Mare Mediterraneo* 7 (1): 65-70.

Capitolo II – Riproduzione in cattività

2.1 Introduzione

L'acquacoltura del Mediterraneo è dominata dall'allevamento di orate e branzini le cui produzioni negli ultimi anni si sono mantenute a livelli costanti ricoprendo il fabbisogno del mercato europeo (Basurco e Lovatelli, 2003). Tra le specie di interesse non attualmente allevate su larga scala, la sogliola comune (*Solea solea* L.) è considerata sicuramente promettente al fine di diversificare le produzioni in maricoltura (Imstrand et al., 2003). Per garantire l'espansione del suo allevamento su scala intensiva risulta necessario poter disporre di una costante produzione di uova e larve di buona qualità, ottenute attraverso una corretta e standardizzata gestione degli esemplari da riproduzione. La riproduzione in cattività della sogliola comune è stata descritta nel passato da alcuni autori a livello sperimentale (Devauchelle et al., 1987; Baynes et al., 1993; Howell, 1997), tuttavia attualmente a livello produttivo le tecniche di gestione dei riproduttori non sempre garantiscono sicure e costanti produzioni di uova di buona qualità. In questa specie è stato dimostrato come sia ancora difficile ottenere uova tramite la riproduzione artificiale (induzione ormonale e fecondazione artificiale) e l'unico metodo possibile è la riproduzione mediante l'accoppiamento e l'emissione spontanea dei gameti (Howell et al., 2011). A differenza della riproduzione artificiale, condotta oggi su numerose specie marine, la riproduzione naturale è maggiormente influenzata da fattori ambientali e dalla gestione degli esemplari da riproduzione. Errate manipolazioni possono infatti portare alla mancanza del comportamento riproduttivo e del *matching* tra individui con conseguente fallimento totale o parziale della riproduzione stessa. L'impossibilità di programmare in termini quantitativi e qualitativi una sufficiente produzione di uova determina un'importante instabilità del processo produttivo. La riproduzione naturale impedisce inoltre di applicare alcune tecniche di miglioramento genetico della progenie in quanto non si conoscono le dinamiche di accoppiamento all'interno del gruppo di riproduttori. Alcuni individui potrebbero contribuire più di altri alle generazioni seguenti generando così un'elevata variabilità nella dimensione della famiglia con ascendenza non nota (Komen et al., 2006). Un restringimento del numero degli esemplari attivi nella riproduzione può inoltre portare ad una perdita della variabilità genetica negli F1 (Blonk et al., 2009). Il restringimento genetico causato da un eccessivo inincrocio è stato ritenuto responsabile di un calo nelle capacità riproduttive (Frommen, 2008) e della perdita di caratteristiche importate dal punto di vista commerciale (Gallardo, 2004). Alcuni marcatori molecolari come i microsatelliti rappresentano un valido strumento nei programmi di

riproduzione controllata degli animali in quanto permettono di definire il pedigree, la variabilità e la differenziazione genetica (Villanueva et al., 2002). Con riferimento alle specie ittiche, in particolare ai pesci piatti, i microsatelliti sono stati utilizzati in diversi programmi di riproduzione per monitorare la variabilità genetica ed analizzare il pedigree (Kim et al., 2007).

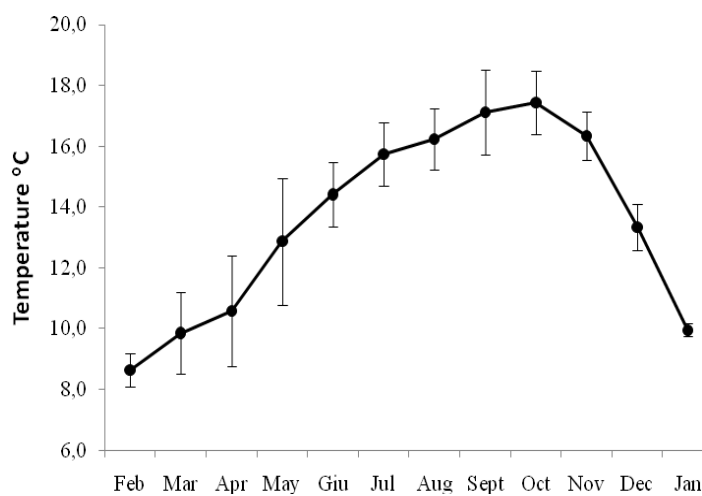
Questo studio si propone di illustrare alcune tecniche di gestione di un gruppo di riproduttori di sogliola comune finalizzate alla produzione di uova fertili su scala produttiva. Inoltre sono state esaminate alcune metodiche di assegnazione parentale su scala genetica al fine di valutare il grado di inincrocio e la variabilità genetica della prima generazione nell'arco di un'intera stagione riproduttiva.

2.2 Materiali e Metodi

2.2.1 Riproduttori, cattura e mantenimento

Durante la stagione invernale dell'anno 2005, un totale di 40 esemplari di sogliola comune dal peso medio di 115 grammi sono stati catturati a strascico nel Nord Adriatico da alcune imbarcazioni da pesca. Al fine di ridurre gli stress, gli esemplari sono stati manipolati con cura e posti immediatamente in acqua marina ossigenata.

Figura 1. Andamento stagionale (2007-2011) della temperatura dell'acqua per il condizionamento dei riproduttori.



I pesci sono stati poi trasferiti presso il Laboratorio di Acquacoltura (Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna, Cesenatico), dove sono stati stoccati in 2 vasche di quarantena da 600 L^{-1} (0.9 m^2 di superficie) connesse ad un impianto a ricircolo con acqua marina filtrata e mantenuta ad una temperatura di $18.0 \pm 1.0 \text{ }^\circ\text{C}$ e ad una salinità di $30.0 \pm 1.0 \text{ ‰}$. Il fondo della vasca è stato fornito di un sottile strato di sabbia che permettesse agli animali di acclimatarsi, ma allo stesso tempo non sufficientemente spesso da permettere agli stessi di infossarsi completamente. Durante il primo mese gli esemplari sono stati controllati quotidianamente per eventuali mortalità ed alimentati a sazietà con molluschi freschi cinque volte a settimana. Successivamente 33 individui sono stati trasferiti in una vasca in vetroresina di 7 m^2 avente una capacità di 7000 litri. In questo caso uno strato di sabbia marina con uno spessore di 10 cm è stato posizionato sul fondo della vasca. La vasca era connessa ad un impianto a ricircolo chiuso dotato di un filtro meccanico, (0.2 m^3 di sabbia quarzifera di diametro 0.4–0.8 mm, Astral Pool Berlin 600mm, Servaqua S.A. Barsareny, Spagna), lampade sterilizzanti a raggi ultravioletti (PE 25 mJ/cm^2 : $8 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. Blaufish, Barcelona, Spain) un impianto di refrigerazione a piastre (York YCSA-08HP, York Italia s.r.l.) e un biofiltro (0.4 m^3 di sabbia quarzifera Biogrog, PTK 1200, Astral Pool, Servaqua S.A. Barsareny, Spagna). Una costante areazione (80 L h^{-1}) veniva immessa in acqua attraverso dei diffusori per garantire una corretta ossigenazione ($7.5 \pm \text{mg}/\text{l}$) e per rimuovere l'anidride carbonica. L'impianto a ricircolo era sottoposto a periodici ricambi con acqua marina ($20\% \text{ settimana}^{-1}$) per ridurre la concentrazione di nitrati ($< 200 \text{mg}/\text{l}$). La vasca è stata fornita di una copertura in nylon nera per prevenire l'ingresso di qualsiasi fonte luminosa e, internamente a questa, è stata posizionata una luce (40W Softone, Philips) in grado di generare 50 lux (Delta-Ohm luxmeter HD-9221; Delta-Ohm, Padua, Italy) sulla superficie dell'acqua. L'ossigeno disciolto in acqua ($>7.0 \text{ mg}/\text{l}$) e la temperatura sono stati monitorati quotidianamente. I valori di ammoniaca ($0.1 \text{ mg}/\text{l}$), nitriti ($0.1 \text{mg}/\text{l}$) e i nitrati sono stati determinati una volta a settimana mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro (Spectroquant Nova 60, Merk, Lab business). Contemporaneamente sono stati determinati la salinità (35-38‰) e il pH (8.0-8.2). Il bicarbonato di sodio veniva aggiunto ($100 \text{ mg}/\text{l}$) per controllare le oscillazioni alcaline quando il pH scendeva sotto 8.0. Durante tutto il periodo della sperimentazione è stato riprodotto il fotoperiodo naturale in termini di ore di luce e buio e la temperatura dell'acqua è stata mantenuta secondo i valori stagionali del Nord Adriatico, (Fig. 1 e 2).

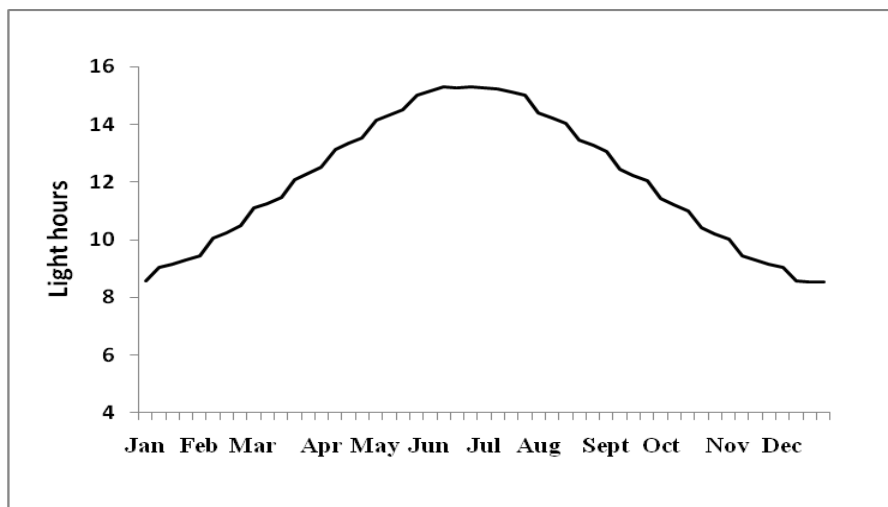


Figura 2. Andamento del fotoperiodo durante il condizionamento dei riproduttori

2.2.2 Marcatura e sessaggio

I riproduttori in seguito all'acclimatazione sono stati marcati con *microchips PIT tag* (Passive Internal Transponder, 12 mm, Biomark, Inc.) e successivamente una volta all'anno ne è stato registrato il peso e la lunghezza individuale. In tali occasioni gli esemplari venivano pescati e anestetizzati utilizzando 300mg/l di 2-fenoxietanolo per ridurre al minimo gli stress secondo le leggi in materia di benessere animale. Nessun esemplare ha riportato lesioni o è morto nel corso di queste operazioni. Il sesso è stato determinato mediante esame visivo della cloaca e mediante rigonfiamento addominale durante la prima stagione riproduttiva in cattività. Ventiquattro esemplari con una sex ratio maschi:femmine di 1.2 : 1 sono stati selezionati per la riproduzione e mantenuti invariati in 5 anni di sperimentazioni.

2.2.3 Alimentazione e performance di accrescimento

I riproduttori sono stati alimentati da 3 a 5 volte alla settimana con un mangime sperimentale semi-umido (5 mm di diametro) costituito da farina di pesce, cozze congelate e macinate, olio di pesce e premix-vitaminico e minerale. Durante il periodo pre-riproduttivo e riproduttivo (Dicembre-Maggio) la dieta veniva sostituita interamente con molluschi freschi e vermi policheti (*Nereis virens*, Topsybaits, The Netherland) somministrati *ad libitum* 2-3 volte a

settimana. La razione giornaliera veniva corretta quotidianamente sulla base dell'alimento avanzato dal pasto precedente. Gli esemplari sono stati campionati una volta all'anno per registrare peso e lunghezza individuale e calcolare i seguenti indici zootecnici:

$$\text{Indice di accrescimento (GW)} = \frac{(\text{Peso finale}) - (\text{Peso iniziale})}{\text{Peso iniziale}} * 100$$

$$\text{Fattore di corpulenza (CF)} = \frac{\text{Peso corporeo}}{\text{Lunghezza}^3} * 100$$

2.2.4 Induzione della riproduzione

La riproduzione è stata ottenuta secondo il metodo dell'emissione spontanea. Gli esemplari sono stati mantenuti in un regime di fotoperiodo e temperatura dell'acqua controllata secondo le condizioni naturali che si registrano nell'area del Nord Adriatico. Il fotoperiodo veniva modificato settimanalmente approssimando di 15 minuti l'ora di alba e tramonto secondo le naturali variazioni delle stagioni. Contemporaneamente la temperatura dell'acqua della medesima stagione veniva regolata in impianto osservando i dati fisici delle acque sui fondali marini del Nord Adriatico a profondità comprese da 20 a 30 m (Istituto Oceanografico Daphne II, Arpa Emilia Romagna, Italia). Gli accoppiamenti seguiti dalle emissioni di uova sono stati indotti in primavera (Marzo-Maggio) mediante repentine oscillazioni della temperatura dell'acqua mantenuta nei valori tra 8 e 12 °C.

2.2.5 Campionamento di uova e larve

Nel corso delle stagioni riproduttive, le uova emesse spontaneamente in vasca, venivano raccolte quotidianamente mediante un apposito raccogliatore a maglie fine di 500 µm posto all'uscita dello scarico della vasca. Ogni mattina veniva controllata l'avvenuta emissione e si procedeva alla raccolta delle uova. Ogni emissione (*batch*) veniva caratterizzata registrando il peso umido totale, la percentuale di galleggibilità e la percentuale di fertilità. L'osservazione allo stereomicroscopio della presenza di divisione cellulare era usata come metodo per determinare l'avvenuta fertilizzazione. La componente galleggiante delle uova era successivamente trasferita in vasche da incubazione cilindro-coniche (80 L) alimentate con acqua marina (sal. 38‰, T. 12.0 ± 1°C, flusso 50 L h⁻¹) e connesse ad un impianto a ricircolo.

L'impianto era costituito da lampade a raggi ultravioletti, filtro a sabbia e sistema di raffreddamento. Le uova erano mantenute in sospensione dal fondo della vasca da una leggera areazione. Quotidianamente le uova morte venivano rimosse attraverso decantazione ed espulsione dal fondo degli incubatoi. Dopo la schiusa le larve venivano mantenute nelle stesse condizioni di gestione delle uova per almeno 3-4 giorni prima di essere campionate per le analisi genetiche.

2.2.6 Assegnazione parentale e studio della variabilità genetica

Un lembo di tessuto della pinna caudale è stato campionato in condizioni sterili da ciascuno dei 24 riproduttori. Trenta larve per emissione, per un totale di 23 emissioni (numero totale delle emissioni fertili ottenute), sono state campionate a random e fissate in etanolo 80% e conservate a 4°C. Il DNA genomico totale è stato estratto da 25mg di tessuto secco secondo le procedure standard illustrate da (Miller et al., 1988). I seguenti loci Microsatelliti specifici per la sogliola comune: F8-ICA9 (A); F8F8-IGAA7 (B); F8-ITG11 (C); F8-IIGT15 (D); F13-II8/4/7 (G); AC3 (1); AC6 (2); AC45 (7), (Iyengar et al., 2000, Garoia et al., 2006), sono stati amplificati mediante PCR (GenAMP PCR System 9700, Applied Biosystem). Le coppie di primers, le condizioni di amplificazione e i mix di reazione sono stati condotti secondo Iyengar et al., (2000). La genotipizzazione degli individui è stata condotta mediante ABI 310 (Automated Genetic Analyser, Applied Biosystems), utilizzando primers forward marcati con 6-FAM, VIC e NED e con la regione interna standard LIZ 500. Successivamente la dimensione degli alleli è stata ottenuta utilizzando GeneScan Analysis Software 2.02 (Applied Biosystems). Al fine di minimizzare gli errori di dimensionamento o per la presenza di alleli nulli, la genotipizzazione è stata condotta mediante Microchecker (Shipley, 2003). Il polimorfismo dei Microsatelliti tra i riproduttori e le larve è stato misurato secondo la media del numero di alleli per locus, la ricchezza allelica e l'eterozigosi osservata e attesa, usando F-STAT (Goudet, 2000) e GENETIX 4.0 (Belkhir et al., 2000). La deviazione dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (henceforth HWE) è stata testata usando il test di Fisher implementato con GENEPOP 3.1, (Raymond and Rousset, 1995). Il livello di significatività è stato determinato secondo il metodo della catena di Markov con 1000 gruppi e 1000 interazioni per gruppo. Il coefficiente di inbreeding è stato calcolato mediante F-STAT. La significatività della loro distanza da zero è stata stabilita mediante un test di permutazione. Uno degli obiettivi dei programmi di gestione delle avanotterie è di preservare la diversità genetica. Tuttavia sono necessarie delle precise informazioni sul numero dei riproduttori in grado di mantenere un

ottimale livello di variabilità genetica (Waples and Do, 2008). Questa informazione che può essere definita come la grandezza di una popolazione ideale, può essere stimata attraverso un metodo demografico o genetico. Ne Estimator 1.3 (Peel et al., 2004) è stato applicato per stimare N_e secondo Hill, 1981. La differenziazione genetica tra i campioni è stata determinata tenendo conto della teoria di IAM e il coefficiente di F_{st} (Weir e Cockerham, 1984) è stato calcolato usando il software ARLEQUIN 3.11 (Excoffier et al., 2005). Il test di Fisher per la differenziazione delle popolazioni come implementato in GENEPOP 3.1, è stato applicato qualora la distribuzione degli alleli fosse stata uguale tra i campioni analizzati. I risultati sono stati analizzati usando il test di permutazione del rispettivo programma. Al fine di evitare la probabilità di avere un errato rifiuto di una reale ipotesi nulla è stato applicato il test di Bonferroni per accoppiamenti multipli (Rice, 1989). Inoltre per valutare il grado di divergenza genetica dalla popolazione naturale presente nel Nord Adriatico, i dati ottenuti nel corso dello studio sono stati comparati con quelli ottenuti da Garoia et al., (2007).

Le relazioni intercorrenti tra i campioni (r ; Queller and Goodnight, 1989) sono state analizzate usando KINGROUP V2 (Konovalov et al., 2004). Quindi è stata testata una prima ipotesi di relazione di primo ordine ($r=0.5$) contro un'ipotesi nulla di assenza di relazione ($r=0$).

2.2.7 Analisi statistiche delle performance zootecniche

Le performance zootecniche tra cui il peso medio, l'indice di accrescimento (GW) e il fattore di corpulenza (CF), sono state analizzate mediante il test *T di Student*. Le analisi statistiche sono state effettuate con il programma Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

2.3 Risultati

2.3.1 Accrescimenti

I 24 esemplari adulti di sogliola comune (*Solea solea*) selezionati per la riproduzione, hanno mostrato una buona capacità di adattarsi alla cattività e nel corso di 6 anni di sperimentazioni non è stata registrata alcuna mortalità.

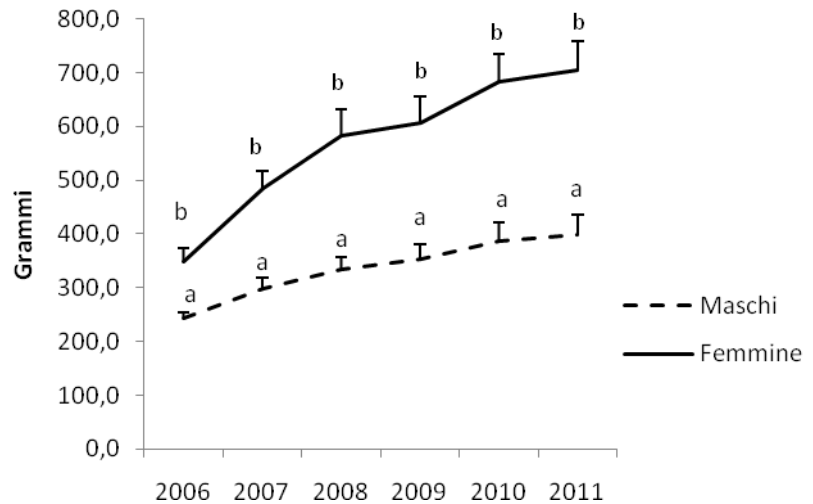


Figura 3. Peso medio (\pm SE) dei soggetti da riproduzione nel corso degli anni. Punti con lettere differenti in apice sono statisticamente differenti ($P \leq 0.05$).

Il mangime somministrato è stato accettato con successo dopo alcuni mesi di adattamento e ha garantito un buon accrescimento degli esemplari nel corso del periodo di studio. In particolare gli individui femminili hanno mostrato un peso significativamente superiore ai maschi nel corso di tutta la prova raggiungendo un peso medio finale rispettivamente di 704.1 ± 55.3 g e 398.6 ± 37.3 g ed una lunghezza di 38.7 ± 0.9 e 34.5 ± 0.9 cm (Fig. 3). L'incremento di peso percentuale annuo (indice di accrescimento, GW) ha avuto un andamento decrescente passando da 39.7-25.9 % a 2.9-2.5 % rispettivamente per femmine e maschi dal 2006 al 2011 (Fig. 4). I maschi hanno mostrato una significativa minor capacità di crescita tra il 2006 e il 2007 rispetto alle femmine, mentre tale differenza è stata meno pronunciata nelle osservazioni successive. Nel corso di tutta la sperimentazione le femmine hanno fatto registrare un indice di corpulenza (CF) significativamente superiore ai maschi. Per entrambi l'andamento del CF nel corso degli anni è rimasto costante (Fig. 5).

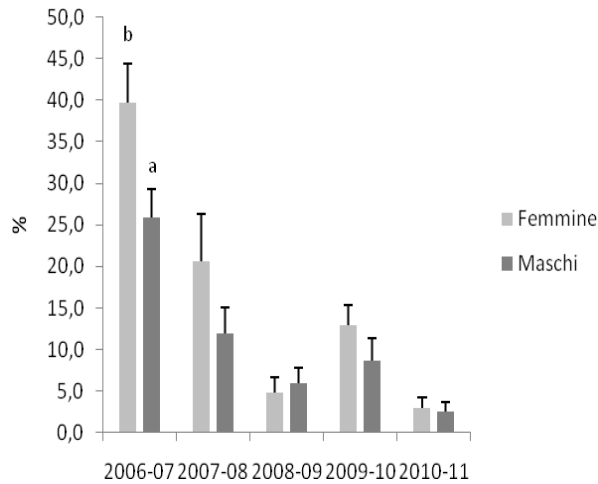


Figura 4. Indice di accrescimento (GW) medio dei riproduttori registrato nel corso della sperimentazione. Dati con lettere differenti in apice sono statisticamente differenti ($P \leq 0.05$).

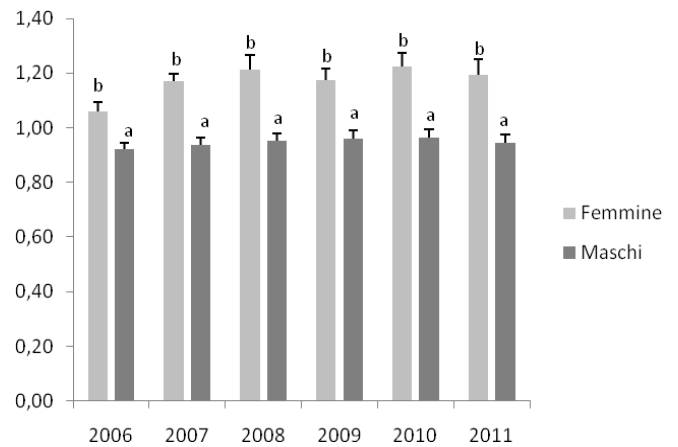


Figura 5. Fattore di corpulenza (CF) medio a confronto tra maschi e femmine nel corso degli anni. Dati con lettere differenti in apice sono statisticamente differenti ($P \leq 0.05$).

2.3.2 Identificazione dei riproduttori che hanno contribuito alla produzione di larve F1

Nel corso della stagione riproduttiva del 2010 sono state ottenute 23 emissioni di uova fertili ed una produzione totale di 350.000 larve (Capitolo III). Tutti gli individui eccetto 3 esemplari (P12, P1, P23) hanno contribuito alla generazione della prole. La percentuale di larve prodotte assegnata ad ogni singolo riproduttore è illustrata in Fig. 6.

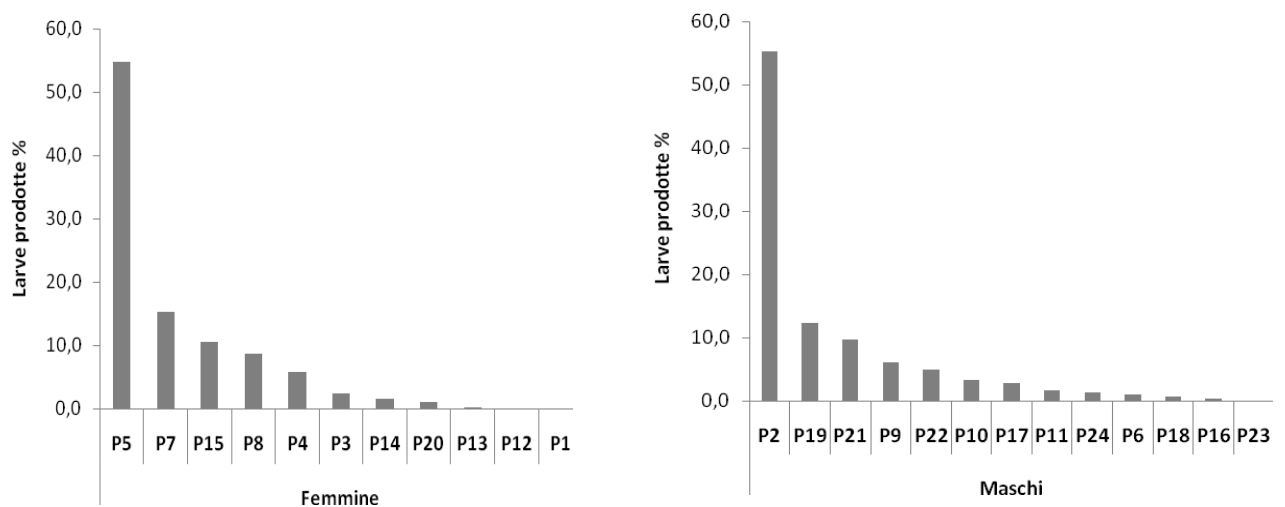


Figura 6. Contribuito (%) dei riproduttori femmine e dei maschi nella produzione totale di larve per la stagione riproduttiva 2010.

Tabella 1. Caratteristiche dei maschi di sogliola comune (*Solea solea*) utilizzati per la stagione riproduttiva 2010. GW= indice di accrescimento tra gli anni 2009-10 e 2010-11. P2, 19, P21 =esemplari che maggiormente hanno contribuito alla produzione di larve F1.

Nome Riproduttore	PIT Tag	Peso (g) 2009	Peso (g) 2010	Peso (g) 2011	% GW 2009-10	% GW 2010-11
P_2	4658375D13	411,3	421,3	436,2	2,4	3,5
P_10	46566E053D	295,1	284,0	301,5	-3,8	6,2
P_11	461E7D7B1D	338,1	372,9	379,0	10,3	1,6
P_17	46573E7473	412,8	416,1	431,0	0,8	3,6
P_18	46170E7356	330,8	418,9	458,0	26,6	9,3
P_21	461E7E6F0A	231,0	238,8	233,0	3,4	-2,4
P_22	4657597060	515,9	619,1	660,0	20,0	6,6
P_23	465703281C	309,1	351,1	340,9	13,6	-2,9
P_6	46570A2520	434,1	497,3	520,0	14,6	4,6
P_9	462D755349	234,3	244,0	238,0	4,1	-2,5
P_16	4657235F02	409,6	480,0	461,0	17,2	-4,0
P_19	465743 7E54	375,0	373,0	393,0	-0,5	5,4
P_24	462E171F6E	307,0	319,3	329,8	4,0	3,3

I seguenti esemplari, P5 e P2, hanno contribuito rispettivamente a 14 e 17 emissioni producendo più del 50% della prole ottenuta nell'intera stagione riproduttiva. P5 è stata, tra le femmine, quella predominante durante il primo periodo riproduttivo (3-27 marzo), coprendo quantitativamente la quasi totalità delle emissioni di questa fase. Seconda per quantitativi prodotti, P7 è stata attiva in 12 emissioni distribuite nel corso di tutta la stagione riproduttiva, mentre P15 ha partecipato a 7 emissioni principalmente nella seconda parte della stagione riproduttiva (28 marzo-1 maggio). Tra i maschi, P2 è stato quello predominante nel corso di tutta la stagione riproduttiva seguito da P19 anch'esso avente una frequenza di accoppiamento distribuita nel corso di tutto il periodo riproduttivo. Il terzo maschio per produzione di larve (P21), si è accoppiato principalmente nel primo periodo riproduttivo (8-18 marzo). Le caratteristiche morfologiche dei singoli riproduttori sono illustrate in Tabella 1 e 2. Le femmine P5, P7 e P15 hanno fatto registrare un peso per la medesima stagione compreso tra 668 e 871 grammi mentre tra 228 e 421 grammi è stato il range per i maschi P2, P19, e P21. Per quanto riguarda gli indici di accrescimento, le femmine più produttive P5 e P7 hanno fatto registrare un accrescimento tra il 2009 e il 2010 rispettivamente del 16.7 e 22.4% mentre la terza femmina più produttiva (P15) ha fatto registrare per il medesimo periodo un calo di peso del 6.5%. I maschi P2 e P21 hanno fatto registrare un accrescimento tra il 2009 e il 2010 rispettivamente di 2.4 e 3.4 % mentre P19 ha mostrato un calo dello 0.5%.

Tabella 2. Caratteristiche delle femmine di sogliola comune (*Solea solea*) utilizzate per la stagione riproduttiva 2010. GW = indice di accrescimento tra gli anni 2009-10 e 2010-11. P5, P7, P15 = esemplari che maggiormente hanno contribuito alla produzione di larve F1.

Nome Riproduttore	PIT Tag	Peso (g) 2009	Peso(g) 2010	Peso (g) 2011	% BW 2009-10	% BW 2010-11
P_5	46572B3769	746,2	871,1	872,1	16,7	0,1
P_1	462D39497F	755,1	869,2	884,0	15,1	1,7
P_3	462F245C6C	574,2	624,7	690,3	8,8	10,5
P_4	462E205F13	856,4	949,0	999,0	10,8	5,3
P_7	4657007600	576,4	705,4	731,5	22,4	3,7
P_8	46573 47E31	350,1	421,0	438,5	20,3	4,2
P_12	462C1F536B	476,7	509,0	518,0	6,8	1,8
P_13	4658233155	602,4	705,0	736,0	17,0	4,4
P_14	4658311369	640,6	736,3	789,0	14,9	7,2
P_15	462D6D5065	715,1	668,5	651,0	-6,5	-2,6
P_20	465719691A	389,4	453,9	436,0	16,6	-3,9

2.3.3 Determinazione della variabilità genetica della prole

Il livello di significatività dell'eterozigosi osservata (H_o) e attesa (H_e) rispetto all'equilibrio di Hardy Weinberg (HW) per ciascun locus microsatellite nei riproduttori (P) e nelle larve F1 è illustrato in Tab. 3. Negli individui parentali (P), 6 loci su 7 sono stati rinvenuti in equilibrio rispetto ad HW. Le larve provenienti da 2 emissioni (E2-E20) erano in equilibrio rispetto ad HW per 6 loci, 11 emissioni per 5 loci, 4 emissioni per 4 loci, 5 emissioni per 3 loci e 1 emissione era in equilibrio per 2 loci.

Tabella 3. Significatività dei coefficienti di Ho (eterozigosi osservata) e He (eterozigosi attesa) rispetto all'equilibrio di Hardy-Weinberg (HW) per ciascun locus microsatellite nei riproduttori (P) e nelle larve provenienti da 23 emissioni di uova (E1-E24) della stagione riproduttiva 2010. NS = non significativo, locus in equilibrio con HW; / = allele monomorfo; * P<0.05, ** P<0.01, * P<0.001 = livello di significatività dall'equilibrio di HW.**

	P	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E9	E10	E11	E12
Locus_A	ns	/	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Locus_G	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	/	/	ns	ns
Locus_1	***	ns	***	*	ns	**	***	**	ns	***	**	***
Locus_B	ns	*	ns	/	/	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Locus_C	ns	ns	ns	ns	ns	*	***	*	*	***	*	*
Locus_2	ns	*	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Locus_7	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns

	E13	E14	E15	E16	E17	E18	E19	E20	E21	E22	E23	E24
Locus_A	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Locus_G	/	/	ns	ns	/	ns	/	ns	ns	/	/	ns
Locus_1	***	ns	ns	**	/	***	/	ns	***	ns	/	/
Locus_B	ns	ns	/	ns	/	/	/	/	/	/	ns	/
Locus_C	*	**	ns	*	ns	ns	/	ns	ns	*	*	ns
Locus_2	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	*	**	ns
Locus_7	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	**	ns

2.4 Discussioni e conclusioni

Nel corso di alcuni anni di sperimentazione è stato dimostrato di poter adattare con successo alla cattività esemplari selvatici di sogliola comune (*Solea solea*) provenienti dal Nord Adriatico e di poter standardizzarne il ciclo riproduttivo. Le tecniche di cattura dall'ambiente selvatico e la successiva acclimatazione sono state efficaci nel garantire una bassa mortalità e limitare gli stress agli animali. Gli impianti a ricircolo, appositamente studiati per questa specie, sono risultati efficaci per mantenere in cattività 24 esemplari adulti durante 6 anni di sperimentazione, nel rispetto delle norme vigenti in materia di benessere degli animali impiegati a fine zootecnico.

La densità di allevamento, la sex ratio, la temperatura dell'acqua, la stagione riproduttiva, il fotoperiodo e l'alimentazione utilizzata nel presente studio, hanno permesso agli esemplari di accrescersi, raggiungere la completa maturità sessuale e riprodursi spontaneamente dopo 2 anni dalla cattura dall'ambiente selvatico. Tali risultati sono in accordo con quanto rinvenuto da Imsland et al., (2003) su esemplari di sogliola comune provenienti dal Mare del Nord. La

maggior velocità di crescita, registrata dagli esemplari nel primo anno di sperimentazione rispetto ai successivi periodi di osservazione, può essere attribuita all'età dei riproduttori non ancora in fase di maturità sessuale. La maggior velocità di crescita delle femmine rispetto ai maschi e il raggiungimento di un peso superiore ottenuto nel corso della prova sono in linea con quanto osservato in natura per questa specie (Rijnsdorp et al., 1992). L'indice di corpulenza delle femmine registrato nel periodo estivo è stato significativamente superiore rispetto a quello dei maschi in tutti gli anni di osservazione. Secondo le fonti bibliografiche rinvenute, è la prima volta che il CF viene documentato in esemplari riproduttori di sogliola comune mantenuti in cattività in 6 anni di osservazione. Poiché la tecnica di sessaggio mediante l'osservazione della cloaca è complessa ed invasiva, l'utilizzo del CF può essere utilizzato come ulteriore metodo di discriminazione dei sessi identificando la soglia entro cui rientrano solo le femmine.

Nel corso della stagione riproduttiva analizzata in questo studio, è stato possibile ottenere 350.000 larve generate da 23 emissioni fertili emesse spontaneamente. Tali risultati sono in accordo con le produzioni ottenute da un simile gruppo di riproduttori selvatici di *Solea solea* del Nord Atlantico, mantenuti in una delle poche avanotterie commerciali, Solea BV, Olanda, esistenti per questa specie.

I risultati dell'assegnazione parentale hanno evidenziato come l'accoppiamento naturale in cattività per questa specie non segua un modello di incroci uniformemente distribuito tra tutti gli individui. Una coppia di esemplari ha, infatti, prodotto più del 50% di tutta la prole derivata dalla stagione riproduttiva. Tuttavia tutti gli esemplari, ad eccezione di 1 femmina e 2 maschi, hanno contribuito alla generazione della prole. Questi risultati sono in accordo con uno studio condotto su riproduttori di sogliola comune provenienti dal Mare del Nord, dove una coppia di esemplari aveva prodotto più del 35% del totale della prole con 8 riproduttori su 25 che non erano intervenuti negli accoppiamenti (Blonk et al., 2009). Una condizione più estrema è stata rinvenuta su *Solea senegalensis* da Porta et al., (2006), dove solo una femmina e un maschio tra un gruppo di riproduttori avevano contribuito alla generazione della prole durante un'intera stagione riproduttiva.

Nel presente studio i loci microsatelliti analizzati nei riproduttori hanno mostrato un buon livello di variabilità genetica con solo un singolo locus (AC3) significativamente distante dall'equilibrio di Hardy-Weinberg (HW). Le larve provenienti da 13 emissioni hanno mostrato un buon livello di variabilità genetica con 5/6 loci in equilibrio di HW mentre le altre emissioni hanno mostrato una tendenza verso un calo di variabilità genetica.

La perdita di variabilità genetica dai parentali alla prole ai fini di consolidare il processo di standardizzazione della riproduzione in cattività, è stata rinvenuta in un altro studio su *Solea solea* (Blonk et al., 2009) e su altre specie affini: *Solea senegalensis* (Porta et al., 2007) e *Pleuronectes herzensteini* (Kim et al., 2007). Sebbene nel presente studio sia evidente la tendenza verso una minor variabilità genetica della prole rispetto ai parentali, il grado con cui questa si sia manifestata sembra essere inferiore a quello rinvenuto negli altri studi citati. Blonk et al., (2009) ha mostrato infatti una deviazione dall'equilibrio di HW per tutti i loci della prole analizzati ipotizzando che la diminuzione della variabilità genetica fosse stata causata da un basso numero di riproduttori intervenuti per singola emissione. Nel presente studio una media di 6 esemplari per emissione ha contribuito alla progenie (dati non illustrati). Tale valore è superiore a quello rinvenuto da Porta et al., (2007) dove 3 esemplari avevano contribuito alla produzione di tutte le emissioni di un'intera stagione riproduttiva.

In conclusione si può affermare che è stato possibile standardizzare la riproduzione in cattività della sogliola comune (*Solea solea*) in linea con altre specie ittiche marine di interesse commerciale per il Mediterraneo. Dai dati in nostro possesso, ad oggi non sono presenti lavori scientifici che illustrino un quadro complessivo di 6 anni di sperimentazione riguardanti la riproduzione della sogliola comune (*Solea solea*) in Italia. Le metodologie illustrate in passato per il ceppo atlantico di questa specie (Imstrand et al., 2003), risultano essere efficaci e trasferibili anche sul ceppo del Mediterraneo in particolare per quello del Nord Adriatico impiegato in questa sperimentazione. Come rinvenuto in altri studi per la stessa specie e specie affini, pochi esemplari risultano essere predominanti negli accoppiamenti e nel conseguente contributo alla produzione della prole. Questa predominanza sembra essere responsabile di una diminuzione della variabilità genetica della prole rispetto ai parentali, come rinvenuto per altre specie piatte riprodotte in cattività. Tuttavia, rispetto agli studi bibliografici presenti a tal riguardo per questa specie, il calo di variabilità genetica nella prole sembra essere inferiore. Il buon numero di parentali che hanno partecipato ad ogni singola emissione del presente studio sembra possa aver determinato il mantenimento di un buon livello di variabilità genetica per circa metà delle emissioni ottenute in un'intera stagione riproduttiva. Ulteriori studi di assegnazione parentale e di variabilità genetica saranno necessari nell'ottica di determinare efficaci criteri da utilizzarsi nella selezione di esemplari selvatici da rimonta.

2.5 Bibliografia

- Basurco, B., Lovatelli, A., 2003. The aquaculture situation in the Mediterranean Sea. Predictions for the future.
- Baynes, S.M., and Howell, B.R., 1993. Observations on the growth, survival and disease resistance of juvenile common sole, *Solea solea* (L.), fed *Mytilus edulis* L. Aquaculture Fish Management 24, 95–100.
- Belkhir, K., Borsa, P. L., Chikhi, N., Raufaste, F., Bonhomme, 2000. Genetix 4.02, logiciel sous windows tm pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, cnrs upr 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Blonk, R.J.W., Komen, J., Kamstra, A., Crooijmans, R.P.M.A., van Arendonk, J.A.M., 2009. Levels of inbreeding in group mating captive broodstock populations of Common sole, (*Solea solea*), inferred from parental relatedness and contribution. Aquaculture, 289, 26-31.
- Devauchelle, N., Alexandre, J.C., Le-Corre, N., Letty, Y., 1987. Spawning of sole (*Solea solea*) in captivity. Aquaculture 66, 125–147.
- Excoffier, L., G., Laval, S., Schneider, 2005: Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis – evolutionary bioinformatics online 1: 47-50.
- Frommen, J.G., 2008. Inbreeding depression affects fertilization success and survival but not breeding coloration in threespine sticklebacks. Behaviour 145, 425–441.
- Gallardo, J., 2004. Inbreeding and inbreeding depression of female reproductive traits in two populations of Coho salmon selected using BLUP predictors of breeding values. Aquaculture 234, 111–122.
- Garoia, F., Marzola, S., Guarniero, I., Trentini, M., Tinti, F., 2006. Isolation of polymorphic DNA microsatellites in the common sole *Solea vulgaris*. Molecular ecology notes 6, 144–146.
- Goudet, J., 2000. F-stat, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.1. Computer program and documentation distributed by the author, website: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Hill, W.G., 1981. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. Genetics Research, Cambridge 38, 209–216.

- Howell, B.R., 1997. A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture* 155, 359–369.
- Howell, B. R., Conceição, LEC, Prickett, R., Canavate, P., Mananos, E., Dinis, M.T., Valente, L., 2011. Proceedings of the V Workshop on the Cultivation of Soles. Centre of Marine Science (CCMAR), University of the Algarve, Faro, Portugal.
- Imsland, A.K., Foss, A., Conceicao, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P., 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S.senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13, 379–408.
- Iyengar, A., Piyapattanakorn, S., Stone, D.M., Heipel, D.A., Howell, B.R., Baynes, S.M., Maclean, N., 2000. Identification of microsatellite repeats in turbot (*Scophthalmus maximus*) and Dover sole (*Solea solea*) using a RAPD-Based technique: characterization of microsatellite markers in Dover sole. *Marine Biotechnology* 2, 49–56.
- Kim, S. G.; Morishima, K.; Satoh, N.; Fujioka, T.; Saito, S.; Arai, K., 2007: Parentage assignment in hatchery population of brown sole *Pleuronectes herzensteini* by microsatellite DNA markers. *Fisheries Science*. 73, 1087-1093.
- Komen, J., Bovenhuis, H., Van Arendonk, J.A.M., 2006. Consequences of reproductive characteristics for fish breeding schemes. *Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*.
- Konovalov, D.A., 2004. Kingroup: a program for pedigree relationship reconstruction and kingroup assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes* 4779–782.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*, 16, 1215.
- Peel, D., Ovenden, J.R., Peel, S.L., 2004. Neestimator: software for estimating effective population size, version 1.3. Queensland government, department of primary industries and fisheries. Available at <http://www2.dpi.qld.gov.au/fishweb/13887.html>.
- Porta, J., Porta, J.M., Martínez-Rodríguez, G., del Carmen Alvarez, M., 2006. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* 256, 159–166.
- Porta, J., Porta, J.M., Canavate, P., Martinez-Rodriguez, G., Alvarez, M.C., 2007. Substantial loss of genetic variation in a single generation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) culture: implications in the domestication process. *Journal of Fish Biology* 71, 223–234.

- Queller, D.C., Goodnight, K.F., 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43, 258-275.
- Raymond M., and Rousset F., 1995. Genepop (version 1.2), population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity* 86:248-249.
- Rice W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43:223-225.
- Rijnsdorp, A.D., Van Beek, F.A., Flatman, S., Millner, R.N., Riley, J.D., Giret, M. and de Clerck, R., (1992). Recruitment of sole stocks, *Solea solea* (L.), in the northeast Atlantic. *Netherlands Journal of Sea Research*. 29, 173-192.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R. Bell, J.G., 2002. The lipids. In: *Fish Nutrition*, 3rd edn (Halver, J.E. & Hardy, R.W. eds), pp. 181-257 Academic Press, San Diego, USA.
- Shipley, P., 2003. Micro-checker, version 2.2.3. University of Hull, U.K, <http://www.microchecker.hull.ac.uk/>.
- Villanueva, B., Verspoor, E., Visscher, P. M., 2002: Parental assignment in fish using microsatellite genetic markers with finite numbers of parents and offspring. *Animal Genetics* 33, 33-41.
- Waples, R.S., 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular ecology research*. 8:753-756.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

Capitolo III - Qualità delle uova: composizione lipidica e tenore di acidi grassi

3.1 Introduzione

La sogliola comune (*Solea solea*) è una specie candidata per l'allevamento su larga scala per l'elevata domanda e prezzo di mercato. Ad oggi le produzioni di acquacoltura per questa specie sono ancora molto scarse (Howell et al., 2011). Le tecniche di riproduzione della sogliola in cattività sono state messe a punto in passato come illustrato da Imsland et al., (2003). Sebbene sia possibile ottenere uova da riproduttori selvatici mantenuti in cattività, non sono presenti informazioni sulle tecniche di gestione dei riproduttori finalizzate al miglioramento della qualità delle uova. La produzione ed il miglioramento della qualità delle uova sono degli aspetti fondamentali nello sviluppo dell'allevamento di una specie ittica, in quanto influenzano la sopravvivenza larvale quindi la riuscita dell'intero processo produttivo. (Sargent et al., 1995; Gimenez et al., 2006). La qualità delle uova viene spesso correlata al contenuto dei lipidi ed alla composizione di acidi grassi in quanto questi influenzano l'embriogenesi, lo sviluppo larvale e le performance delle fasi larvali in allevamento (Sargent et al., 1995; Rainuzzo et al., 1997; Salze et al., 2005). Lo stato nutrizionale dei riproduttori è considerato uno dei fattori che maggiormente determinano la composizione e la qualità delle uova (Izquierdo et al., 2001). In alcune specie ittiche marine come negli sparidi, è stata dimostrata l'importanza nel fornire acidi grassi polinsaturi nella dieta dei riproduttori anche durante il periodo riproduttivo (Fernandez-Palacios et al., 1995). L'incorporazione di alti livelli di acidi grassi polinsaturi (PUFA), con più di 20 atomi di carbonio nella dieta dei riproduttori, influenza positivamente la fecondità, la fertilizzazione e la qualità delle uova in specie ittiche marine come il merluzzo (*Gadus morhua*) (Pavlov et al., 2004; Salze et al., 2005). Recenti studi su dentice (*Dentex dentex*) hanno dimostrato come sia possibile formulare delle correlazioni tra composizione lipidica delle uova e sopravvivenza larvale e che gli aspetti qualitativi e quantitativi di lipidi ed acidi grassi possano essere usati come potenziali indicatori per predire la qualità delle uova nei teleostei (Samaee et al., 2009). Per la sogliola comune non ci sono indicazioni precise sulla gestione dell'alimentazione dei riproduttori e sui requisiti nutrizionali che influenzano la qualità delle uova. Tuttavia lo sviluppo asincrono e continuo degli oociti durante la vitellogenesi di questa specie fa ipotizzare che l'alimentazione subito prima del periodo riproduttivo possa influenzare la composizione biochimica delle uova (Imsland et al., 2003). Recentemente è stato condotto uno studio che ha illustrato alcune differenze nella composizione acidica di uova di sogliola comune (*Solea solea*) ottenute da esemplari selvatici rispetto a quelle emesse da esemplari

allevati (Lund et al., 2008). Nella stessa ricerca, sebbene le larve provenienti da riproduttori selvatici abbiano mostrato una maggiore sopravvivenza, non sono presenti precise correlazioni tra contenuto acidico delle uova e sopravvivenza larvale.

Gli obiettivi di questo studio sono quelli di: (1) analizzare e caratterizzare la composizione lipidica e degli acidi grassi delle uova di sogliola comune (*Solea solea*) ottenute da un parco di riproduttori selvatici dell'Alto Adriatico adattati alla cattività; (2) definire delle relazioni tra contenuto di acidi grassi e sopravvivenza larvale; (3) valutare i cambiamenti della composizione acidica delle uova nel corso della stagione riproduttiva; (4) valutare la composizione lipidica e degli acidi grassi delle uova in funzione all'alimento somministrato ai riproduttori.

3.2 Materiali e Metodi

3.2.1 Gestione e alimentazione dei riproduttori

Un gruppo di 24 esemplari adulti di Sogliola comune (*Solea solea*) sono stati condizionati alla riproduzione in cattività per ottenere uova fertili nel corso della stagione riproduttiva del 2010. Il metodo di condizionamento e di induzione alla riproduzione è illustrato al Capito II. I riproduttori durante il periodo pre-riproduttivo (giugno-dicembre), sono stati alimentati ad libitum da 3 a 5 volte a settimana con pellets semi-umidi (Tab.1), mentre durante il periodo riproduttivo (gennaio-maggio) l'alimentazione è stata a base di molluschi e policheti.

3.2.2 Campionamento di uova e larve

Le uova sono state campionate quotidianamente nell'arco del periodo riproduttivo (marzo-maggio). Ogni *batch* di uova (uova emesse durante una notte e prelevate la mattina seguente nel raccoglitore a maglie da 500 μ m posto allo scarico della vasca dei riproduttori), veniva prelevato (ore 10:00 *a.m.*) dal raccoglitore mediante un retino e trasferito in un becker pre-tarato contenente acqua marina (T. 10.0°C, sal 38‰). Dopo averne registrato il peso, venivano prelevati 3 campioni per la determinazione della percentuale di fertilità e successivamente tutte le uova venivano trasferite in un cilindro tarato da 2 litri per effettuare la separazione della frazione galleggiante da quella affondante. Dopo averne registrati i rispettivi volumi, 20.0 grammi della componente galleggiante venivano campionati e stoccati a -80°C per le successive analisi degli acidi grassi e delle classi fosfolipidiche. Contemporaneamente,

dalla componente galleggiante venivano prelevati 3 sotto-campioni di uova destinati ad essere incubati in piastre a 96 pozzetti per la determinazione degli indici di sopravvivenza embrionale (SR). Le uova galleggianti in eccesso, appartenenti a singole emissioni, sono state incubate in un singolo-corrispondente incubatoio secondo la metodologia e le condizioni ambientali esposti nel Capito II. Alla schiusa le larve sono state mantenute nei medesimi incubatoi alle stesse condizioni ambientali utilizzate per le uova, al fine di permettere il normale processo di riassorbimento del sacco vitellino. Al termine del riassorbimento del sacco vitellino e al momento dell'apertura dell'apparato boccale (4 giorni dopo la schiusa) le larve appartenenti a ciascuna emissione sono state sottoposte a *stress test* di resistenza.

3.2.3 Determinazione della percentuale di fertilità

Tre sotto campioni di uova (~100 uova) di ciascun *batch* sono stati prelevati dal totale di uova raccolte e analizzati per la determinazione della percentuale di fertilità (FR %). Le uova che mostravano segmentazione cellulare in seguito all'osservazione allo stereomicroscopio venivano caratterizzate come fertili. Il numero totale di uova fertili per ogni emissione è stato determinato considerando 550 uova/grammo (Blonk et al., 2009).

3.2.4 Incubazione delle uova per la determinazione degli indici di sopravvivenza embrionale

Tre sotto-campioni (~300) di uova per ogni *batch* sono stati prelevati dalla componente galleggiante e sono stati disposti in 3 piastre da 96 pozzetti. Un singolo uovo veniva posto in un pozzetto mediante l'ausilio di una pipetta pasteur. In ciascuna piastra venivano collocate 96 uova. I pozzetti venivano riempiti con 0.5 ml di acqua marina filtrata (T. 10°C, sal. 38‰) e sterilizzata da raggi ultravioletti. Le piastre venivano in seguito incubate a 10°C. Quotidianamente le uova sono state osservate allo stereo-microscopio, indicando come vitali le uova galleggianti e trasparenti e come morte quelle opache ed affondanti. Durante l'osservazione allo stereo-microscopio, le piastre venivano collocate su di un sottile strato di acqua a temperatura di 8-10 °C al fine di prevenire shock termici. L'osservazione è proseguita fino a 5 giorni dopo la schiusa al fine di valutare la sopravvivenza delle larve. Al termine del periodo di osservazione, sono state calcolate la percentuale di schiusa delle uova (*hatching rate* HR %) e la percentuale di sopravvivenza delle larve (SR %) al giorno 0 (giorno della schiusa) e ai giorni 1, 2, 3, 4, 5 (giorni dopo la schiusa), (Samaee et al., 2009).

Poichè la sopravvivenza larvale durante i primi giorni dopo la schiusa è considerato un valido indicatore della qualità delle uova, (Samaee et al., 2009), la sopravvivenza larvale a 3 giorni dopo la schiusa (SR3) è stata usata come criterio per classificare le uova. Tredici emissioni sono state quindi classificate in bassa qualità (SR3 < 3%; n=12), media (3 % < SR3 < 10%; n=5) e alta (SR3 > 10%; n=3).

3.2.5 Valutazione degli acidi grassi e delle classi fosfolipiche nel corso della stagione riproduttiva

Al fine di valutare l'andamento quali-quantitativo degli acidi grassi e delle classi fosfolipiche delle uova nel corso della stagione riproduttiva, le emissioni sono state classificate per periodo di deposizione. Sono state condotte due differenti classificazioni: una per la valutazione degli acidi grassi e una per quella delle classi fosfolipidiche.

Classificazione per l'analisi degli acidi grassi:

- 1° Periodo: emissioni ottenute in data 8-11-12-13-14-15-16-17-18-19 marzo 2010
- 2° Periodo: emissioni ottenute in data 27-28-29-30-31 marzo e 1-6-7-9 aprile 2010
- 3° Periodo: emissioni ottenute in data 25 aprile, 1-2 maggio

Classificazione per l'analisi delle classi fosfolipidiche:

- 1° Periodo: emissioni ottenute in data 11-15-18 marzo 2010
- 2° Periodo: emissioni ottenute in data 27 marzo e 1-4-5 aprile 2010
- 3° Periodo: emissioni ottenute in data 25 aprile, 2-6 maggio 2010

Le classi fosfolipidiche prevalenti (fosfatidil-colina PC, fosfatidil-inositolo PI, fosfatidil-etanolamina PE) sono state inoltre caratterizzate per il profilo acido.

3.2.6 Test di stress

Le larve (4 giorni dopo la schiusa) appartenenti a ciascuna emissione di uova sono state sottoposte ad un test di resistenza alla salinità di 70‰. Dieci larve sono state trasferite in un *beaker* di plastica contenente 300ml di acqua marina a 15 °C e ad una salinità di 70 g L⁻¹ misurata per mezzo di un rifrattometro (Milwaukee MR100ATC, Gallarate, Italy). La mortalità è stata monitorata ad intervalli di 10 minuti nell'arco di 30, 60 e 120 minuti. Le larve venivano considerate morte quando diventavano opache e non rispondevano con alcun movimento in seguito allo stimolo tattile esercitato con una pipetta. Il test è stato condotto con 5 replicati per ogni lotto di larve. La sensibilità allo stress è stata espressa come indice di

mortalità cumulativa (Cumulative Stress Index; CSI), ottenuto dalla somma degli episodi di mortalità avvenuti ad ogni intervallo di monitoraggio secondo il metodo di Dhert et al., (1992). Gli indici di mortalità cumulativa (CSI) delle larve sono stati messi in rapporto con il tenore di acidi grassi delle uova di appartenenza per valutarne il grado di correlazione.

3.2.7 *Analisi chimiche*

Il mangime somministrato ai riproduttori (mitili, policheti e mangime formulato) unitamente alle uova, sono stati analizzati per la composizione della centesimale e degli acidi grassi. L'umidità (AOAC 2000a) del mangime formulato è stata determinata in duplicato mentre i mitili, i policheti e le uova sono stati liofilizzati tramite un liofilizzatore, Heto Drywinner (Heto-Holten A/S Allerød, Denmark) e dopo 24 ore essiccati in stufa a 60 °C per 5 ore. Le proteine (AOAC, 2000b) e le ceneri (AOAC, 2000c) sono state determinate in duplicato per il mangime formulato, i mitili e i policheti. L'estrazione dei lipidi del mangime, dei mitili, dei policheti e delle uova è avvenuta secondo Bligh and Dyer (1959) utilizzando cloroformio e metanolo come solventi. La metilazione degli acidi grassi (FAME) dai lipidi totali è avvenuta utilizzando una soluzione metilante di metanolo e acido solforico (1%) in accordo con Christie (1989). L'analisi cromatografica è stata condotta con un gas-cromatografo Varian (Varian Inc. Palo Alto, USA), dotato di una colonna capillare di silice DB-23 J &W Scientific (30 m x 0.25 mm), un iniettore di fase a 230 °C e un detector a ionizzazione di fiamma a 300 °C.

Come *gas carrier* è stato utilizzato l'azoto con un flusso di 1,2 ml/min mentre la temperatura è stata programmata per variare da 150 a 230°C ad una velocità di 5°C/min. I dati ottenuti sono stati elaborati con Varian Star Chromatography Workstation. L'identificazione degli acidi grassi è stata eseguita tramite comparazione con la cromatografia di standard noti di metil-esteri (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA; PUFA No1, Marine Source, and PUFA No3, Menhaden Oil, SUPELCO, Inc., Bellefonte, PA, USA).

La separazione delle classi fosfolipidiche è stata effettuata tramite cromatografia unidimensionale su strato sottile (TLC), utilizzando lastre Merck 20x20 cm con uno strato di gel di silice 60 di spessore di 0,25 mm e come eluente la miscela etilacetato: isopropanolo: cloroformio: metanolo: KCl 0,25% (p/v) nelle proporzioni 25:35:20:10:10 v/v (Miwa H. et al., 1996, Cejas et al., 2003), addizionata dello 0,001% di una soluzione metabolica di BHT 1% (p/v).

Le bande ottenute sono state successivamente raschiate per l'estrazione della classe fosfolipidica utilizzando la metodica di Folch (Folch et al., 1957). La quantificazione delle classi fosfolipidiche precedentemente ottenute è avvenuta usando la metodica di Fiske e Subbarow (1925). La lettura è avvenuta mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro a lunghezza d'onda di 830 nm.

3.2.8 Analisi statistiche

La concentrazione dei lipidi, degli acidi grassi e delle classi fosfolipidiche delle emissioni di uova classificate per periodo e per grado di qualità, sono state analizzate mediante l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal *post test* di Tukey's. I valori percentuali sono stati trasformati in arcoseno prima di essere sottoposti a suddetta analisi. Le relazioni intercorrenti tra gli acidi grassi e il grado di sopravvivenza larvale a 0, 1, 2 e 3 giorni dopo la schiusa e tra acidi grassi e resistenza allo stress (CSI), sono stati analizzati mediante regressione lineare, utilizzando la concentrazione di lipidi e di acidi grassi come variabile indipendente. Un valore di $P \leq 0.05$ è stato considerato come livello di significatività.

3.3 Risultati

3.3.1 Emissioni di uova e percentuale di fertilità

Nel corso della stagione riproduttiva (marzo-maggio 2010) sono state deposte un totale di 2.200.000 uova con una fertilità complessiva pari al 18.1 % ed una percentuale di schiusa (HR) complessiva pari a 16.1%. Le emissioni sono state spontanee e sono avvenute a cadenza giornaliera in una fascia temporale di 67 giorni compresa tra il 3 marzo e il 13 maggio ad una temperatura compresa tra i 7.6 e i 12.0 °C. L'andamento delle emissioni ha mostrato in termini quantitativi 2 picchi rispettivamente tra il 12 e il 20 marzo, e tra l'1 ed il 6 aprile. La percentuale di fertilità ottenuta nel mese di marzo è stata superiore a quella registrata nei mesi successivi (Fig. 1).

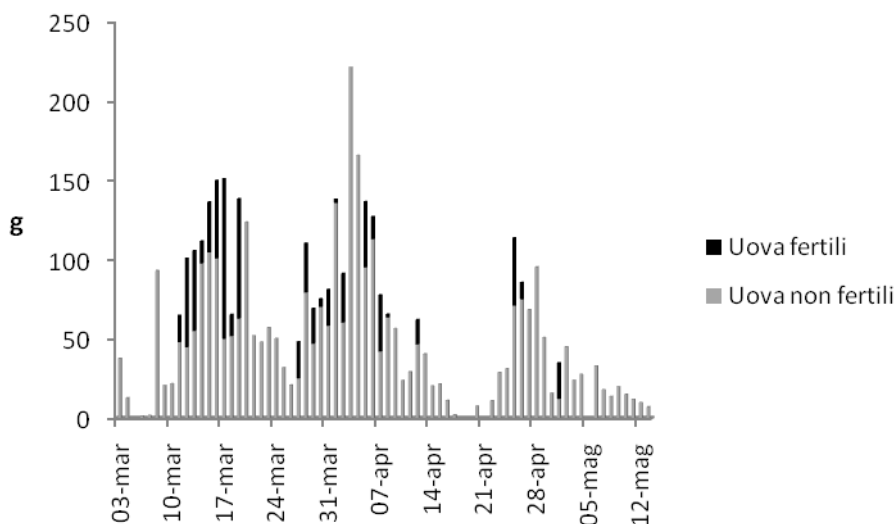


Figura 1. Andamento delle emissioni di uova ottenute da 24 riproduttori nel corso della stagione riproduttiva dell'anno 2010.

3.3.2 Caratterizzazione qualitativa e quantitativa di lipidi e acidi grassi

Ventidue emissioni di uova sono state analizzate per determinare il contenuto lipidico e caratterizzare il profilo degli acidi grassi. Dieci emissioni sono state selezionate per la determinazione delle classi fosfolipidiche. La percentuale media dei lipidi di tutte le emissioni analizzate è mostrata in Tab. 1 ed è stata rinvenuta nel range compreso tra 16.8 e 20.3% della sostanza secca. Dal punto di vista qualitativo i lipidi hanno mostrato una componente di fosfolipidi (PL) pari al 37.62% dei lipidi totali.

Tabella 1. Composizione centesimale e profilo degli acidi grassi della dieta somministrata ai riproduttori di sogliola comune (*Solea solea*) nel periodo pre-riproduttivo e riproduttivo e delle uova emesse nell'arco della medesima stagione riproduttiva (anno 2010).

	Mangime formulato N=3	Mitili N=3	Policheti N=3	Uova N=22
Umidità	42.09 ± 0.89	/	/	/
Proteine	35.97±1.32	46.38 ± 12.6	59.07 ± 4.39	/
Lipidi	9.50 ± 0.34	12.67 ± 2.78	14.75 ± 2.03	18.50 ± 0.97
Ceneri	9.20 ± 0.30	7.45 ± 1.49	12.29 ± 3.17	/
Acidi grassi				
14:0	2.16 ± 0.04	3.34 ± 1.38	1.06 ± 0.11	1.25 ± 0.08
15:0	0.31 ± 0.00	0.43 ± 0.05	0.31 ± 0.06	0.37 ± 0.03
16:0	13.21 ± 0.19	14.08 ± 1.19	16.85 ± 1.56	15.27 ± 0.70
17:0	0.60 ± 0.01	0.68 ± 0.32	0.55 ± 0.15	0.23 ± 0.03
18:0	4.02±0.04	3.17 ± 1.28	3.51 ± 0.25	3.40 ± 0.16
Saturi totali	20.30± 0.19	21.70 ± 1.43	22.28 ± 1.33	20.52 ± 0.68
16:1 n-7	3.26 ± 0.03	16.70 ± 9.18	4.86 ± 1.32	5.23 ± 0.41
18:1 n-9	12.86 ± 0.13	1.40 ± 0.05	9.57 ± 0.66	12.12 ± 0.41
18:1 n-7	2.07±0.01	2.98 ± 0.37	6.68 ± 0.88	4.53 ± 0.24
20:1 n-11	0.04 ± 0.00	0.88 ± 0.35	3.18 ± 0.27	0.33 ± 0.07
20:1 n-9	0.21 ± 0.01	1.31 ± 0.59	3.00 ± 0.25	0.83 ± 0.12
20:1 n-7	1.50 ± 0.01	1.50 ± 0.26	0.45 ± 0.07	0.36 ± 0.04
22:1 n-11	0.80 ± 0.04	/	0.98 ± 0.07	0.13 ± 0.02
22:1 n-9	0.16 ± 0.02	/	0.21 ± 0.05	0.08 ± 0.01
Monoinsaturi				
totali	20.90 ± 0.12	24.77 ± 8.33	28.94 ± 2.12	23.62 ± 0.76
18:2 n-6	8.28 ± 0.05	1.01 ± 0.01	5.08 ± 0.49	4.98 ± 0.24
20:2 n-6	/	/	/	1.12 ± 0.28
20:4 n-6	1.87 ± 0.03	1.82 ± 1.62	0.74 ± 0.10	2.21 ± 0.10
22:4 n-6	1.11 ± 0.02	/	/	0.34 ± 0.05
22:5 n-6	/	/	/	0.68 ± 0.05
Totali n-6 PUFA	11.25 ± 0.03	2.83 ± 1.61	6.62 ± 0.27	9.33 ± 0.26
18:3 n-3	1.43 ± 0.02	0.52 ± 0.19	1.05 ± 0.08	0.78 ± 0.12
18:4 n-3	0.97 ± 0.01	2.63 ± 1.10	0.38 ± 0.08	0.32 ± 0.04
20:4 n-3	/	0.46 ± 0.13	/	0.42 ± 0.02
20:5 n-3	8.78 ± 0.14	17.68 ± 2.58	6.93 ± 1.83	4.01 ± 0.27
22:5 n-3	2.39 ± 0.04	0.86 ± 0.65	1.93 ± 0.42	5.32 ± 0.33
22:6 n-3	26.05 ± 0.39	7.77 ± 2.09	0.75 ± 0.23	26.43 ± 1.63
Totali n-3 PUFA	39.62 ± 0.29	29.92 ± 3.74	11.68 ± 2.31	37.28 ± 1.85
n-6/n-3	0.28 ± 0.00	0.09 ± 0.04	0.58 ± 0.14	0.25 ± 0.01
DHA/EPA	2.97 ± 0.08	0.44 ± 0.07	0.21 ± 0.05	6.64 ± 0.65
EPA/AA	4.70 ± 0.05	14.34 ± 7.76	9.47 ± 2.56	1.83 ± 0.18

Le classi fosfolipidiche analizzate hanno mostrato un livello quantitativo secondo il seguente ordine decrescente: fosfatidil-colina (PC), fosfatidil-etanolamina (PE), fosfatidil-inositolo (PI) e fosfadil-serina (PS), (Tab. 2).

Il profilo qualitativo e quantitativo degli acidi grassi di tutte le emissioni analizzate è illustrato in Tab.1. A livello quantitativo il profilo degli acidi grassi ha mostrato una predominanza degli acidi grassi polinsaturi della serie n-3 (PUFA n-3, 37.28 ± 1.85 % sui lipidi totali), seguito dai monoinsaturi (MUFA; 23.62 ± 0.76 %), saturi (SFA; 20.52 ± 0.68 %) e polinsaturi della serie n-6 (PUFA n-6; 9.33 ± 0.26). Il DHA (22:6 n-3), l'acido linoleico (LA, 18:2 n-6) , l'acido oleico (OA, 18:1 n-9) e l'acido palmitico (PA, 16:0) sono stati gli acidi grassi maggiormente presenti rispettivamente per i PUFA n-3, i PUFA n-6, i MUFA e i SFA. Il DHA è stato il più abbondante tra tutti gli acidi grassi rinvenuti nelle uova di sogliola comune (*Solea solea*).

Tabella 2. Contenuto dei lipidi totali (LT, % sulla sostanza secca), dei fosfolipidi (PL, % LT) e delle classi fosfolipidiche (% LT): fosfatidil-colina (PC), fosfatidil-serina (PS), fosfatidil-inositolo (PI), fosfatidil-etanolamina (PE).

	1° Periodo	2° Periodo	3° Periodo	Emissioni totali
	Media \pm SD	Media \pm SD	Media \pm SD	Mean \pm SD
	N=3	N=4	N=3	N=10
Lipidi	18.8 ± 0.5	19.0 ± 1.1	18.8 ± 1.4	18.8 ± 1.03
Fosfolipidi	37.5 ± 2.6	37.0 ± 4.2	38.4 ± 3.6	37.62 ± 3.49
Classi Fosfolipidiche				
PC	25.7 ± 2.2	25.3 ± 2.5	27.2 ± 2.9	26.08 ± 2.56
PS	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.1	0.6 ± 0.3	0.61 ± 0.13
PI	3.1 ± 0.2	2.9 ± 0.7	3.0 ± 0.2	3.03 ± 0.39
PE	8.0 ± 0.7	8.0 ± 0.9	7.7 ± 1.1	7.91 ± 0.90

3.3.3 Relazioni intercorrenti tra i lipidi e gli acidi grassi delle uova con gli indici di sopravvivenza embrionale

Le relazioni intercorrenti tra lipidi/acidi grassi e gli indici di sopravvivenza embrionale sono stati effettuati confrontando, mediante l'analisi della varianza, le medie delle concentrazioni di lipidi e acidi grassi di 3 classi di uova ottenute selezionando le uova sulla base della sopravvivenza embrionale al 3° giorno SR3, (bassa, media, alta qualità) (Tab. 3). Inoltre sono state determinate relazioni mediante la regressione lineare.

Il profilo quantitativo degli acidi grassi (in emissioni aventi differenti qualità) e le differenze tra esse, sono illustrati in Tab.4. Il contenuto di DHA e dei PUFA n-3 è risultato significativamente inferiore nelle uova appartenenti alla classe con alto SR3 (alta qualità) rispetto a quelle con medio e basso SR3. Il rapporto DHA/EPA è risultato significativamente inferiore nelle classi con basso ed alto SR3, mentre non sono state registrate differenze con la classe di medio SR3.

Analizzando le relazioni intercorrenti (regressione lineare) tra la concentrazione degli acidi grassi (variabile indipendente) e gli indici di sopravvivenza embrionale (variabile dipendente), sono emerse delle interazioni significative ($P \leq 0.05$) (Fig. 2, 3, 4). Nei modelli analizzati, la sopravvivenza larvale al 1°, 2° e 3° giorno dopo la schiusa (SR1, SR2, SR3) ha mostrato un andamento inversamente proporzionale rispetto alla concentrazione di DHA rinvenuto nelle corrispondenti uova (Fig. 2 c,d,e). Lo stesso andamento è stato rinvenuto per SR2 e SR3 rispetto al rapporto DHA/EPA (Fig. 2 a,b) e per SR0, SR1, SR2 e SR3 rispetto alla concentrazione di PUFA n-3 (Fig. 3 a,b,c,d). Al contrario, è stato registrato un aumento degli indici di sopravvivenza larvale con l'aumentare della concentrazione di acido miristico (Fig. 4 a,b) e del totale dei monoinsaturi (MUFA) (Fig. 4 c,d,e.).

Tabella 3. Quantità delle uova emesse per singola emissione (*batch, g*); indice di galleggibilità (FR %); indice di schiusa (HR%) e percentuale di sopravvivenza larvale dal giorno 0 al 5° giorno dopo la schiusa (SR0-5 %). Alta qualità (SR3 > 10%), Media qualità (3 < SR3 < 10%) Bassa qualità (SR3 < 3%)

No	Data emissione	Quantità emissione	Qualità uova	FR	HR	SR0	SR1	SR2	SR3	SR4	SR5
					Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	Media ± SD	
1	03-03-2010	37.8	-	-	27.8 ± 22.3	24.7 ± 21.4	22.6 ± 19.6	11.1 ± 9.8	2,8 ± 2.4	0.0 ± 0.0	
2	08-03-2010	93.2	Alta	78.9	39.2 ± 4.3	38.2 ± 5.1	37.2 ± 5.1	26.4 ± 9.1	12.5 ± 15.6	8.0 ± 12.9	5.7 ± 8.1
3	11-03-2010	62.1	Bassa	41.2	14.6 ± 2.1	14.6 ± 2.1	11.5 ± 1.8	8.0 ± 3.2	2.8 ± 2.2	0.3 ± 0.6	0.3 ± 0.6
4	12-03-2010	101.0	Media	55.0	36,1 ± 12.1	34.4 ± 11,0	22.6 ± 7.7	11.8 ± 5.3	3.8 ± 2.2	0.7 ± 1.2	0.3 ± 0.6
5	13-03-2010	105.9	Media	51.5	54,5 ± 4.2	51.7 ± 3,7	42.4 ± 9.6	19.1 ± 21.7	4.9 ± 7.5	1.4 ± 2.4	0.0 ± 0.0
6	14-03-2010	111.9	Media	19.6	24,7 ± 1.6	23.6 ± 2,2	22.2 ± 0.6	14.6 ± 4.5	3.8 ± 3.9	0.0 ± 0.0	
7	15-03-2010	136.6	Bassa	40.1	34,0 ± 11.2	33.7 ± 10,6	28.8 ± 11.1	16.7 ± 2.8	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0	
8	16-03-2010	150.1	Bassa	46.4	39,2 ± 6.4	33.3 ± 14,0	14.6 ± 13.1	4.5 ± 6.9	0.7 ± 1.2	0.5 ± 0.7	0.3 ± 0.6
9	17-03-2010	151.1	Bassa	60.0	29,5 ± 4.2	22.9 ± 2,1	12.8 ± 4.2	3.8 ± 4.9	1.4 ± 2.4	0.0 ± 0.0	
10	18-03-2010	65.5	Bassa	52.5	13,9 ± 3.2	11.8 ± 2.2	8.7 ± 0.6	4.5 ± 1.6	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0	
11	19-03-2010	138.6	Bassa	29.6	1,0 ± 1.0	1.0 ± 1.0	1.0 ± 1.0	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0		
12	27-03-2010	48.3	Bassa	63.6	36,1 ± 5.1	27.4 ± 4.7	17.0 ± 14.2	4.9 ± 6.6	0.7 ± 1.2	0.3 ± 0.6	
13	28-03-2010	110.6	Media	57.7	45,5 ± 10.8	44.8 ± 11,0	43.4 ± 12.6	30.9 ± 10.5	7.6 ± 5.2	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0
14	29-03-2010	69.4	Alta	55.6	54,9 ± 9.3	53.1 ± 9.1	44.8 ± 3.1	31.3 ± 4.5	11.1 ± 10.1	1.7 ± 1.6	0.0 ± 0.0
15	30-03-2010	75.5	Bassa	64.7	7,3 ± 3.1	6.9 ± 2.6	5.2 ± 1.0	3.8 ± 1.2	2.8 ± 1.6	0.3 ± 0.6	0.0 ± 0.0
16	31-03-2010	81.4	Bassa	38.1	23,3 ± 5.3	22.2 ± 5.1	17.4 ± 9.3	8.0 ± 7.5	0.0 ± 0.0		
17	01-04-2010	138.3	Bassa	38.5	0,7 ± 1.2	0,3 ± 0.6	0.0 ± 0.0				
22	06-0-20104	127.3	Bassa	38.0	5,6 ± 2.6	5.2 ± 3.1	4.5 ± 3.3	0.0 ± 0.0			
23	07-04-2010	77.9	Media	44.4	60,4 ± 1.8	55.2 ± 4.5	41.7 ± 8.3	19.1 ± 8.9	4.9 ± 4.2	0.7 ± 1.2	0.0 ± 0.0
24	08-04-2010	65.7	Bassa	38.9	12,2 ± 4.2	11,8 ± 3.7	8.7 ± 6.8	0.0 ± 0.0			
25	25-04-2010	114.0	Bassa	34.8	77,4 ± 4.3	70.8 ± 11.5	47.2 ± 16.2	9.7 ± 7.8	0.0 ± 0.0		
26	01-05-2010	35.0	Alta	14.3	67,7 ± 2.8	66.7 ± 3.8	64.2 ± 4.7	49.7 ± 2.6	13.2 ± 7.5	1.0 ± 1.8	0.3 ± 0.6
27	02-05-2010	45.1	Bassa	25.0	4,9 ± 2.6	4.9 ± 2.6	4.5 ± 2.6	3.8 ± 1.6	2.4 ± 2.6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0

Tabella 4. Lipidi (% sulla sostanza secca) e composizione degli acidi grassi (% acidi grassi metil-esteri, FAME) di uova di sogliola comune (campionate 6-12 ore dopo la fertilizzazione) con differenti qualità (basso, medio e alto indice di sopravvivenza al 3° giorno dopo la schiusa). Dati con lettere differenti in apice tra le colonne sono statisticamente differenti ($P \leq 0.05$).

	Basso SR3	Medio SR3	Alto SR3
	Media \pm SD	Media \pm SD	Media \pm SD
	n=12	n=5	n=3
Lipidi (%)	18.76 \pm 0.81	18.76 \pm 0.64	18.79 \pm 1.69
Acidi grassi (% FAME)			
14:0	1.18 \pm 0.10	1.18 \pm 0.09	1.40 \pm 0.09
15:0	0.35 \pm 0.02	0.36 \pm 0.01	0.38 \pm 0.06
16:0	15.10 \pm 0.39	15.00 \pm 0.68	15.20 \pm 2.17
17:0	0.17 \pm 0.12	0.12 \pm 0.03	0.25 \pm 0.22
18:0	3.30 \pm 0.23	3.24 \pm 0.17	3.74 \pm 0.07
16:1 n-7	4.86 \pm 0.49	4.76 \pm 0.76	5.76 \pm 0.85
18:1 n-9	12.34 \pm 0.66	12.27 \pm 0.64	12.01 \pm 0.49
18:1 n-7	4.38 \pm 0.28	4.63 \pm 0.41	5.05 \pm 0.59
20:1 n-11	0.28 \pm 0.09	0.28 \pm 0.09	0.46 \pm 0.11
20:1 n-9	0.80 \pm 0.23	0.86 \pm 0.04	0.88 \pm 0.08
20:1 n-7	0.34 \pm 0.04	0.35 \pm 0.06	0.42 \pm 0.06
22:1 n-11	0.14 \pm 0.02	0.14 \pm 0.03	0.13 \pm 0.03
22:1 n-9	0.09 \pm 0.02	0.08 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02
18:2 n-6	5.22 \pm 0.52	5.40 \pm 0.38	4.66 \pm 0.38
20:2 n-6	1.01 \pm 0.16	1.04 \pm 0.34	1.54 \pm 0.62
20:4 n-6 (AA)	2.28 \pm 0.14	2.28 \pm 0.15	2.11 \pm 0.46
22:4 n-6	0.36 \pm 0.07	0.41 \pm 0.05	0.41 \pm 0.17
22:5 n-6	0.74 \pm 0.10	0.75 \pm 0.12	0.62 \pm 0.12
18:3 n-3	0.75 \pm 0.27	0.85 \pm 0.08	0.81 \pm 0.17
18:4 n-3	0.30 \pm 0.07	0.32 \pm 0.06	0.31 \pm 0.09
20:4 n-3	0.44 \pm 0.05	0.46 \pm 0.04	0.41 \pm 0.06
20:5 n-3 (EPA)	3.95 \pm 0.30	4.23 \pm 0.34	4.17 \pm 0.46
22:5 n-3 (DPA)	5.21 \pm 0.59	4.98 \pm 0.29	5.09 \pm 0.56
22:6 n-3 (DHA)	27.79 ^b \pm 1.37	26.78 ^b \pm 2.04	22.97 ^a \pm 1.61
SFA	20.10 \pm 0.66	19.90 \pm 0.66	20.97 \pm 2.38
MUFA	23.24 \pm 0.72	23.38 \pm 0.78	24.78 \pm 0.46
PUFA n-6	9.61 \pm 0.64	9.88 \pm 0.35	9.34 \pm 1.11
PUFA n-3	38.43 ^b \pm 1.25	37.60 ^b \pm 1.41	33.75 ^a \pm 1.37
n-6/n-3	0.25 \pm 0.02	0.26 \pm 0.01	0.28 \pm 0.04
DHA/EPA	7.07 ^b \pm 0.60	6.39 ^{ab} \pm 0.94	5.58 ^a \pm 0.97
EPA/AA	1.74 \pm 0.15	1.87 \pm 0.27	2.06 \pm 0.61

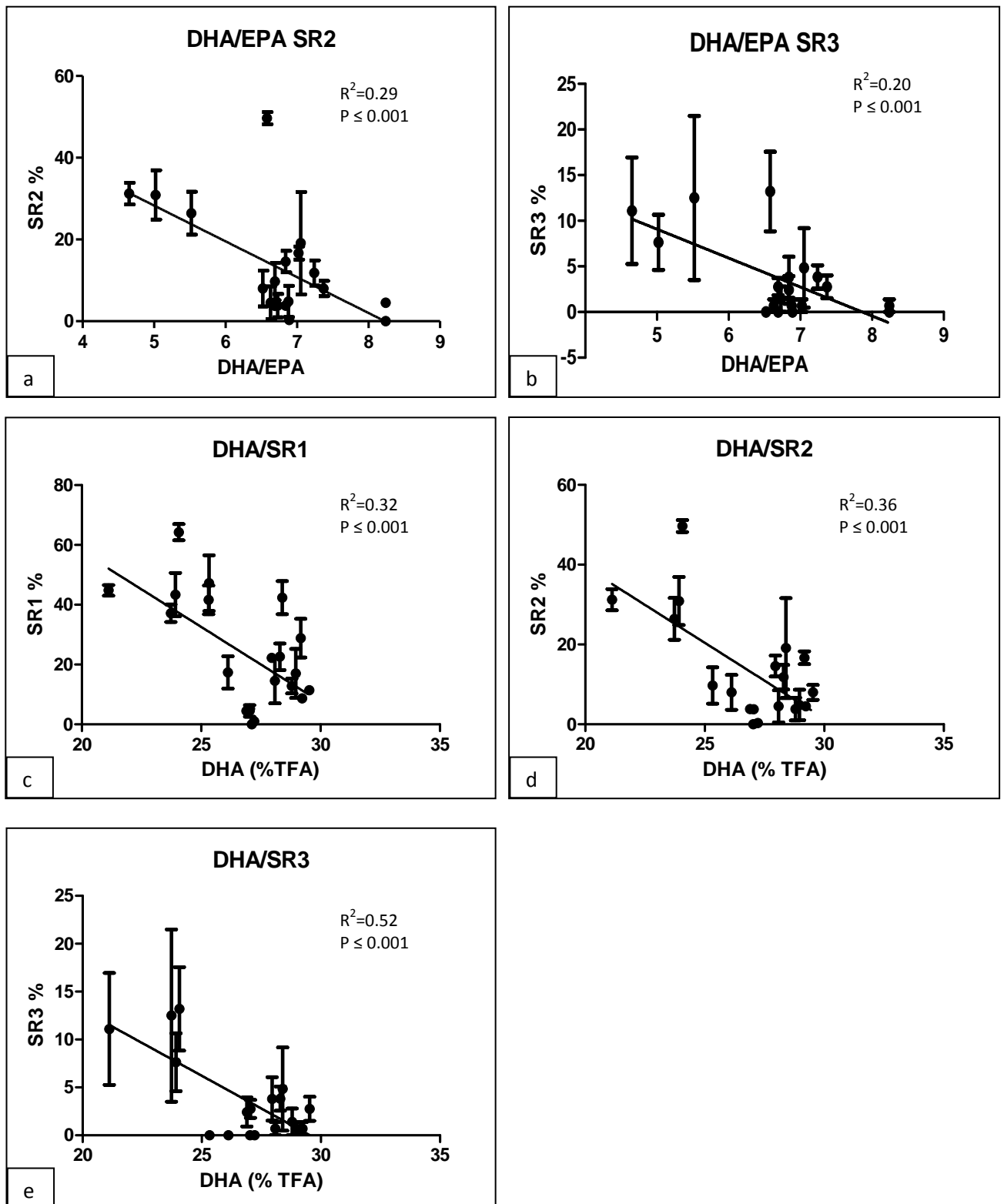


Fig 2. Relazioni intercorrenti tra sopravvivenza larvale e relativo contenuto in acidi grassi delle uova (numero campioni N=21). SR1: percentuale di sopravvivenza al giorno 1 dopo la schiusa; SR2: percentuale di sopravvivenza al giorno 2 dopo la schiusa; SR3: percentuale di sopravvivenza al giorno 3 dopo la schiusa. TFA: acidi grassi totali, DHA: 22:6 n-3, EPA: 20:5 n-3.

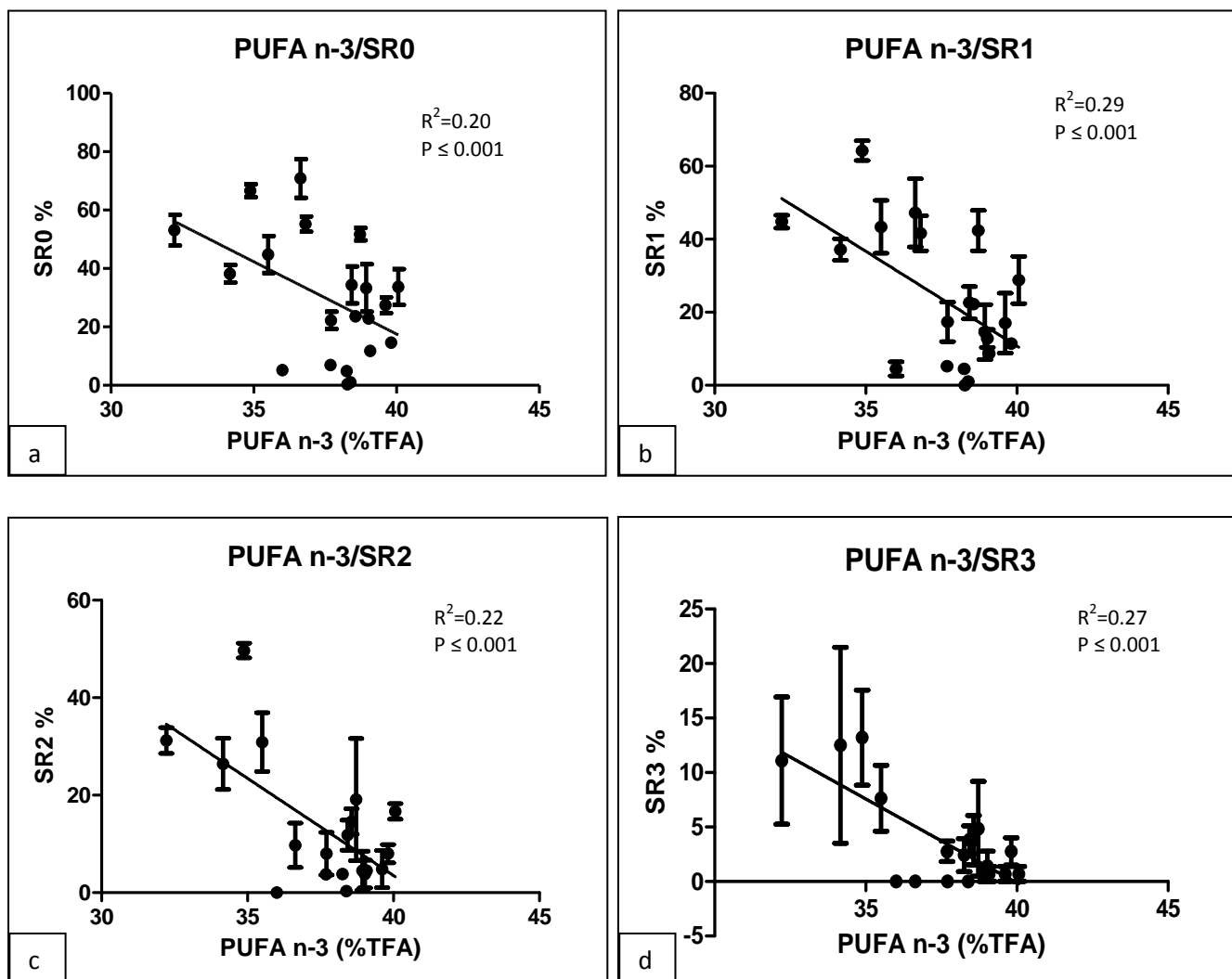


Figura 3. Relazioni intercorrenti tra sopravvivenza larvale e relativo contenuto in acidi grassi delle uova (numero campioni N=21). SR0: percentuale di sopravvivenza al giorno di schiusa; SR1: percentuale di sopravvivenza al giorno 1 dopo la schiusa; SR2: percentuale di sopravvivenza al giorno 2 dopo la schiusa; SR3: percentuale di sopravvivenza al giorno 3 dopo la schiusa. TFA: acidi grassi totali. PUFA n-3: acidi grassi polinsaturi della serie n-3.

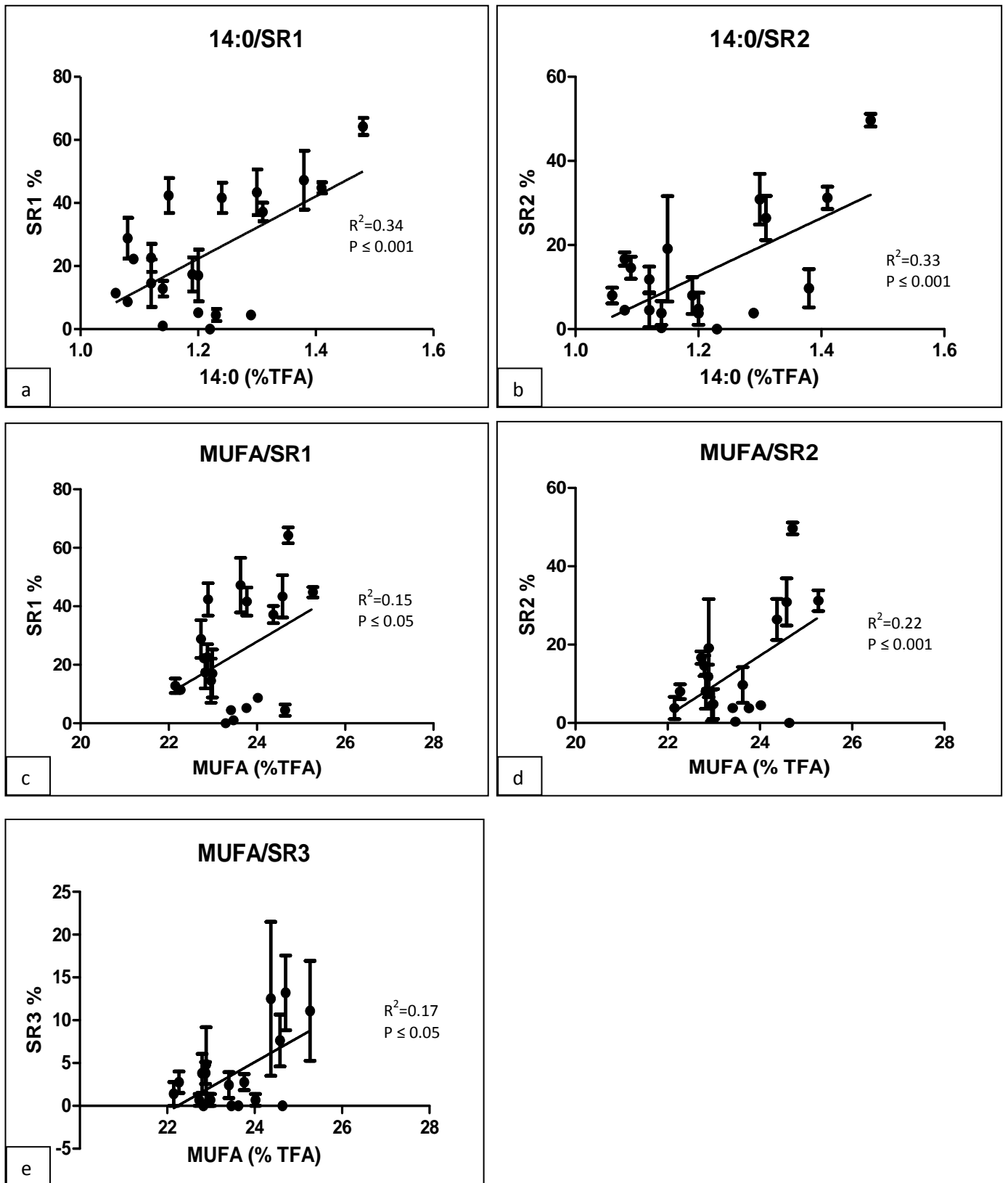


Figura 4. Relazioni intercorrenti tra sopravvivenza larvale e relativo contenuto in acidi grassi delle uova (numero campioni N=21). SR0: percentuale di sopravvivenza al giorno di schiusa; SR1: percentuale di sopravvivenza al giorno 1 dopo la schiusa; SR2: percentuale di sopravvivenza al giorno 2 dopo la schiusa; SR3: percentuale di sopravvivenza al giorno 3 dopo la schiusa. TFA: acidi grassi totali. MUFA: acidi grassi monoinsaturi.

3.3.4 Andamento quantitativo degli acidi grassi nel corso della stagione riproduttiva

Gli aspetti quantitativi degli acidi grassi rilevati nelle uova emesse in differenti periodi della stagione riproduttiva sono illustrati in Fig. 5 e 6. L'acido palmitico (16:0) e l'acido palmitoleico (16:1 n-7) hanno mostrato delle concentrazioni (% acidi grassi totali) crescenti con l'avanzare del periodo riproduttivo. Allo stesso modo gli acidi grassi saturi totali (SFA) hanno fatto registrare una concentrazione significativamente maggiore nel 3° periodo rispetto al 1° e al 2° periodo. Tra gli acidi grassi polinsaturi omega-3 solo l'acido docosapentenoico (DPA, 22:5 n-3) ha fatto registrare un andamento crescente con concentrazioni maggiormente significative nelle uova prodotte nel 3° periodo di emissione rispetto agli altri due periodi. La concentrazione dei MUFA è rimasta costante nel corso dell'intera stagione riproduttiva. Un andamento opposto nella concentrazione degli acidi grassi registrati nella stagione riproduttiva è stata ottenuta per l'acido oleico (18:1 n-9), l'acido linoleico (18:2 n-6), l'acido arachidonico (ARA) e i PUFA n-6. Un simile andamento decrescente, ma con assenza di significatività, è stato registrato per il DHA, l'EPA, e i PUFA n-3, Fig. 5, 6.

La concentrazione degli acidi grassi rilevati nelle singole classi fosfolipidiche nel corso della prova sono illustrati in Tab. 5, 6 e 7. Il DHA è stato l'acido grasso predominante nella PC (32.1-34.9 %) e nella PI (42.6 - 43.5 %) seguito dall'acido palmitico (23.6-24.8 % nella PC; 14.6-15.4 % nella PI). L'acido stearico (18:0), l'arachidonico e il palmitico sono stati gli acidi grassi prevalenti nella PE.

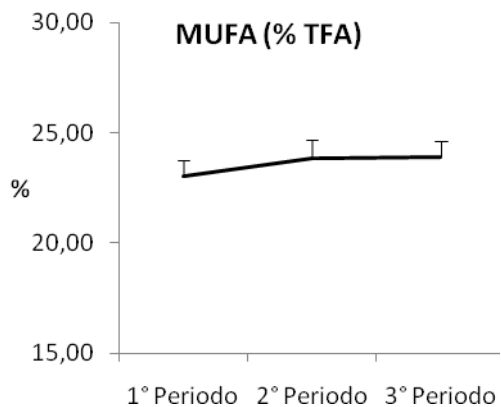
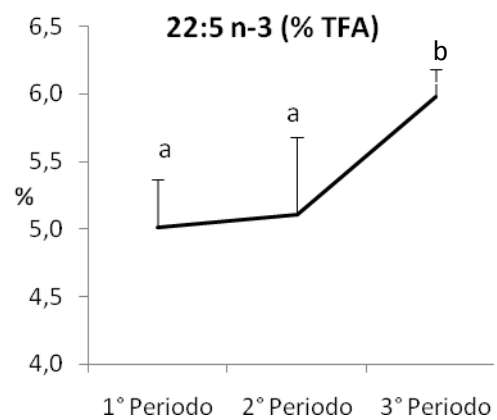
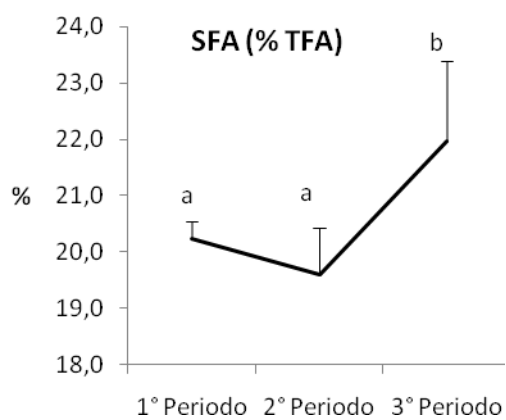
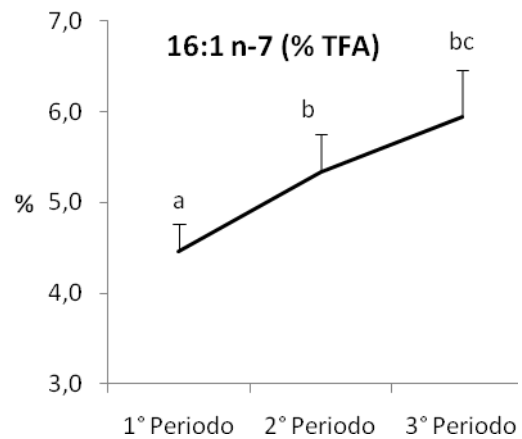
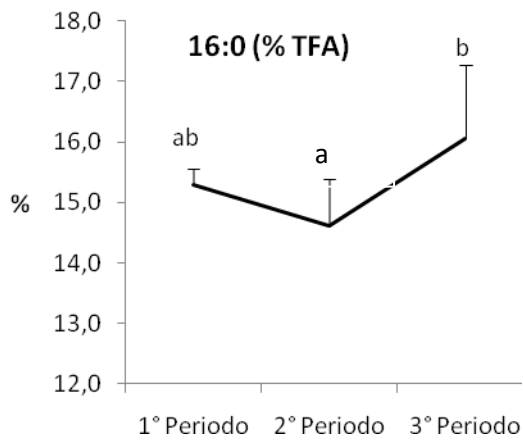


Figura 5. Concentrazione degli acidi grassi (% acidi grassi totali, TFA) delle uova emesse in 3 differenti periodi della stagione riproduttiva. Acidi grassi con andamento crescente all'avanzare della stagione riproduttiva. 1° Periodo: emissioni ottenute in data 8-11-12-13-14-15-16-17-18-19 marzo 2010. 2° Periodo: emissioni ottenute in data 27-28-29-30-31 marzo e 1-6-7-9 aprile 2010. 3° Periodo: emissioni ottenute in data 25 aprile, 1 e 2 maggio. Punti con lettere differenti in apice sono statisticamente differenti ($P \leq 0.05$).

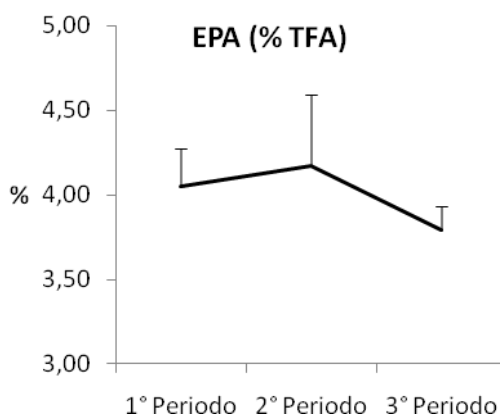
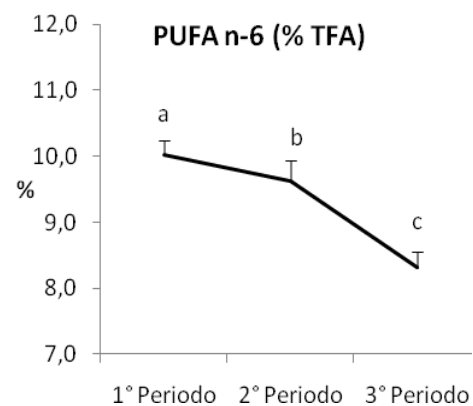
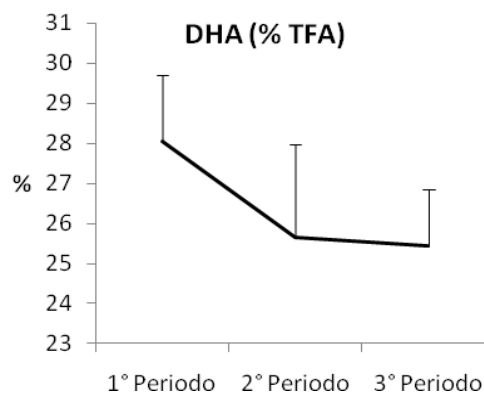
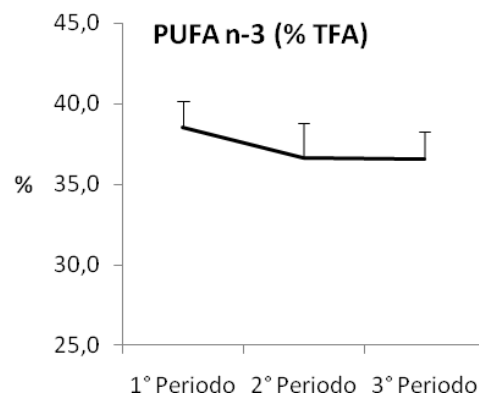
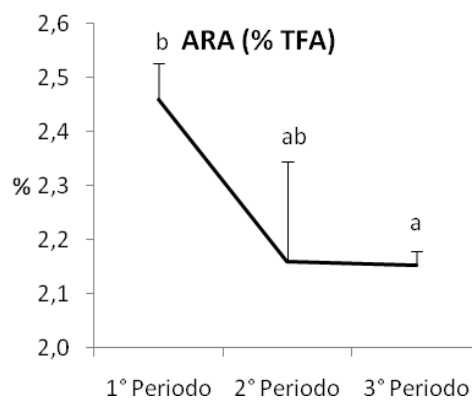
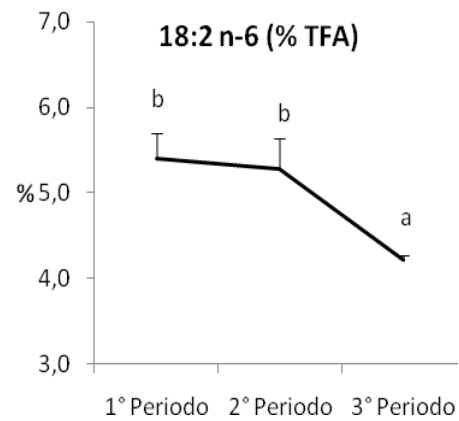
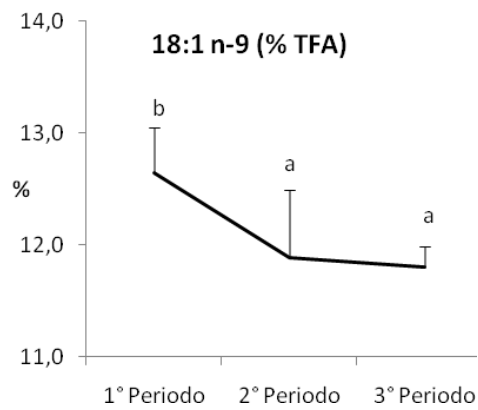


Figura 6. Concentrazione degli acidi grassi (% acidi grassi totali, TFA) delle uova emesse in 3 differenti periodi della stagione riproduttiva. Acidi grassi con andamento decrescente all'avanzare della stagione riproduttiva. 1° Periodo: emissioni ottenute in data 8-11-12-13-14-15-16-17-18-19 marzo 2010. 2° Periodo: emissioni ottenute in data 27-28-29-30-31 marzo e 1-6-7-9 aprile 2010. 3° Periodo: emissioni ottenute in data 25 aprile, 1 e 2 maggio. Punti con lettere differenti in apice sono statisticamente differenti ($P \leq 0.05$).

Tabella 5. Contenuto di fosfatidil-colina, PC (% lipidi totali) e caratterizzazione del suo profilo acido (% PC) nelle uova di sogliola emesse in 3 differenti periodi. 1° Periodo: emissioni ottenute in data 11-15-18 marzo 2010. 2° Periodo: emissioni ottenute in data 27 marzo e 1-4-5 aprile 2010. 3° Periodo: emissioni ottenute in data 25 aprile, 2 e 6 maggio 2010.

	1° Periodo	2° Periodo	3° Periodo
	Media \pm SD	Media \pm SD	Media \pm SD
PC (% LT)	25.7 \pm 2.2	25.3 \pm 2.5	27.2 \pm 2.9
Acidi grassi			
(% PC)			
14:0	1.17 \pm 0.05	1.31 \pm 0.09	1.26 \pm 0.11
15:0	0.50 \pm 0.01	0.54 \pm 0.01	0.56 \pm 0.09
16:0	24.80 \pm 0.38	23.58 \pm 0.43	24.18 \pm 0.65
16:1 n-7	1.94 \pm 0.17	2.49 \pm 0.31	2.51 \pm 0.11
17:0	0.47 \pm 0.02	0.43 \pm 0.02	0.47 \pm 0.06
18:0	4.10 \pm 0.20	4.07 \pm 0.16	4.76 \pm 0.51
18:1 n-9	9.84 \pm 0.91	9.55 \pm 0.89	9.83 \pm 0.65
18:1 n-7	2.95 \pm 0.21	3.37 \pm 0.26	3.56 \pm 0.07
18:2 n-6	4.24 \pm 0.16	3.88 \pm 0.06	3.56 \pm 0.20
18:3 n-3	0.42 \pm 0.02	0.42 \pm 0.02	0.39 \pm 0.02
20:1 n-9	0.51 \pm 0.04	0.53 \pm 0.06	0.49 \pm 0.04
20:2 n-6	0.84 \pm 0.07	1.00 \pm 0.04	1.19 \pm 0.10
20:4 n-6	2.99 \pm 0.16	2.99 \pm 0.17	2.80 \pm 0.09
20:4 n-3	0.37 \pm 0.03	0.35 \pm 0.03	0.42 \pm 0.06
20:5 n-3	4.46 \pm 0.42	4.92 \pm 0.54	4.77 \pm 0.24
22:4 n-6	0.42 \pm 0.01	0.46 \pm 0.03	0.60 \pm 0.10
22:5 n-6	1.08 \pm 0.10	0.92 \pm 0.08	0.78 \pm 0.09
22:5 n-3	4.02 \pm 0.12	4.72 \pm 0.02	5.70 \pm 0.27
22:6 n-3	34.88 \pm 0.90	34.47 \pm 0.37	32.15 \pm 0.18

Tabella 6. Contenuto di fosfatidil-etanolamina, PE (% lipidi totali) e caratterizzazione del suo profilo acido (% PE) nelle uova di sogliola emesse in 3 differenti periodi. 1° Periodo: emissioni ottenute in data 11-15-18 marzo 2010. 2° Periodo: emissioni ottenute in data 27 marzo e 1-4-5 aprile 2010. 3° Periodo: emissioni ottenute in data 25 aprile, 2 e 6 maggio 2010.

	1° Periodo	2° Periodo	3° Periodo
	Media \pm SD	Media \pm SD	Media \pm SD
PE (% LT)	8.0 \pm 0.7	8.0 \pm 0.9	7.7 \pm 1.1
Acidi grassi			
(% PE)			
C 14:0	0.46 \pm 0.19	0.48 \pm 0.13	0.55 \pm 0.19
C 15:0	0.44 \pm 0.19	0.50 \pm 0.18	0.39 \pm 0.13
C 16:0	15.43 \pm 2.32	14.83 \pm 1.36	14.64 \pm 0.15
C 16:1 n-7	0.58 \pm 0.29	0.41 \pm 0.05	0.45 \pm 0.03
C 16:2 n-4	0.94 \pm 0.30	1.02 \pm 0.31	0.78 \pm 0.16
C 17:0	0.65 \pm 0.16	0.69 \pm 0.05	0.68 \pm 0.10
C 18:0	7.12 \pm 0.56	7.08 \pm 0.27	8.01 \pm 0.89
C 18:1 n-9	7.49 \pm 0.94	6.58 \pm 0.61	6.17 \pm 0.45
C 18:1 n-7	4.97 \pm 0.30	5.84 \pm 0.14	6.27 \pm 0.18
C 18:2 n-6	3.08 \pm 0.31	2.43 \pm 0.11	2.18 \pm 0.15
C 18:3 n-3	0.26 \pm 0.05	0.20 \pm 0.04	0.19 \pm 0.05
C 20:1 n-9	1.14 \pm 0.06	1.18 \pm 0.07	1.12 \pm 0.10
C 20:2 n-6	1.17 \pm 0.14	1.37 \pm 0.20	1.56 \pm 0.11
C 20:4 n-6	3.40 \pm 0.54	2.92 \pm 0.73	3.60 \pm 0.17
C 20:4 n-3	0.48 \pm 0.06	0.45 \pm 0.04	0.54 \pm 0.22
C 20:5 n-3	3.04 \pm 0.09	3.40 \pm 0.18	3.43 \pm 0.18
C 22:4 n-6	0.73 \pm 0.09	0.73 \pm 0.11	0.95 \pm 0.12
C 22:5 n-6	1.46 \pm 0.06	1.34 \pm 0.08	1.22 \pm 0.07
C 22:5 n-3	4.44 \pm 0.29	5.03 \pm 0.69	5.93 \pm 0.16
C 22:6 n-3	42.69 \pm 2.57	43.53 \pm 1.79	41.32 \pm 0.90

Tabella 7. Contenuto di fosfatidil-inositolo, PI (% lipidi totali) e caratterizzazione del suo profilo acido (% PC) nelle uova di sogliola emesse in 3 differenti periodi. 1° Periodo: emissioni ottenute in data 11-15-18 marzo 2010. 2° Periodo: emissioni ottenute in data 27 marzo e 1-4-5 aprile 2010. 3° Periodo: emissioni ottenute in data 25 aprile, 2 e 6 maggio 2010.

	1° Periodo	2° Periodo	3° Periodo
	Media \pm SD	Media \pm SD	Media \pm SD
PI (% LT)	3.1 \pm 0.2	2.9 \pm 0.7	3.0 \pm 0.2
Acidi grassi			
(% PI)			
C 14:0	1.11 \pm 0.35	1.23 \pm 0.58	1.39 \pm 0.40
C 15:0	0.78 \pm 0.19	0.81 \pm 0.48	1.03 \pm 0.35
C 16:0	14.79 \pm 5.62	13.23 \pm 4.05	14.44 \pm 0.81
C 16:1 n-7	0.70 \pm 0.39	0.49 \pm 0.16	0.53 \pm 0.35
C 16:2 n-4	2.17 \pm 0.89	2.59 \pm 0.85	1.36 \pm 0.28
C 17:0	1.37 \pm 0.27	1.19 \pm 0.38	1.30 \pm 0.19
C 18:0	30.11 \pm 6.57	27.39 \pm 6.64	26.58 \pm 1.06
C 18:1 n-9	9.50 \pm 1.85	10.03 \pm 1.47	9.86 \pm 0.45
C 18:1 n-7	3.05 \pm 0.51	3.89 \pm 0.69	4.28 \pm 0.08
C 18:2 n-6	1.78 \pm 0.53	1.37 \pm 0.37	1.61 \pm 0.34
C 18:3 n-3	0.25 \pm 0.02	0.40 \pm 0.04	0.35 \pm 0.11
C 20:1 n-9	0.78 \pm 0.16	0.78 \pm 0.14	0.83 \pm 0.06
C 20:2 n-6	0.88 \pm 0.16	1.03 \pm 0.31	1.19 \pm 0.22
C 20:4 n-6	19.46 \pm 6.53	22.61 \pm 4.46	22.77 \pm 0.66
C 20:5 n-3	1.74 \pm 0.28	2.52 \pm 0.54	2.73 \pm 0.31
C 22:5 n-6	0.38 \pm 0.12	0.26 \pm 0.13	0.21 \pm 0.11
C 22:5 n-3	1.50 \pm 0.55	1.59 \pm 0.63	1.68 \pm 0.09
C 22:6 n-3	9.66 \pm 3.64	8.59 \pm 2.38	7.86 \pm 0.17

3.4 Discussioni e conclusioni

Nel corso della sperimentazione è stato possibile ottenere più di 300.000 uova fertili da un parco di riproduttori di sogliola comune (*Solea solea*) formato da 24 esemplari selvatici, allevati per 6 anni in cattività (Cap. II). Le emissioni sono avvenute spontaneamente a cadenza giornaliera nel periodo dell'anno compreso tra marzo e maggio ad una temperatura dell'acqua compresa tra 7.6 e 12.0 °C. Tali risultati sono in linea con quanto illustrato da Imsland et al., (2003) per la sogliola comune (*Solea solea*). Focalizzando sul range di temperatura dell'acqua ottimale per la riproduzione di questa specie nel Mediterraneo, simili risultati (12-13°C) sono stati ottenuti da Bertotto et al., (2006), mentre una maggiore temperatura dell'acqua di emissione (17-18°C) è stata registrata da Cardinaletti et al., (2009). Il numero di emissioni e il numero di uova totali emesse nel periodo riproduttivo è stato superiore (del 200%) a quello ottenuto da Lund et al., (2008), da 70 esemplari adulti selvatici di *Solea solea* e di 5 volte rispetto a 32 esemplari adulti nati in cattività e descritti nel medesimo studio. Anche la migliore percentuale di schiusa totale (8.9 %) registrata dallo stesso autore, è stata inferiore a quella riportata nel presente studio (16.1%).

Il contenuto lipidico delle uova analizzate in 22 emissioni si è attestato nel range compreso tra 16.8 e 20.3 (% sulla sostanza secca). Tali risultati sono di poco inferiori (19-23 %) a quelli ottenuti in un'altra specie piatta, *Japanese flounder* (Furuita et al., 2003) e simili a quelli ottenuti su 2 specie marine del Mediterraneo: il dentice (*Dentex dentex*; 16.6–22.5%; Gimenez et al., 2006, 2008;) e il sarago (*Diplodus sargus*; 16.29 ± 1.22%; Cejas et al., 2003). Il contenuto di acidi grassi è stato in gran parte costituito dai PUFA n-3 (37.28 ± 1.85 % sui lipidi totali) seguito dai MUFA (23.62 ± 0.76 %), SFA (20.52 ± 0.68 %) e PUFA n-6 (9.33 ± 0.26%). Il contenuto di PUFA n-3 e di MUFA è in accordo con quelli rinvenuti nelle uova ottenute da riproduttori selvatici della medesima specie (PUFA n-3, 36.3 ± 2.1%; MUFA, 26.1 ± 1.2%; Lund et al., 2008), mentre gli acidi grassi saturi e i PUFA n-6 hanno fatto registrare rispettivamente un minore e maggiore contenuto (SFA, 33.3 ± 2.6%; PUFA n-6, 4.3 ± 0.8%; Lund et al., 2008). Risultati simili a quelli del presente lavoro per concentrazione di PUFA n-3, MUFA, SFA e PUFA n-6 sono stati registrati per il merluzzo, *Gadus morhua* (Finn et al., 1995), per il rombo, *Psetta maxima* (Finn et al., 1996, Silversand et al., 1996) e per lo snook, *Centropomus undecimalis* (Yanes-Roca et al., 2009). La predominanza di PUFA della serie n-3 rispetto a quelli della serie n-6 è stata descritta nelle uova di differenti specie ittiche marine (Samae et al., 2009), con predominanza per le specie che vivono ad elevate

latitudini in acque fredde rispetto a quelle di acque calde (Tocher et al., 1985). La predominanza di acidi grassi PUFA n-3 rinvenuta nelle uova di esemplari selvatici di sogliola comune (*Solea solea*, Lund et al., 2008) mostra come tali nutrienti ricoprano un ruolo determinante nella dieta naturale di questa specie.

Gli acidi grassi più abbondanti rinvenuti in questa sperimentazione sono stati il DHA (26.4 % TFA), PA (15.3%), OA (12.1%), DPA (5.3%), e l'EPA (4.0 %). Tali acidi grassi sono simili a quelli rinvenuti su questa specie (DHA 31.4%, PA 21.5%, OA 14.5%, EPA 4.6% (Lund et al., 2008) e su altre specie piatte.

Di particolare interesse è stata la maggior concentrazione di LA (5.0%) rispetto a quella rinvenuta nelle uova (0.7%) di esemplari selvatici di *Solea solea* (Lund et al., 2008). Ciò può essere spiegato dalla presenza di questo acido grasso nella dieta somministrata in cattività nel presente studio, rispetto al regime alimentare della specie in natura. L'acido linoleico è infatti poco presente nell'ambiente marino e la sua presenza è legata ad ingredienti di origine vegetale presenti nella dieta somministrata in cattività (Harel et al., 1994). Come rinvenuto per altre specie ittiche, anche nel presente studio la composizione in acidi grassi delle uova ha rispecchiato quello della dieta somministrata ai riproduttori in particolare con quella del mangime formulato somministrato nel periodo pre-riproduttivo. Ciò fa presupporre come la composizione lipidica delle uova in una specie ad emissione asincrona come la sogliola, avente uno sviluppo degli oociti non simultaneo, sia comunque strettamente dipendente dalle riserve corporee immagazzinate prima del periodo riproduttivo e che l'alimentazione somministrata nel periodo riproduttivo non influenza significativamente la composizione acidica delle uova.

Analizzando le relazioni intercorrenti tra gli acidi grassi delle uova e i parametri di sopravvivenza delle larve, il contenuto di DHA e PUFA n-3 è stato significativamente inferiore nelle uova classificate di alta qualità (alta sopravvivenza larvale al 3° giorno dopo la schiusa) rispetto a quelle di media e bassa qualità. Inoltre è presente una significativa correlazione inversa tra la sopravvivenza larvale ed il contenuto di tali acidi grassi.

In particolare per il DHA, questo risultato è in disaccordo con quanto affermato da Yanes-Roca et al., (2009), che ha rinvenuto nel *Centropomus undecimalis* una correlazione positiva tra il contenuto di DHA, percentuale di schiusa e sopravvivenza larvale con uova aventi un contenuto di DHA superiore al 13% (% TFA), rispetto a uova con DHA inferiore al 13%. L'assenza di significatività nel contenuto di DHA tra uova con differenti percentuali di schiusa e sopravvivenza larvale è invece stata rinvenuta per il dentice con valori di DHA pari

al 17% degli acidi grassi totali (Samaee et al., 2009). Sebbene non siano noti i requisiti di DHA per la sogliola, non sono stati osservati miglioramenti delle performance di accrescimento e di sopravvivenza all'aumentare del contenuto di DHA nell'alimentazione larvale (Howell e Tozumas 1991; Bonaldo et al., 2011). Il DHA è un nutriente fondamentale durante lo sviluppo embrionale in quanto entra come costituente nella membrana dei tessuti nervosi, del cervello e della retina (Mourente et al., 1999). Nonostante i risultati contrastanti, dal presente studio e secondo i risultati di Lund et al., (2008), sembra evidente come tale specie tenda ad accumulare questo acido grasso nelle uova. La tendenza ad accumulare DHA nelle uova a dei livelli superiori di quelli rinvenuti per altre specie ittiche, può essere una risposta fisiologica al fatto che nell'alimentazione naturale di questa specie (policheti, crostacei, piccoli bivalvi) il DHA sia relativamente poco presente se confrontato a quella di specie ittiche marine predatrici di pesci. Un simile andamento di correlazione è stato inoltre osservato anche nel rapporto DHA/EPA rispetto alla sopravvivenza larvale, in accordo con Samaee et al., (2009) e Pickova et al., (1997).

Un ottimale rapporto DHA/EPA è considerato di rilevante importanza per la sopravvivenza larvale delle specie ittiche marine. Sebbene non siano noti i requisiti ottimali per le larve di sogliola, tale rapporto rinvenuto in questa sperimentazione è in accordo con quanto rinvenuto da Lund et al., (2008), in uova di esemplari selvatici di sogliola comune. Al contrario di quanto osservato per DHA, PUFA n-3 e DHA/EPA, la sopravvivenza larvale è stata direttamente proporzionale alla concentrazione di MUFA e di acido miristico (14:0). Gli acidi grassi saturi e monoinsaturi sono un importante substrato energetico durante lo sviluppo embrionale di specie ittiche marine. Un corretto contenuto dei suddetti acidi grassi è inoltre essenziale come riserva energetica per il nuoto e per l'inizio dell'attività predatoria delle larve (Samaee et al., 2009).

Analizzando l'evoluzione della concentrazione degli acidi grassi delle uova nel corso della stagione riproduttiva, si denota che gli acidi grassi saturi totali e l'acido palmitoleico (16:1 n-7) hanno mostrato un progressivo aumento di concentrazione con l'avanzare del periodo riproduttivo. Un *trend* opposto è stato invece osservato in generale per i PUFA n-6, l'acido arachidonico e l'acido linoleico (18:2 n-6). Seppur senza significatività anche i PUFA n-3, DHA e EPA hanno mostrato una diminuzione con l'avanzare del periodo riproduttivo mentre i MUFA si sono mantenuti stabili nel corso dei mesi di osservazione. Simili risultati sono stati rinvenuti anche in un'altra specie ittica marina, lo snook (*Centropomus undecimalis*), dove si è osservato un aumento degli SFA, una diminuzione dei PUFA n-3 e di DHA e un

mantenimento dei valori di MUFA con l'avanzare del periodo riproduttivo (Yanes-Roca et al., 2009). Tra i vari aspetti zootecnici, l'alimentazione dei riproduttori è sicuramente il fattore che maggiormente influenza la composizione acidica delle uova di specie ittiche (Watanabe et al., 1991; Harel et al., 1994; Fernandez-Palacios et al., 1995). Tuttavia rimane poco chiaro nelle specie di interesse commerciale, il momento in cui tale effetto risulti essere predominante. Nelle uova di trota per esempio, è stata osservata una carenza di omega-3 solo quando i riproduttori venivano sottoposti a carenze alimentari di tali acidi grassi per lunghi periodi (Leray et al., 1985). Al contrario, negli sparidi la composizione delle uova sembra essere influenzata dall'alimentazione somministrata nell'immediato periodo precedente la riproduzione e durante la riproduzione stessa (Zohar et al., 1984). Nel presente studio, sebbene alcuni acidi grassi abbiano subito delle variazioni in linea con altre specie ittiche, non sono stati registrati importanti cambiamenti nella composizione acidica delle uova durante la stagione riproduttiva. Considerando i differenti momenti di somministrazione del mangime formulato rispetto a quello naturale (mitili, policheti) e considerando il loro differente contenuto di acidi grassi, si può ipotizzare come il momento di alimentazione dei riproduttori precedente la riproduzione abbia determinato in gran parte il profilo acidico delle uova. Solo le uova emesse alla fine della stagione riproduttiva (3° periodo) ad una distanza di 5 mesi dal periodo di alimentazione con mangime formulato, avevano mostrato una diminuzione significativa di DHA che era particolarmente presente nel mangime formulato rispetto a mitili e policheti.

In conclusione la composizione quantitativa degli acidi grassi è stata, per la prima volta su questa specie, correlata positivamente con la sopravvivenza larvale. Un contenuto di DHA di 20-25% (% acidi grassi totali) nelle uova ha dato i risultati migliori in termini di sopravvivenza larvale e sopra a questo livello è stato osservato un calo della sopravvivenza. Come riportato da altri autori per questa specie, tale risultato sostiene le teorie che i fabbisogni di DHA, almeno per le fasi larvali della sogliola comune, siano inferiori rispetto a quelle di altre specie ittiche marine di interesse commerciale. Una concentrazione di acidi grassi monoinsaturi totali superiore al 24% (% acidi grassi totali) sembra migliorare la sopravvivenza larvale nei primi giorni dopo la schiusa. Questa categoria di acidi grassi potrebbe rivestire un ruolo determinante come substrato energetico per il nuoto e per le prime attività predatorie della larva dopo la schiusa.

Le analisi di interazione tra momento riproduttivo e qualità delle uova confermano che è possibile ottenere uova di buona qualità in termini di sopravvivenza larvale nel corso di tutta

la stagione riproduttiva. La composizione delle uova non ha subito importanti variazioni nel corso della stagione riproduttiva. La composizione acidica delle uova sembra essere dipendente dall'alimentazione somministrata ai riproduttori prima dell'inizio della stagione riproduttiva, rispetto a quella somministrata durante il periodo riproduttivo.

Alla luce di questa sperimentazione e dei risultati ottenuti, sarebbe necessario condurre ulteriori sperimentazioni sul fronte nutrizionale dei riproduttori per comprendere l'effetto dei differenti livelli di DHA, PUFA n-3, n-6 e MUFA della dieta sulle performance riproduttive e sulla qualità di uova e larve.

3.5 Bibliografia

AOAC Method 950.46b, 2000a. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edn, AOAC International, Arlington, VA, USA.

AOAC Method 981.10, 2000b. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edn, AOAC International, Arlington, VA, USA.

AOAC Method 920.153, 2000c. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edn, AOAC International, Arlington, VA, USA.

Bertotto, D., Barbaro, J., Francescon, A., Richard, J., Libertini, A., Barbaro, A., 2006. Induced spawning in common sole (*Solea solea*, L.). *Aquaculture Research* 37, 423–427.

Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journals of Biochemistry and Physiology* 37, 911-917.

Blonk, R.J.W., Komen, J., Kamstra, A., Crooijmans, R.P.M.A., van Arendonk, J.A.M., 2009. Levels of inbreeding in group mating captive broodstock populations of Common sole, (*Solea solea*), inferred from parental relatedness and contribution. *Aquaculture* 289, 26-31.

Bonaldo, A., Parma, L., Badiani, A., Serratore, P., Gatta, P.P., 2011. Very early weaning of common sole (*Solea solea* L.) larvae by means of different feeding regimes and three commercial microdiets: Influence on performances, metamorphosis development and tank hygiene. *Aquaculture*, 321, 237-244.

Cardinaletti, G., Mosconi, G., Salvatori, R., Lanari, D., Tomassoni, D., Carnevali, O., Polzonetti-Magni, A.M., 2009. Effect of dietary supplements of mussel and

- polychaetes on spawning performance of captive sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758). *Animal Reproduction Science*, 113, 167-176.
- Cejas, J.R., Almansa, E., Villamandos, J.E., Badía, P., Bolaños, A., Lorenzo, A., 2003: Lipid and fatty acid composition of ovaries from wild fish and ovaries and eggs from captive fish of white sea bream (*Diplodus sargus*). *Aquaculture* 216, 299-313.
- Christie, W.W., 1989. *Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide*. The Oily Press, Ayr, UK.
- Dhert, P., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1992. A simple test for quality evaluation of cultured fry of marine fish. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, Vol. 57/4b.
- Fernandez-Palacios, H., Izquierdo, M., Robaina, L., Valencia, A., Salhi, M., Vergara, J.M., 1995. Effect of n-3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream *Sparus aurata* L. *Aquaculture* 132, 325–337.
- Finn, R.N., 1994. *Physiological energetics of developing marine fish embryos and larvae*. Dr. scient thesis, University of Bergen, Bergen, Norway.
- Finn, R.N., Henderson, R.J., Fyhn, H.J., Evjen, M.S., 1995. Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). II. Lipid metabolism and enthalpy balance. *Marine Biology* 124:371–379.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1925: The colorimetric determination of phosphorus. *Journal of Biological Chemistry* 66, 375-400.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497-509.
- Furuita, H., Tanaka, H., Yamamoto, T., Suzuki, N., Takeuchi, T., 2002. Effects of high levels of n-3 HUFA in broodstock diet on egg quality and egg fatty acid composition of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 210, 323–333.
- Gimenez, G., Estevez, A., Lahnsteiner, F., Zecevic, B., Bell, J.G., Henderson, R.J., Pinera, J.A., Sanchez-Prado, J.A., 2006. Egg quality criteria in common dentex (*Dentex dentex*). *Aquaculture* 260:232–243.
- Gimenez, G., Estevez, A., Henderson, R.J., Bell, J.G., 2008. Changes in lipid content, fatty acid composition and lipid class composition of eggs and developing larvae (0–40 days old) of cultured common dentex (*Dentex dentex* Linnaeus, 1758). *Aquaculture Nutrition* 14:300–308.

- Harel, M., Tandler, A., Kissil, G.W., 1994. The kinetics of nutrient incorporation into body tissues of gilthead seabream (*Sparus aurata*) females and the subsequent effects on egg composition and egg quality and egg quality. *British Journal of Nutrition* 72:45–58.
- Howell, B.R., Tzoumas, T.S., 1991. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F. (Eds.), *The Nutritional Value of Artemia nauplii for Larval Sole, Solea solea (L), with Respect to Their (n-3) HUFA Content.: Fish and Crustacean Larviculture Symposium, Vol. 15. European Aquaculture Society, Special Publication Larvi'91, Gent, Belgium, pp. 63–65*
- Howell, B. R., Conceição, L.E.C., Prickett, R., Canavate, P., Mananos, E., Dinis, M.T., Valente, L., 2011. *Proceedings of the V Workshop on the Cultivation of Soles. Centre of Marine Science (CCMAR), University of the Algarve, Faro, Portugal.*
- Immland, A.K., Foss A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P. White P., 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13, 379–408.
- Izquierdo, M.S., Fernandez-Palacios, H. & Tacon, A.G.J., 2001. Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture*, 197, 25–42.
- Leray, C., Nonnotte, G., Rouband, P., Leger, C., 1985. Incidence of (n-3) essential fatty acid deficiency on trout reproductive processes. *Reproduction, Nutrition and Development* 25, 567–581.
- Lund, I., Steinfeldt, S.J., Suhr, K.I., Hansen, B.W., 2008. A comparison of fatty acid composition and quality aspects of eggs and larvae from cultured and wild broodstock of common sole (*Solea solea* L). *Aquaculture Nutrition* 14:544–555.
- Miwa, H., Yamamoto, M., Futata, T., Kan, K., Asano, T., 1996: Thin-layer chromatography and high-performance liquid chromatography for the assay of fatty acid compositions of individual phospholipids in platelets from non-insulin dependent diabetes mellitus patients: effect of eicosapentaenoic acid ethyl ester administration. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 667, 217-223.
- Mourente, G., Rodriguez, A., Grau, A., Pastor, E., 1999. Utilization of lipids by *Dentex dentex* L. (Osteichthyes, Sparidae) larvae during lecitotrophia and subsequent starvation. *Fish Physiology and Biochemistry* 21:45–58.

- Pavlov, D., Kjorsvik, E., Refsti, T., Andersen, O., 2004. Broodstock and egg production. In: Culture of Cold Water Marine Fish (Moksness, E., Kjorsvik, E. & Olsen, Y. eds), 544 pp. Blackwell Publishing, Oxford.
- Pickova, J., Dutta, P.C, Larsson, P.O., Kiessling, A., 1997. Early embryonic cleavage pattern, hatching success, and egg-lipid fatty acid composition: comparison between two cod (*Gadus morhua*) stocks. *Can Journal of Fish Aquatic Science* 54:2410–2416
- Rainuzzo, J.R., Reitan, K.I. & Olsen, Y., 1997. The significance of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture*, 155, 103–116.
- Salze, G., Tocher, D.R., Roy, W.J., Robertson, D.A., 2005. Egg determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture Research* 36, 1488–1499.
- Samaee, S.M., Estevez, A., Gimenez, G., Lahnsteiner, F., 2009. Evaluation of quantitative importance of egg lipids and fatty acids during embryos and larvae development in marine pelagophil teleosts: with an emphasis on *Dentex dentex*. *Journal of Exploitation Zoology A* 2009;311:735–51.
- Sargent, J.R., Bell, M.V., Henderson, R.J., Tocher, D.R., 1995. Origins and functions of n-3 polyunsaturated fatty acids in marine organisms. In: Phospholipids Characterisation, Metabolism and Novel Biological Applications (Ceve, G. & Paltauf, F. eds), pp. 248–259. American Oil Society Press, Champaign, II.
- Silversand C, Norberg B, Haux C. 1996. Fatty-acid composition of ovulated eggs from wild and cultured turbot (*Scophthalmus maximus*) in relation to yolk and oil globule lipids. *Marine Biology* 125:269–278.
- Tocher, D.R., Fraser, A.J., Sargent, J.R, Gamble, J.C., 1985. Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus* L.). *Lipids* 20:84–89.
- Vazquez, R., Gonzalez, R.A., Mourente, G., 1994. Biochemical composition and fatty acid content of fertilized eggs, yolk sac stage larvae and first-feeding larvae of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 119:273–286.
- Watanabe, T., Lee, M., Mizutani, J., Yamada, T., Satoh, S., Takeuchi, T., Yoshida, N., Kitada, T., Arakawa, T., 1991. Effective components in cuttlefish meal and raw krill for improvement of quality of red seabream *Pagrus major* eggs. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57, 681–694.

- Yanes-Roca, C., Rhody, N., Nystrom, M., Main, K.L., 2009. Effects of fatty acid composition and spawning season patterns on egg quality and larval survival in common snook (*Centropomus undecimalis*). *Aquaculture* 287: 335–340.
- Zohar, Y., Billard, R., Weil, C., 1984. La reproduction de la dourade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrax*): connaissance du cycle sexual et controle de la gametogenesis et de la ponte. In: Barnabe, G., Billard, R. (Eds.), *L'Aquaculture du bar et des sparides*. INRA, Paris.

Capitolo IV - Alimentazione larvale e svezzamento precoce mediante l'utilizzo di diete commerciali

4.1 Abstract

We studied the feasibility of weaning common sole (*Solea solea* L.) larvae at 13 days post hatching (dph) using commercial microdiets (MDs) while reducing live-feed utilization. Four dph larvae were fed two kinds of experimental weaning feeding regimens (FRs): control FR-C (AgloNorse, Ewos) where larvae were weaned onto MD at 27 dph; whilst the other FRs provided live feed until 13 dph, employing AgloNorse, Ewos (FR-A), Gemma, Skretting (FR-G) and O.range Large, INVE (FR-O). The trial lasted 29 days. No statistical differences among groups were observed in survival rates at the end of the trial. FR-A, FR-G and FR-O showed significantly lower weight and length increase when compared to control, whereas metamorphosis development was not influenced. Fatty acids larvae profile was significantly influenced by FR. The total number of *Vibrio* spp. was significantly higher in FR-C tanks at 21 dph. Salinity stress test values were not influenced by treatments. In conclusion, a very early weaning at 13 dph using commercial MDs in common sole larvae affects growth performance but not survival rate and metamorphosis development. A shorter live feed utilization improved tank hygiene.

4.2 Introduction

Common sole (*Solea solea* L.) is a very promising candidate for European aquaculture, characterized by high flesh quality, high market value and a total production of ~30 tons per year (Howell et al., 2008). There are though, several critical factors to be overcome in order to standardize a massive farming production: feeding behaviour, susceptibility to disease, stocking density (Day et al., 1997; Howell, 1997; Imsland et al., 2004; Schram et al., 2006), as well as juvenile production (Howell et al., 2008) especially around weaning and metamorphosis which are accompanied by increased mortality rates (Rueda-Jasso et al., 2005). Standard feeding regimens during these periods represent a bottleneck for fishfarmers due to the required administration to young larvae of live-feed usually characterized by: 1) variable availability and price fluctuations of *Artemia* cysts (Callan et al., 2003), which can reach 700% (Moretti et al., 2005); 2) poor hygienic conditions and high levels of pathogenic bacteria (Olsen et al., 2000; Olafsen, 2001). Total replacement of live-feed is still far to happen but the possibility of an early weaning of larvae using microdiets (MDs) could represent a valuable strategy to improve performances and reduce live feed utilization

First-time feeding fish larvae typically have a rudimentary digestive system characterized by a non-functional stomach and low digestive enzymes activity which make it difficult for them to process and assimilate a complex MD (Kolkovski, 2001). During the last decades, the pre-weaning period has been greatly reduced due to conclusive results obtained in laboratory (Cahu and Zambonino Infante, 2001). . Furthermore, the utilization of a co-feeding regimen, which gradually weans larvae off live preys has been able to promote digestive maturation at early age (Engrola et al., 2007; Engrola et al., 2009) and to improve growth performances and survival rate of marine fish larvae (Rosenlund et al., 1997). In order to cover the knowledge gap on the use of commercial dry MDs for common sole before metamorphosis, we tested three different commercial products for their effects on growth performances, metamorphosis development and tank hygiene when used for an early weaning feeding regimen (FR).

4.3 Materials and methods

4.3.1 Experimental feeding regimes

Four experimental weaning FRs were used in triplicate (Figure 1). Control (FR-C) was formulated according to the protocol used at Solea BV, IJmuiden, The Netherlands, which is one of the most important hatcheries for this species (Andries Kamstra, *personal communication*). This protocol established live feed (*Artemia* nauplii until 9 dph and subsequently enriched metanauplii) with dry feed as co-feeding until 27 dph. The MD used in FR-C was AgloNorse, Ewos, Norway. The other three FRs were established in order to provide live feed until 13 dph and using the following MDs: AgloNorse, Ewos, Norway (FR-A) as in the control, Gemma, Skretting Trouw, France (FR-G) and O.range Large, INVE, Italy (FR-O). Diets used in FR-A and FR-O were supplied at a commercial size of 150-350µm, while diet used in FR-G was made of a mixture of Gemma Micro 150 (120-200 µm) and Gemma Micro 300 (200-450 µm) at a ratio of 50:50 in order to compensate for the larger number of size categories of the others MDs. *Artemia* nauplii and metanauplii were manually administered twice a day (10.00 am and 4.00 pm). Dry feeds were supplied by belt feeders for 16 h day⁻¹ (from 10.00 am until 2.00 am) to apparent satiation. During and after weaning, the daily feeding rate of groups FR-A, FR-G and FR-O was supplied in order to maintain a high availability of dry feed in the water column.

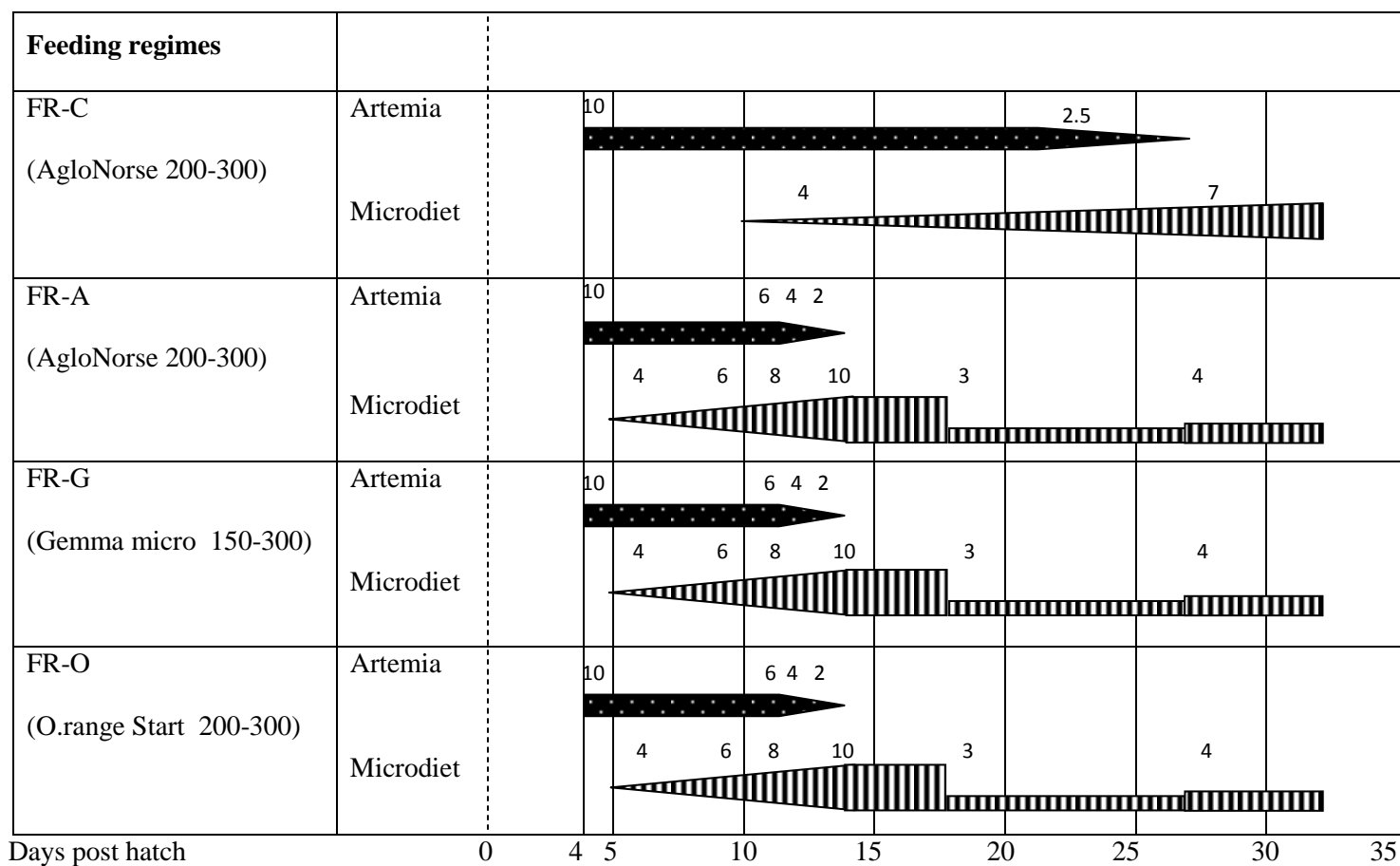


Figure 1. Weaning protocol from 4 to 33 dph. Microdiet-feeding rations are expressed as $\text{g tank}^{-1} \text{ day}^{-1}$; *Artemia* are expressed as 'number *Artemia* $\text{ml}^{-1} \text{ day}^{-1}$ '.

When benthonic phase started and larvae began to settle on the bottom of the tanks (18 dph), daily feeding rate was made based on visual inspection to avoid large excess of uneaten feed. *Artemia* cysts (Great Salt Lakes, Catvis BV, The Netherlands) were incubated and hatched in seawater (salinity 25 g l⁻¹) at 28 °C over a 18 h. *Artemia* metanauplii were harvested and enriched for 24 h using Algamac-3050 (Aquafauna, Bio-Marine Inc. Hawthorne, USA). Proximate composition and fatty acid composition of diets and enriched *Artemia* are shown in Table 1.

4.3.2 Larvae origin, rearing methods and sampling

Common sole larvae came from one batch of fertilized eggs obtained after spawning of a broodstock maintained at the Laboratory of Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Cesenatico, Italy. Larvae at 4 dph were randomly allocated in twelve flat bottom (0.64 m²) 280-liter square tanks (2000 larvae tank⁻¹) and fed according to the experimental FRs. Larvae were distributed to the experimental tanks from a single eggs incubator, in which hatch and yolk-sac reabsorption occurred, using volumetric allocation. Aeration was used during this operation to ensure that larvae were homogeneously mixed within the water column. The tanks were supplied with natural seawater and connected to a closed recirculating system (overall water volume: 4000 l) consisting of a mechanical sand filter (0.4 m³ of silica sand, 0.4-0.8 mm. PTK 1200, Astral Pool, Servaqua S.A. Barsareny, Spain) ultraviolet lights (PE 25mJ/cm²: 16m³ h⁻¹. Blaufish, Barcelona, Spain) and a biofilter (PTK 1200, Astral Pool, Servaqua S.A. Barsareny, Spain). The biofilter medium consisted of 0.4m³ of a calcinid clay (Biogrog, , specific surface area: 10⁶ m²/m³). A strong aeration (200 l min⁻¹) in the stock tank was applied to remove CO₂. Overall daily water renewal was around 25% day⁻¹ as a consequence of mechanical filter backwashing and tanks flush out. At the beginning of the trial, water exchange rate of tanks was 1 liter min⁻¹ and it was increased to 2 liters min⁻¹ following larval development. Temperature was kept constant at 18.0 ± 1.0 °C and photoperiod was maintained at 16/8 h light/dark by artificial light (500 lux at the water surface—Delta Ohm luxmeter HD-9221; Delta Ohm, Padua, Italy). Oxygen level was kept constant (7.5 ± 1.0 ppm) by a liquid oxygen system connected to a software (B&G Sinergia snc, Chioggia, Italy).

Table 1.
Proximate analysis (% of dry weight in *Artemia*; % as it is in Formulated feed) and fatty acid composition (% of total fatty acids methyl esters) of the non-enriched *Artemia* (NEA) and enriched *Artemia* (EA) and of the formulated feed used in the experimental feeding regimes.

	<i>Artemia</i>		Formulated feed		
	NEA	EA	AgloNorse	Gemma	O.range
Moisture	-	-	5.9 ± 0.1	6.5 ± 0.1	5.9 ± 0.0
Crude protein	55.3 ± 0.4	50.1 ± 0.8	58.8 ± 0.1	56.7 ± 0.1	53.5 ± 0.3
Crude fat	15.4 ± 0.7	20.5 ± 1.9	17.4 ± 0.2	13.2 ± 0.2	17.6 ± 0.3
Ash	13.0 ± 0.2	18.7 ± 0.8	13.0 ± 0.0	10.8 ± 0.0	11.3 ± 0.0
<i>Fatty acid composition</i>					
14:0	0.6 ± 0.0	2.2 ± 0.2	3.6 ± 0.0	1.9 ± 0.1	2.2 ± 0.0
15:0	1.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0
16:0	11.1 ± 0.2	13.9 ± 0.1	16.4 ± 0.6	16.0 ± 0.1	16.5 ± 0.3
17:0	-	0.5 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0
18:0	5.1 ± 0.1	4.8 ± 0.1	2.1 ± 0.0	3.0 ± 0.0	6.1 ± 0.0
Total saturated	18.0 ± 0.4	21.5 ± 0.3	22.6 ± 0.7	21.4 ± 0.2	25.6 ± 0.4
16:1 n-7	2.3 ± 0.1	1.6 ± 0.0	2.5 ± 0.1	1.5 ± 0.0	2.4 ± 0.0
18:1 n-9	20.2 ± 0.1	13.2 ± 0.2	11.7 ± 0.3	11.0 ± 0.1	10.0 ± 0.0
18:1 n-7	6.5 ± 0.1	5.1 ± 0.1	2.0 ± 0.0	1.5 ± 0.0	2.1 ± 0.0
20:1 n-11	-	-	-	-	0.4 ± 0.1
20:1 n-9	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.0	6.0 ± 0.2	3.0 ± 0.2	3.1 ± 0.2
20:1 n-7	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0
22:1 n-11	-	-	8.5 ± 0.7	4.0 ± 0.4	3.3 ± 0.2
22:1 n-9	-	-	-	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0
Total monounsaturated	29.7 ± 0.3	20.5 ± 0.3	30.8 ± 1.3	21.4 ± 0.8	21.6 ± 0.5
18:2 n-6	5.8 ± 0.1	3.5 ± 0.0	17.6 ± 0.6	30.6 ± 0.5	10.8 ± 0.3
20:2 n-6	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0
20:4 n-6	0.8 ± 0.0	2.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.1	1.2 ± 0.0
20:5 n-6	-	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0
22:4 n-6	-	0.1 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0
22:5 n-6	-	5.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.9 ± 0.0
Total n-6 PUFA	6.8 ± 0.1	12.3 ± 0.2	19.5 ± 0.7	32.7 ± 0.7	13.8 ± 0.3
18:3 n-3	29.5 ± 0.5	17.6 ± 0.3	2.1 ± 0.0	3.5 ± 0.1	1.8 ± 0.0
18:4 n-3	4.8 ± 0.1	1.8 ± 0.0	1.4 ± 0.0	1.3 ± 0.0	1.5 ± 0.0
20:4 n-3	-	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.2 ± 0.0
20:5 n-3	1.1 ± 0.0	5.8 ± 0.0	5.8 ± 0.1	4.1 ± 0.0	10.3 ± 0.1
22:5 n-3	-	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.0 ± 0.0
22:6 n-3	-	12.2 ± 0.4	13.0 ± 0.6	10.5 ± 0.1	20.1 ± 0.4
Total n-3 PUFA	35.4 ± 0.6	38.4 ± 0.9	23.6 ± 0.8	20.8 ± 0.3	34.9 ± 0.7
n-6/n-3	0.2	0.3	0.8	1.6	0.4
DHA/EPA	-	2.1	2.2	2.6	2.0
EPA/AA	-	2.4	14.4	8.9	8.6
Unknown	10.1	7.3	3.5	3.7	4.1

A gentle aeration around the tank outlet was applied for reducing sedimentation of *Artemia* and MDs. Ammonia (Total ammonia nitrogen ≤ 0.1 ppm), nitrite (≤ 0.2 ppm) and nitrate (≤ 50 ppm) and salinity (37 g l^{-1}) were monitored spectrophotometrically twice a week (Spectroquant Nova 60, Merck, Lab business, Darmstadt, Germany). Sodium bicarbonate was added on a daily basis to keep pH constant at 7.8-8.0 and avoid alkalinity fluctuation. The trial lasted 29 days, from 4 dph until 33 dph. At the beginning of the trial, 100 and 50 larvae were randomly sampled from the initial stock to determine wet weight (WW) and standard length (SL), respectively. At the end of the trial, WW and SL were recorded, sampling 100 and 20 larvae, respectively from each tank. At 14 and 25 dph, 50 larvae tank⁻¹ were also taken in order to determine WW while at 14, 19 and 25 dph, 20 larvae tank⁻¹ were sampled to measure SL. WW was measured after rinsing larvae with de-ionized water on a 400 μm screen and blotting excess moisture away from behind the screen using lint free paper towel (Curnow et al., 2006). SL was determined by stereomicroscope (Nikon SMZ 800, Nikon Instruments Inc. Melville, USA). At the end of the trial, all larvae were removed from each tank and counted to determine survival rate. Larvae were then rinsed in distilled water, and frozen ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$) until chemical analyses.

4.3.3 Growth and survival

Growth rate was calculated as specific growth rate (SGR, % d⁻¹) according to the following equation:

$$\text{SGR} = \frac{(\ln \text{ final weight}) - (\ln \text{ initial weight})}{\text{Number of Days}} \times 100$$

Survival was calculated per tank as a percentage of the initial number of larvae.

4.3.4 Estimation of eye migration stage

Metamorphosis degree was evaluated on 20 larvae tank⁻¹ at 14, 19, 25 and 33 dph, by scoring the position of the migrating left eye according to the index described by Fernández-Díaz et al. (2001). Degrees of metamorphosis were divided into 5 phases (S): 0) symmetrical left and right eye position; 1) an asymmetrical position of the left eye and right eye, the left eye starts to migrate; 2) the migrating eye reaches at maximum the midline of the dorsal surface; 3) the migrating eye can be seen from the right ocular side or migrates within the dorsal side; 4) eye

translocation is completed and the orbital arch is visible. Along with metamorphosis degree, SL was recorded for each larvae.

4.3.5 Stress test

High-salinity stress test was performed on 10 larvae from each tank at 13, 24 and 33 dph. Larvae were transferred into a 500 ml plastic beaker containing 300 ml seawater at 18°C and a refractometrically controlled salinity of 70 g l⁻¹. (Milwaukee MR100ATC, Gallarate, Italy). Mortality was monitored at 10-min intervals during 120-min. At 24 and 33 dph, the exposure time was prolonged to 210 min, because of the higher salinity tolerance of larvae during this period, and mortality was recorded every 30 min between 120 and 210 min. Larvae were considered dead if they were opaque or their body did not respond to a gentle touch of the tail by a pipette. The sensitivity to the stress was expressed as Cumulative Stress Index (CSI), which was obtained by the addition of the cumulative mortalities in the consequent time intervals according to Dhert et al. (1992).

4.3.6 Water quality

Tank hygiene was evaluate by microbiological analyses of the rearing water in all the tanks. At 14, 21, 28 dph, in the early morning before feeding, one sample of water was collected by a sterile pipette in 5 different point of each tank. Samples from each tank were pooled and immediately stored at 10 °C until utilization, because the survival of vibrios is enhanced under mild refrigeration (Boutin et al., 1985; Guthrie et al., 1985; Reily and Hackney, 1985; Bryan et al., 1999). Marine bacteria were enumerated as Colony Forming Unit (CFU ml⁻¹) on agar plates, by the spread plate method: Total Marine Heterotrophs (TMH) on Marine Agar (Difco) and *Vibrio* spp. on TCBS Agar (Oxoid) NaCl 3% final concentration, after 3-5 days at 20 °C, as previously reported (Serratore et al., 2009). Vibrios were typed according to the Bergey's Manual (Bauman and Schubert, 1984): gram stain and morphology, oxidase production (Oxidase stick, Oxoid), reduction of nitrate to nitrite (peptone 1%, KNO₃ 0.5%, NaCl 3%, agar 1.5%), dextrose fermentation (Kligler Iron Agar, NaCl 3%) (Serratore et al., 1999; Serratore et al., 2009).

4.3.7 Chemical analyses

All commercial diets, *Artemia* nauplii and metanauplii and larvae were analyzed for proximate composition and fatty acids content. The moisture content (AOAC 2000a) of feedstuff was determined in duplicated, whereas larvae, nauplii and metanauplii were freeze-dried in a lyophilizer system, Heto Drywinner (Heto-Holten A/S Allerød, Denmark), and, after 24 h, were dried in an oven at 60 °C for 5 h. Crude protein (AOAC, 2000b), and ash (AOAC, 2000c) analyses were carried out in duplicated for larvae, nauplii, metanauplii and diets. Lipid extraction of larvae, nauplii, metanauplii and feedstuff was performed according to Bligh and Dyer (1959), using methanol and chloroform as solvents. Fatty acids methyl esters (FAME) from total lipid were prepared using methanolic sulfuric acid (1%) accordingly to Christie (1989). Chromatographic analyses were carried out with a Varian 3380 gas chromatograph (Varian Inc. Palo Alto, USA) equipped with a fused silica capillary column DB-23 J & W Scientific (30 m x 0.25 mm), a split injector at 230 °C and a flame ionisation detector at 300 °C. The carrier gas was nitrogen at a flow rate of 1.2 ml min⁻¹. The oven temperature was set in a programmed mode from 150 °C to 230 °C at 5 °C min⁻¹ and final isotherm. Data were processed using a Varian Star Chromatography Workstation. Fatty acids were identified by comparing the retention time of unknown FAME with those of known FAME standard mixtures (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA; PUFA No1, Marine Source, and PUFA No3, Menhaden Oil, SUPELCO, Inc., Bellefonte, PA, USA).

4.3.8 Statistical analyses

The General Linear Model analysis with diet as fixed effect and days as covariate was used to assess the influence of diet on the length and weight of larvae. The ordinal regression based on the complementary log-log function ($f(x) = \log(-\log(1-x))$) with diet as fixed effect and days as covariate was used to assess the influence of diet on the grade of metamorphosis. Results of SGR, survival, water quality, CSI, proximate composition and total fatty acid composition, were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA). All statistical analyses were performed using SAS computer software (SAS, 2004). Results of survival percentage, proximate composition and concentration of fatty acids were arcsine square root transformed before submitting to ANOVA. Differences between treatment groups were considered significant at $P \leq 0.05$. When P values showed significance, individual means were compared using Tukey's multiple comparison test to detect intergroup significant differences.

4.4 Results

At the end of the trial, larvae successfully completed metamorphosis and the percentage of fish with abnormal pigmentation was less than 1% in all the experimental groups. Survival rates, as shown in Table 2, ranged from 36.7% to 55.8% without any statistical difference between groups. SGR data (Table 2) did not show any statistical difference until 14 dph, before the beginning of different feeding regimens. From 14 dph to 25 dph, significant differences appeared between groups, the control being characterized by the highest SGR while FR-G group scored the lowest one. During the remaining period covering the last 8 days of the trial, SGR of larvae fed FR-A, FR-G and FR-C were similar and significantly higher than FR-O group. At the end of the trial, average WW and SL of larvae was 39.3 ± 6.7 , 26.5 ± 1.3 , 20.5 ± 4.0 , 13.1 ± 1.6 mg and 16.7 ± 2.1 , 14.6 ± 2.7 , 14.7 ± 2.9 , 11.9 ± 1.9 mm, in groups FR-C, FR-A, FR-G and FR-O, respectively (Figure 2 and Figure 3).

Table 2
Specific growth rate (SGR) and survival of larvae at the end of the trial.

Feeding regimes	SGR from 4 to 14 dph	SGR from 14 to 25 dph	SGR from 25 to 33 dph	Survival (%)
FR-C	10.6 ± 0.4	14.3 ± 0.8^c	8.6 ± 1.6^b	55.8 ± 14.3
FR-A	11.1 ± 0.6	6.9 ± 1.5^b	13.3 ± 2.3^b	41.7 ± 4.9
FR-G	11.6 ± 0.4	4.6 ± 1.2^a	12.5 ± 2.9^b	36.7 ± 11.5
FR-O	10.5 ± 0.6	8.0 ± 0.9^b	3.7 ± 2.1^a	43.0 ± 4.9

Each value is mean \pm SD. Columns with different superscript letters for a given value are significantly different ($P \leq 0.05$).

$$\text{SGR} = \frac{(\ln \text{ final weight}) - (\ln \text{ initial weight})}{\text{Number of Days}} \times 100.$$

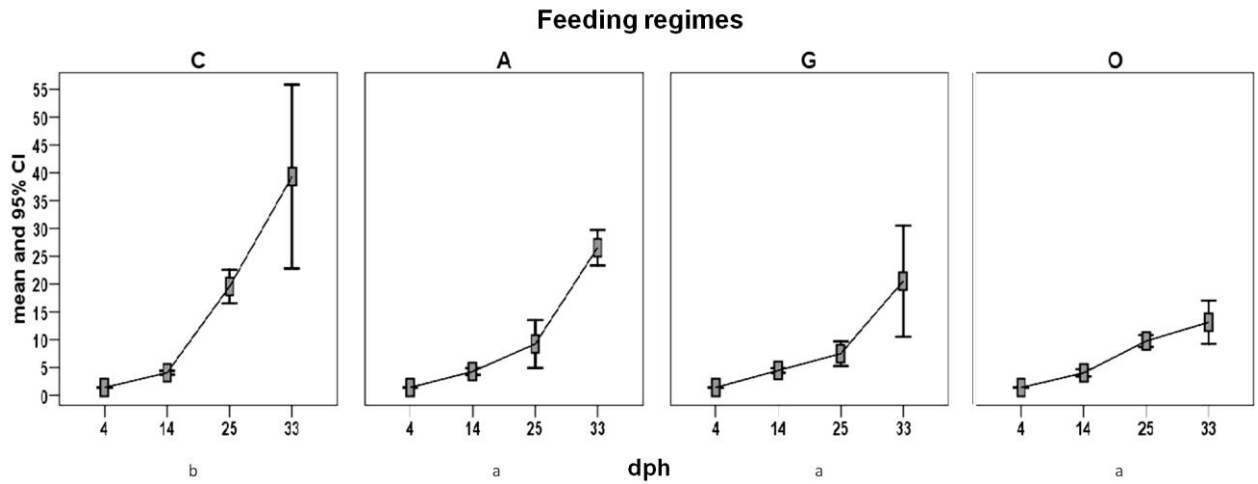


Figure 2. Larvae wet weight (mg) recorded during the trial. Each value is the mean \pm confidence interval (95%) of data from triplicate groups. Different letters below the graph denote significant differences among treatments

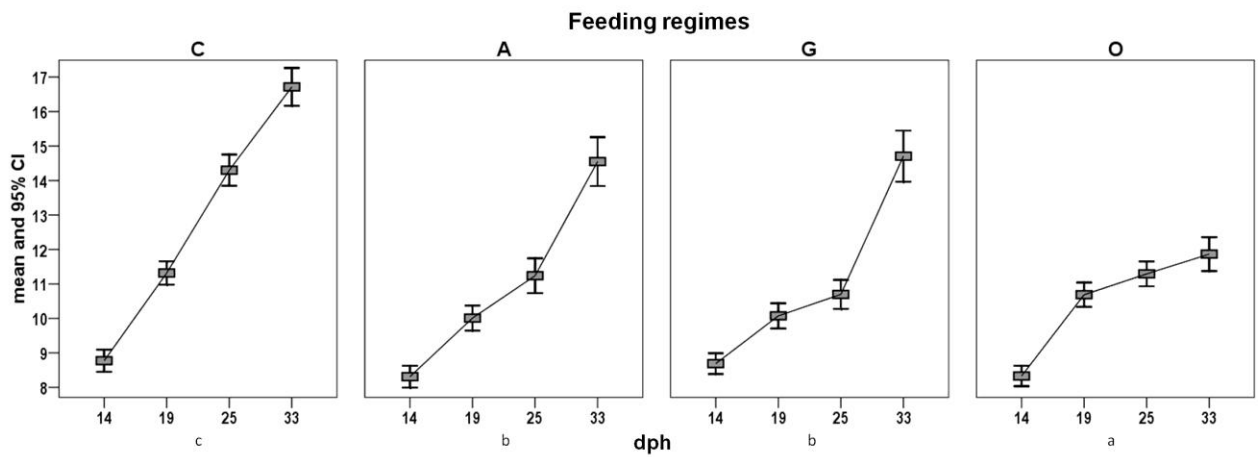


Figure 3. Larvae standard length (mm) recorded during the trial. Each value is the mean \pm confidence interval (95%) of data from triplicate groups. Different letters below the graph denote significant differences among treatments. Standard length at 4 dph: 5.04 ± 0.60 mm

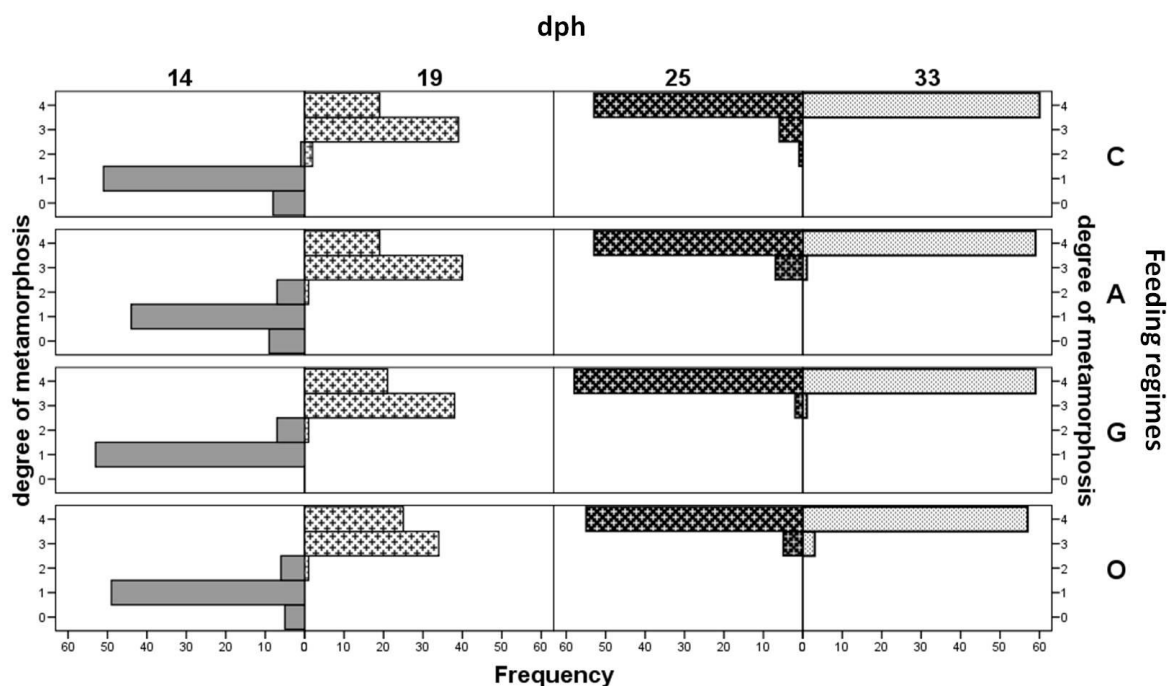


Figure 4. Degrees of metamorphosis as function of the feeding regime. 0) symmetrical left and right eye position; 1) an asymmetrical position of the left eye and right eye, the left eye starts to migrate; 2) the migrating eye reaches at maximum the midline of the dorsal surface; 3) the migrating eye can be seen from the right ocular side or migrates within the dorsal side; 4) eye translocation is completed and the orbital arch is visible

Larvae fed FR-C showed statistically higher growth and length increase in comparison with all the other groups. All larvae from early weaned groups (FR-A, FR-G and FR-O) showed a similar evolution in growth whereas length increase in fish fed FR-O was significantly lower than that of larvae fed FR-A and FR-G. The degree of eye migration during metamorphosis (Figure 4) did not reveal any detectable difference between groups. At 14 dph, metamorphosis was initiated ($S \geq 1$) in 87 to 100% of sampled larvae of all groups with an average SL of 8.66 ± 0.21 mm. At 19 dph, stage $S \geq 3$ was found in 95% of subjects with an average SL of 10.55 ± 0.61 mm. Metamorphosis of the sampled subjects was completed (S_4) between 88 and 97% and between 97 and 100% at 25 and 33 dph, respectively. Proximate and fatty acid composition of larvae at the end of the trial are shown in Table 3. Lipid content of larvae fed FR-A and FR-G was significantly higher than that of larvae fed FR-O. On the contrary, no significant effect of the different FRs was evident on larvae protein content.

Table 3
Proximate analysis (% of dry weight) and fatty acid composition (% of total fatty acids methyl esters) of sole larvae submitted to the different feeding regimes at the end of the trial.

	FR-C	FR-A	FR-G	FR-O
Crude protein	69.6 ± 0.5	68.2 ± 0.1	68.0 ± 0.8	68.7 ± 0.6
Crude fat	13.6 ± 0.7 ^{ab}	15.3 ± 0.2 ^b	15.4 ± 0.4 ^b	11.6 ± 1.4 ^a
<i>Fatty acid composition</i>				
14:0	1.5 ± 0.1 ^b	1.8 ± 0.2 ^c	0.8 ± 0.1 ^a	0.9 ± 0.1 ^a
15:0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0
16:0	16.4 ± 0.6 ^{ab}	17.6 ± 0.5 ^b	17.0 ± 0.8 ^b	15.2 ± 0.3 ^a
17:0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.0
18:0	6.1 ± 0.1 ^b	5.0 ± 0.1 ^a	6.3 ± 0.5 ^b	8.4 ± 0.2 ^c
Total saturated	24.5 ± 0.7	24.9 ± 0.6	24.7 ± 0.7	25.5 ± 0.2
16:1 n-7	1.5 ± 0.1 ^b	1.7 ± 0.1 ^b	1.0 ± 0.1 ^a	1.7 ± 0.1 ^b
18:1 n-9	12.8 ± 0.1 ^b	12.5 ± 0.3 ^b	11.1 ± 0.8 ^a	12.1 ± 0.2 ^b
18:1 n-7	3.4 ± 0.1 ^d	2.4 ± 0.0 ^b	1.9 ± 0.1 ^a	3.0 ± 0.1 ^c
20:1 n-11	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.0
20:1 n-9	2.5 ± 0.4 ^b	3.4 ± 0.3 ^c	1.5 ± 0.1 ^a	1.6 ± 0.0 ^a
20:1 n-7	0.2 ± 0.0 ^{ab}	0.2 ± 0.0 ^a	0.1 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^b
22:1 n-11	2.3 ± 0.3 ^b	3.3 ± 0.5 ^c	1.1 ± 0.1 ^a	1.0 ± 0.1 ^a
22:1 n-9	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.0
Total monounsaturated	23.0 ± 0.5 ^c	23.9 ± 1.4 ^c	16.9 ± 0.8 ^a	20.3 ± 0.5 ^b
18:2 n-6	11.0 ± 0.2 ^b	16.1 ± 0.3 ^c	26.9 ± 1.1 ^d	6.7 ± 0.1 ^a
20:2 n-6	0.4 ± 0.0 ^a	0.7 ± 0.1 ^b	1.4 ± 0.1 ^c	0.7 ± 0.0 ^d
20:4 n-6	2.5 ± 0.1 ^b	0.9 ± 0.0 ^a	1.0 ± 0.1 ^a	2.4 ± 0.1 ^b
20:5 n-6	0.4 ± 0.0 ^b	0.3 ± 0.0 ^a	0.2 ± 0.0 ^a	0.4 ± 0.0 ^b
22:4 n-6	0.1 ± 0.0 ^a	–	0.1 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^b
22:5 n-6	2.4 ± 0.1 ^d	0.4 ± 0.0 ^a	0.5 ± 0.0 ^b	1.4 ± 0.1 ^c
Total n-6 PUFA	17.0 ± 0.2 ^b	18.4 ± 0.3 ^c	30.1 ± 1.1 ^d	11.8 ± 0.0 ^a
18:3 n-3	4.2 ± 0.3 ^c	1.4 ± 0.1 ^a	2.1 ± 0.1 ^b	1.3 ± 0.0 ^a
18:4 n-3	0.8 ± 0.0 ^c	0.6 ± 0.1 ^b	0.4 ± 0.0 ^b	0.3 ± 0.0 ^a
20:4 n-3	0.5 ± 0.1 ^c	0.2 ± 0.0 ^a	0.3 ± 0.0 ^b	0.4 ± 0.0 ^{bc}
20:5 n-3	3.4 ± 0.1 ^c	3.4 ± 0.0 ^c	2.1 ± 0.0 ^a	2.7 ± 0.1 ^b
22:5 n-3	2.6 ± 0.2 ^a	2.8 ± 0.3 ^a	2.4 ± 0.2 ^a	4.4 ± 0.2 ^b
22:6 n-3	17.8 ± 0.6 ^{ab}	19.3 ± 1.7 ^b	15.6 ± 0.6 ^a	24.7 ± 0.3 ^c
Total n-3 PUFA	29.3 ± 1.1 ^b	27.6 ± 1.9 ^b	22.9 ± 0.7 ^a	33.9 ± 0.4 ^c
n-6/n-3	0.6 ± 0.0 ^b	0.7 ± 0.0 ^b	1.3 ± 0.1 ^c	0.3 ± 0.0 ^a
DHA/EPA	5.2 ± 0.1 ^a	5.7 ± 0.5 ^a	7.5 ± 0.1 ^b	9.0 ± 0.3 ^c
EPA/AA	1.3 ± 0.0 ^a	3.7 ± 0.2 ^c	2.1 ± 0.2 ^b	1.1 ± 0.0 ^a
Unknown	6.3 ± 0.2	5.1 ± 0.2	5.3 ± 0.6	8.5 ± 0.3

Each value is mean ± SD. Rows with different superscript letters for a given value are significantly different ($P \leq 0.05$).

Table 4
Cumulative Stress Index (CSI) of sole larvae in a salinity stress test at a specific sampling time.

Feeding regimes	CSI		
	13 dph	24 dph	33 dph
FR-C	57.7 ± 10.1	6.3 ± 6.7	8.3 ± 10.1
FR-A	62.7 ± 30.3	4.7 ± 3.1	10.3 ± 7.2
FR-G	70.0 ± 21.6	4.7 ± 3.5	16.0 ± 13.1
FR-O	57.0 ± 34.6	10.3 ± 3.1	23.0 ± 20.7

Each value is mean ± SD . There were no significant differences ($P \geq 0.05$).

Considering fatty acid composition, significant differences were found between groups, reflecting the diet fatty acids pattern. Significant differences were found in relative levels of *n*-3 PUFA, eicosapentaenoic acid (EPA), docosaesaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA). Larvae fed FR-C showed higher body content of ARA in comparison with FR-A and FR-G. Larvae fed FR-G presented lower body levels of EPA and DHA in comparison with the other groups with the exception of DHA content of FR-C. Larvae fed FR-O contained an higher level of *n*-3 PUFA and DHA, together with the highest DHA/EPA ratio. EPA body levels of larvae fed FR-A and FR-C were higher than those of FR-G and FR-O whereas DHA/EPA ratio was lower. CSI (Table 4) was not affected by FRs. Generally, values tended to decrease when metamorphosis advanced (24 and 33 dph). Water quality was assessed through the measurement of the bacteria loading of Total Marine Heterotrophs and *Vibrio* spp. Results are shown in Fig. 5 and 6. The number of Total Marine Heterotrophs was not significantly different among groups over the trial. At 21 dph, FR-C presented a statistically higher number of *Vibrio* spp., which was 1 log higher than those recorded in the other treatments, whereas at 14 and 28 dph no differences among groups were noticed.

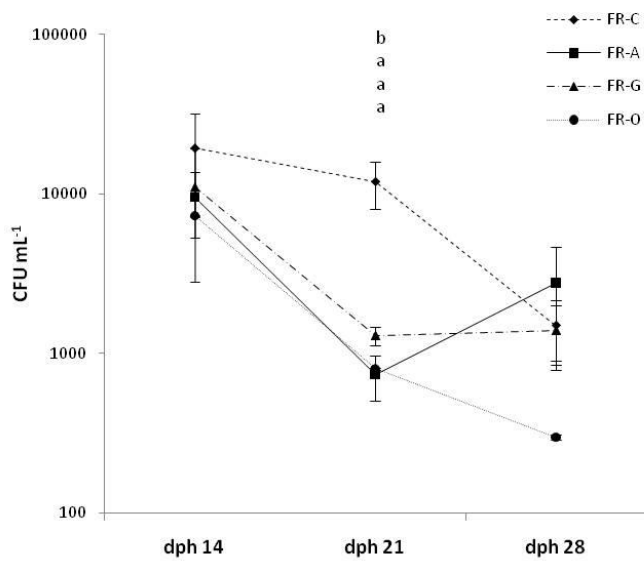


Figura 5. Bacteriological assessment with Marine Agar of water taken in the rearing tanks from experimental groups. Bacteriological data are expressed in mean colony forming units ml⁻¹ (CFU ml⁻¹). Each value is the mean ± SD of data from triplicate groups. Superscripts denote significant differences among treatments at a given time point.

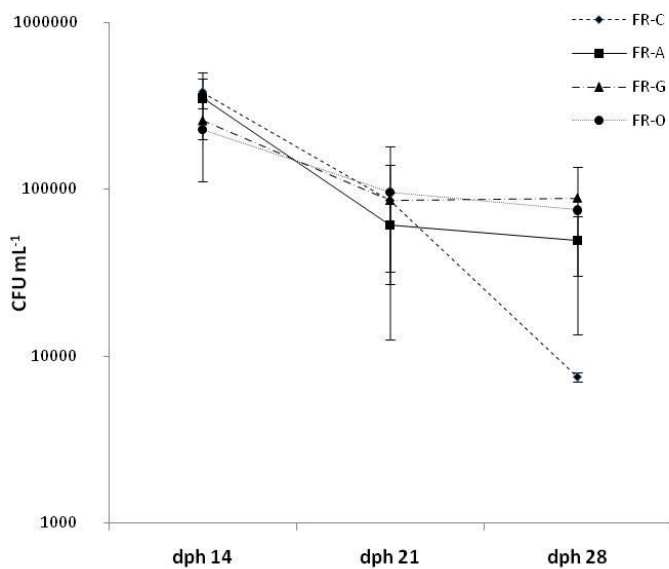


Figura 6. Vibrio burden recovered on TCBS 3% of water taken in the rearing tanks from experimental groups. Bacteriological data are expressed in mean colony forming units ml⁻¹ (CFU ml⁻¹). Each value is the mean ± SD of data from triplicate groups. Superscripts denote significant differences among treatments at a given time point.

4.5 Discussion

The feasibility of early weaning in common sole is a key-factor in the industrialization of farming processes of this promising aquaculture species. According to our data on survival rate, pigmentation and metamorphosis degree it seems feasible to promote a very early weaning using commercial MDs, in place of more traditional feeding regimens characterized by live-feed. The lack of significant differences found in the present study between early weaned groups and control could indicate a properly larvae feed intake of MD and a satisfactory nutritional diets profile for a very young larvae (13 dph). If we consider other works on sole weaning, even the lowest survival rate found in group FR-G can be considered promising if compared to 40% described by Palazzi et al. (2006) at 28 dph, feeding larvae with live preys only. Engrola et al. (2007) tested different weaning strategies on Senegal sole (*Solea senegalensis* Kaup) using the commercial MD AgloNorse. The authors obtained survival rates not exceeding 40% at 26 and 33 dph, but up to 90% when larvae were weaned at 40 and 60 dph. However, these authors calculated survival from 20 dph onward, whereas in our study this parameter was calculated from mouth opening (4 dph). Considering the growth performance, the final WW and SL of early weaned groups were statistically lower when compared to FR-C. If we look at the growth performance during the phases of the trial, differences in final WW between FR-C and the other groups, are mainly related to a lower SGR of sole within the second period (from 14 to 25 dph), where FR-A and FR-O showed intermediate values and FR-G the lowest one (Table 3). If we consider that this period is immediately after weaning (SGR 14-25, Table 3), this result could be regarded as a consequence of a slower adaptation to the MDs at this early stage. According to Koven et al. (2001) the poor performance of larvae exclusively fed MDs is related to the variable acceptance and attraction of the inert particle compounded by inadequate ingestion, digestion and assimilation. Physico-chemical characteristics of MDs such as color, shape, particle size, sedimentation rate or release of attractants can influence feed intake by very young fish (Sáenz et al., 2011). In addition, larvae have to be able to digest the particles and be able to absorb and assimilate the nutrients that must fit the requirement of the larvae (Kvåle et al., 2006). Although, the presence of digestive enzyme in the first larval stages of sole is known, (Martinez et al., 1999) the lack of gastric digestion could have reduced nutrients utilization. Veggetti et al. (1999) found the presence of stomach in common sole by 12 dph but did not show any secretory activity. The same authors observed a further development of

digestive tract by 21 dph. These findings are in accordance with those described in other flatfish, where the stomach activity is not completely functional until the onset of metamorphosis (Douglas et al., 1999; Ribeiro et al., 1999; Gisbert et al., 2004; Faulk and Holt, 2009). Thus, a low attractiveness of MDs and/or the incomplete gastric activity could have limited the utilization of complex proteins at the time of early weaning for groups FR-A, FR-G and FR-O. On the other hand, a precocious substitution of live feed with MDs could promote the early adaptation of larvae to dry feed (Gatesoupe and Luquet, 1982). This hypothesis could explain why FR-A and FR-G showed a marked retrieval of SGR between 25 and 33 dph. On the contrary, sole fed FR-O showed decreased growth rates in this period and a lower SL increase. Larvae from this group were observed to less actively feed upon Orange MD in the last part of the experiment (data not shown). This diet showed a longer persistence within the water column compared to Aglonorse and Gemma. Since larvae at this time were already settled to the bottom, the longer persistence in water before consumption could have decreased the attractiveness of MD.

Another parameter studied was the metamorphosis onset in terms of time and frequency. Despite the differences in growth recorded among groups, the early weaning did not exert any negative influence on metamorphosis. Some authors reported that larvae of common sole and Senegal sole continue to eat during metamorphosis, suggesting that the matter and energy required for transformation do not originate exclusively from body reserves (Lagardère et al., 1999; Fernández-Díaz et al., 2001). In our study, metamorphosis was completed at 25 dph in 88 to 95% of the sampled subjects. Similar results on common sole were reported by Palazzi et al. (2006) and Lund et al. (2007). The latter found that the initiation of metamorphosis was significantly and positively correlated with increases in larval SL and reported a mean standard length of 7.89 ± 0.20 mm at 16 dph for larvae at S1, while we recorded a higher value already after 14 dph (8.57 ± 0.22 mm). Our data suggest that the nutritional status of larvae obtained by the administration of live feed before metamorphosis and by MDs during the metamorphosis allowed a similar development of larvae in groups fed FR-A, FR-O and FR-G in comparison to control FR-C. A delay in metamorphosis has been observed in early weaned common sole larvae where the time required to complete metamorphosis was 10 days longer than that of the control group (Appelbaum, 1985). Similar findings have been described in Senegal sole (Fernández-Díaz et al., 2001) when nutritional deficiency occurred and in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) (Faulk and Holt, 2009) once weaning was anticipated before metamorphosis. Even in winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*

Walbaum), which has been successfully weaned at a length of 6.2 mm, a delay in metamorphosis was observed when compared to a live feed control. This finding did not occur when weaning began at a 6.6 mm length of larvae, possibly due the presence of a more developed stomach at this time (Ben Khemis et al., 2003).

The fatty acid profile of larvae at the end of the trial closely reflected the diets pattern already observed in other studies on common sole and Senegal sole (Villalta et al., 2005a; Villalta et al., 2005b; Lund et al., 2007; Lund et al., 2008; Dâmaso-Rodrigues et al., 2010). According to the performance recorded, the MDs used in our trial seemed to supply a sufficient level of essential fatty acids for the larval stage of this species. This could be inferred considering that even if diet O.range (FR-O) contained a considerably higher level of those fatty acids respect to Aglonorse (FR-A) and Gemma Micro (FR-G), that did not improve overall growth and survival. Although fatty acid requirements for this species are still unknown, Howell and Tzoumas (1991) observed that DHA has no effects on performance and survival rates. These authors suggest that common sole is less demanding in terms of (*n*-3) Highly Unsaturated Fatty Acids (HUFA) when compared with many other marine species and that there is no need for enhancing the *Artemia* DHA concentration as long as there is a sufficient provision of EPA. In our study, the length increase of larvae fed FR-O was even lower than that recorded in the other groups. Interestingly, in the study conducted by Villalta et al. (2005b), larvae of Senegal sole fed the diet containing the highest DHA concentration, had the lowest growth in lenght in comparison with the other groups. These authors suggest that an increase in dietary DHA and a reduction in monounsaturated fatty acids, particularly 18:1n-9, may have led to reduced energy availability and subsequently reduced growth. Dietary ARA content is considered an critical issue in sole larvae nutrition since a high inclusion of this FA can induce hypopigmentation when fed during pre-metamorphosis (Lund et al., 2008). We report here that abnormal pigmentation was considered negligible since was observed in less than 1‰ of the overall batch. This finding could indicate that the amount of ARA in both *Artemia* (0.8-2.4 % of total FAME) and commercial MDs (0.4-1-2 % of total FAME) were within physiological levels for this species. The different FRs and MDs did not show any effect on larvae tolerance during salinity stress test. Salinity stress tests have been developed to detect differences in physiological conditions between treatment groups in nutritional studies (Dhert et al., 1990; Willey et al., 2003; Jalali et al., 2008; Nhu et al., 2010). Since there are no other available information about salinity stress test in common sole, we cannot compare our data with others. However, in a preliminary trial conducted in our facilities, 16

dph common sole larvae fed exclusively MD from mouth opening, scored a mortality of 100% after 20 min of exposure to a salinity of 70 g l⁻¹ (data not published). These larvae were characterized by a deficient nutritional status, a very low growth rate and the absence of metamorphosis development compared to a live feed control. The lack of significant differences in this study may indicate an equal physiological condition between groups irrespective of FRs and MDs employed.

The number of Total Marine Heterotrophs did not increase all around the trial, showing a good efficiency of the recirculating system in bacterial growth control. Early weaning, regardless of the specific MDs, led to a significant reduction in bacteria loading of *Vibrio* spp. in tank water. *Artemia* typically contain high bacteria loads, especially of *Vibrio* spp., including marine larvae pathogens (Makridis et al., 2000) and this can be the reason for a higher *Vibrio* spp. number found in FR-C tanks at 21 dph. High *Vibrio* spp. loading was found also in a trial on Atlantic halibut after feeding *Artemia* metanauplii following 24 h enrichment with a standard emulsion (Olsen et al., 2000). Ritar et al. (2004) showed a high growth of Total Marine Heterotrophs and *Vibrio* in *Artemia* after 6 h of enrichment with Algamac 3050, focusing the attention on the rapid bacterial growth on enrichment medium.

In conclusion, data on survival rate, metamorphosis development and stress test demonstrate the feasibility of a very early weaning for common sole according to the FRs and MDs employed in this research. Since SGR, larvae length and fatty acid body composition were significantly influenced by MDs, future studies on nutrient utilization may further improve larvae performances. Finally, a reduced use of live feed in early weaned groups also determined a significant reduction of *Vibrio* spp. in water. Reduction of bacterial pathogens loading during larval rearing of common sole should be taken into consideration as a valuable tool in preventing disease outbreaks.

4.6 References

- AOAC Method 950.46b, 2000a. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edn, AOAC International, Arlington, VA, USA.
- AOAC Method 981.10, 2000b. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edn, AOAC International, Arlington, VA, USA.
- AOAC Method 920.153, 2000c. Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th edn, AOAC International, Arlington, VA, USA.
- Appelbaum, S., 1985. Rearing of the Dover sole, *Solea solea* (L), through its larval stages using artificial diets. *Aquaculture* 49, 209–221.
- Bauman, P., Schubert, R. 1984. Family II: Vibrionaceae. In: Krieg, N.R., Holt, J.G., (Eds), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, The Williams & Wilkins, Baltimore, USA, pp. 545-561.
- Ben Khemis, I., Audet, C., Fournier, R., de la Noüe, J., 2003. Early weaning of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum) larvae on a commercial microencapsulated diet. *Aquac. Res.* 34, 445-452.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* 37, 911-917.
- Boutin, B.K., Reyes, A.L., Peeler, J.T., Twedt, R.M., 1985. Effect of temperature and suspending vehicle on survival of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*. *J. Food Protect.* 48, 875-878.
- Bryan, P.J., Steffan, R.J., DePaola, A., Foster, J.W., Bej, A.K., 1999. Adaptive response to cold temperatures in *Vibrio vulnificus*. *Curr. Microbiol.* 38, 168-175.
- Cahu, C., Zambonino Infante, J., 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200, 161-180.
- Callan, C., Jordaan, A., Kling, L.J., 2003. Reducing Artemia use in the culture of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 219, 585-595.
- Christie, W.W., 1989. *Gas Chromatography and Lipids: A Practical Guide*. The Oily Press, Ayr, UK.
- Curnow, J., King, J., Bosmans, J., Kolkovski, S., 2006. The effect of reduced *Artemia* and rotifer use facilitated by a new microdiet in the rearing of barramundi *Lates calcarifer* (BLOCH) larvae. *Aquaculture* 257, 204-213.

- Dâmaso-Rodrigues, M.L., Pousão-Ferreira, P., Ribeiro, L., Coutinho, J., Bandarra, N.M., Gavaia, P.J., Narciso, L., Morais, S., 2010. Lack of essential fatty acids in live feed during larval and post-larval rearing: Effect on the performance of juvenile *Solea senegalensis*. *Aquacult. Int.* 18, 741-757.
- Day, O.J., Howell, B.R., Jones D.A., 1997. The effect of dietary hydrolysed fish protein concentrate on the survival and growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.), during and after weaning. *Aquac. Res.* 28, 911-921.
- Dhert, P., Lavens, P., Duray, M., Sorgeloos, P., 1990. Improved larval survival at metamorphosis of Asian seabass (*Lates calcarifer*) using ω 3-HUFA-enriched live food. *Aquaculture* 90, 63-74.
- Dhert, P., Lavens, P., Sorgeloos, P., 1992. A simple test for quality evaluation of cultured fry of marine fish. *Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent.*, Vol. 57/4b.
- Douglas, S.E., Gawlicka, A., Mandla, S., Gallant, J.W., 1999. Ontogeny of the stomach in winter flounder: Characterization and expression of the pepsinogen and proton pump genes and determination of pepsin activity. *J. Fish Biol.* 55, 897-915.
- Engrola, S., Conceição, L.E.C., Dias, L., Pereira, R., Ribeiro, L., Dinis, M.T., 2007. Improving weaning strategies for Senegalese sole: Effects of body weight and digestive capacity. *Aquac. Res.* 38, 696-707.
- Engrola, S., Figueira, L., Conceição, L.E.C., Gavaia, P.J., Ribeiro, L., Dinis M.T., 2009. Co-feeding in Senegalese sole larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture* 288, 264-272.
- Faulk, C.K., Holt, G.J., 2009. Early weaning of southern flounder, *Paralichthys lethostigma*, larvae and ontogeny of selected digestive enzymes. *Aquaculture* 296, 213-218.
- Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., Cañavate, J.P., Moyano, F.J., Alarcón, F.J., Diaz, M., 2001. Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *J. Fish Biol.* 58, 1086-1097.
- Gatesoupe, F.J., Luquet, P., 1982. Weaning of the sole (*Solea solea*) before metamorphosis. *Aquaculture* 26, 359-368.
- Gisbert, E., Piedrahita, R.H., Conklin, D.E., 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. *Aquaculture* 232, 455-470.
- Guthrie, R.K., Makukutu, C.A., Gibson, R.W., 1985. Recovery of *Vibrio cholerae* O1 after heating and/or cooling. *Dairy Food Sanit.* 5, 427-430.

- Howell, B.R. (1997) A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture* 155, 355-365.
- Howell, B. R., Conceição, L.E.C., Prickett, R., Canavate, P., Mananos, E., 2008. Proceedings of the IV Workshop on the Cultivation of Soles. Centre of Marine Science (CCMAR), University of the Algarve, Faro, Portugal.
- Howell, B. R., Tzoumas, T. S., 1991. The nutritional value of *Artemia* nauplii for larval sole, *Solea solea* (L), with respect to their (n-3) HUFA content. In: Lavens, P., Sorgeloos, P., Jaspers, E., Ollevier, F., (Eds), Fish and Crustacean Larviculture Symposium, European Aquaculture Society, Special Publication Larvi'91, Gent, Belgium, Vol. 15 pp. 63-65.
- Imstrand, A.K., Foss, A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P., 2004. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev. Fish Biol. Fisher.* 13, 379-407.
- Jalali, M.A., Hosseini, S.A., Imanpour, M.R., 2008. Effect of vitamin E and highly unsaturated fatty acid-enriched *Artemia urmiana* on growth performance, survival and stress resistance of Beluga (*Huso huso*) larvae. *Aquac. Res.* 39, 1286-1291.
- Kolkovski, S., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles implications and applications to formulated diets. *Aquaculture* 200, 181-201.
- Koven, W., Kolkovski, S., Hadas, E., Gamsiz, K., Tandler, A., 2001. Advances in the development of microdiets for gilthead seabream, *Sparus aurata*: a review. *Aquaculture* 194, 107-121.
- Kvåle, A., Yúfera, M., Nygård, E., Aursland, K., Harboe, T., Hamre, K., 2006. Leaching properties of three different microparticulate diets and preference of the diets in cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture* 251, 402-415.
- Lagardère, F., Amara, R., Joassard, L., 1999. Vertical distribution and feeding activity of metamorphosing sole, *Solea solea* (L.), before immigration to the Bay of Vilaine nursery (Northern Bay of Biscay, France). *Environ. Biol. Fish.* 56, 213-228.
- Langdon, C., 2003. Microparticle types for delivering nutrients to marine fish larvae. *Aquaculture* 227, 259-275.
- Lund, I., Steinfeldt, S.J., Banta, G., Hansen, B.W., 2008. The influence of dietary concentrations of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid at various stages of larval ontogeny on eye migration, pigmentation and prostaglandin content of common sole larvae (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 276, 143-153.

- Lund, I., Steinfeldt, S.J., Hansen, B.W., 2007. Effect of dietary arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on survival, growth and pigmentation in larvae of common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 273, 532-544.
- Makridis, P., Fjellheim, A.J., Skjermo, J., Vadstein, O., 2000. Control of the bacterial flora of *Brachionus plicatilis* and *Artemia franciscana* by incubation in bacterial suspensions. *Aquaculture* 185, 207-218.
- Martinez, I., Moyano, F.J., Fernández-Díaz, C., Yúfera, M., 1999. Digestive enzyme activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Fish Physiol. Biochem.* 21, 317-323.
- Moretti, A., Pedini Fernandez-Criado, M., Vetillart, R., 2005. Manual on Hatchery Production of Seabass and Gilthead Seabream, Volume 2. Fao, Rome, Italy.
- Nhu, V.C., Dierckens, K., Nguyen, H.T., Hoang, T.M.T., Le, T.L., Tran, M.T., Nys, C., Sorgeloos, P., 2010. Effect of early co-feeding and different weaning diets on the performance of cobia (*Rachycentron canadum*) larvae and juveniles. *Aquaculture* 305, 52-58.
- Olafsen, J.A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200, 223-247.
- Olsen, A.I., Olsen, Y., Attramadal, Y., Christie, K., Birkbeck, T.H., Skjermo, J., Vadstein, O., 2000. Effects of short term feeding of microalgae on the bacterial flora associated with juvenile *Artemia franciscana*. *Aquaculture* 190, 11-25.
- Palazzi, R., Richard, J., Bozzato, G., Zanella, L., 2006. Larval and juvenile rearing of common sole (*Solea solea* L.) in the Northern Adriatic (Italy). *Aquaculture* 255, 495-506.
- Reily, L.A., Hackney, C.R., 1985. Survival of *Vibrio cholerae* during cold storage in artificially contaminated seafoods. *J. Food Sci.* 50, 838-839.
- Ribeiro, L., Sarasquete, C., Dinis, M.T., 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* 171, 293-308.
- Ritar, A.J., Dunstan, G.A., Nelson, M.M., Brown, M.R., Nichols, P.D., Thomas, C.W., Smith, E.G., Crear, B.J., Kolkovski, S., 2004. Nutritional and bacterial profiles of juvenile *Artemia* fed different enrichments and during starvation. *Aquaculture* 239, 351-373.
- Rosenlund, G., Stoss, J., Talbot, C., 1997. Co-feeding marine fish larvae with inert and live diets. *Aquaculture* 155, 183-191.

- Rueda-Jasso, R.A., Conceição, L.E.C., De Coen, W., Rees, J.F., Sorgeloos, P., 2005. Diet and weaning age affect the growth and condition of Dover sole (*Solea solea* L.). *Cienc. Mar.* 31, 477-489.
- Sáenz de Rodrigáñez, M.A., Gander, B., Alaiz, M., Moyano, F.J., 2011. Physico-chemical characterization and in vitro digestibility of commercial feeds used in weaning of marine fish. *Aquacult. Nutr.* 17, 429-440.
- SAS (2004) SAS Institute Inc, SAS Version 9.0. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Schram, E., Van Der Heul, J.W., Kamstra, A., Verdegem, M.C.J., 2006. Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture* 252, 339-347.
- Serratore, P., Piano, A., Piraccini, S., Trentini, M., Zavatta, E., Grodzki, M., Valeri, M.L. (2009) Indagine sulla diffusione di *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus*, in molluschi bivalvi dell'Adriatico e proposta di un protocollo analitico. *AIVI* 4, 33-38.
- Serratore, P., Turtura, G.C., Rinaldini, E. Milandri, S., Presepi, D., 1999. Phenotypic characterization of some bacterial populations belonging to the genus *Vibrio*. *Ann. Microbiol. Enzimol.* 49, 79-88.
- Veggetti, A., Rowlerson, A., Radaelli, G., Arrighi, S., Domeneghini, C., 1999. Post-hatching development of the gut and lateral muscle in the sole. *J. Fish Biol.* 55, 44-65.
- Villalta, M., Estèvez, A., Bransden, M.P., 2005a. Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture* 245, 193-209.
- Villalta, M., Estèvez, A., Bransden, M.P., Bell, J.G., 2005b. The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture* 249, 353-365.
- Willey, S., Bengtson, D.A., Harel, M., 2003. Arachidonic acid requirements in larval summer flounder, *Paralichthys dentatus*. *Aquacult. Int.* 11, 131-149.

**Capitolo V - Espressione genica di enzimi digestivi in larve
di sogliola comune (*Solea solea*)**

5.1 Introduzione

La sogliola comune (*Solea solea*) è una specie molto promettente per l'acquacoltura europea e nazionale. Nello studio e messa a punto del processo produttivo di questa specie, la fase larvale rappresenta lo stadio più critico per il successo dell'intero ciclo di allevamento (Howell et al., 2008). La riduzione dell'alimento vivo, la formulazione di diete innovative e l'ottenimento di buone performance produttive sono necessari per la sostenibilità dell'intero allevamento (Yúfera & Darias, 2007). Lo studio dei fabbisogni alimentari e nutrizionali della fase larvale di tale specie riveste un ruolo fondamentale per il successo del suo allevamento. Sebbene l'attività enzimatica di tripsina, chimotripsina e amilasi siano state descritte a livello biochimico e a livello molecolare in larve di diverse specie ittiche marine (Zambonino Infante & Cahu, 2001; Murray et al., 2004; Murray et al., 2006; Darias et al., 2007; Kortner et al., 2011; Gamboa-Delgado et al., 2011), persiste una scarsità di conoscenze che specifichi su base molecolare le capacità digestive del tratto digerente delle larve di questa specie. Queste informazioni, una volta acquisite, permetteranno di individuare i regimi alimentari e le diete ottimali per la standardizzazione di questo primo stadio produttivo.

5.2 Materiali e metodi

5.2.1 Larve, allevamento e campionamenti

Le larve di sogliola comune (*Solea solea*) oggetto di questa sperimentazione sono state ottenute mediante riproduzione in cattività da un parco di riproduttori mantenuti presso il Laboratorio di Acquacoltura (Cesenatico) della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Bologna. Le metodiche di riproduzione e gestione delle uova utilizzate sono illustrate al Cap. II.

Le uova e le larve provenienti da un'unica emissione sono state mantenute in un singolo incubatoio fino a 4 giorni dopo la schiusa (4dph). Successivamente 2500 larve/vasca sono state distribuite in 3 vasche da 280 litri e connesse ad un impianto a ricircolo e mantenute secondo le tecniche di gestione illustrate da Bonaldo et al., (2011), (Cap. II).

Le larve sono state poi alimentate con alimento vivo (*Artemia* nauplii e metanauplii) dal 4° al 27° dph e successivamente sono state svezzate con mangime commerciale secondo la metodologia di svezzamento standard per questa specie illustrata da Bonaldo et al., (2011), (Cap. IV.). La prova si è conclusa al 33dph.

Per le analisi molecolari di espressione genica, 5 larve per vasca sono state campionate 1 ora dopo la somministrazione di alimento (16:00 p.m) ai giorni 4, 8, 13, 18, 27 e 33 dph, e conservate in RNAlater (Ambion) a 4 °C per 20 ore e poi stoccate a -32 °C. Prima di essere campionate le larve sono state anestetizzate con fenossi-etanolo e sciacquate con acqua distillata.

5.2.2 Estrazione dell'mRNA, creazione di cDNA e clonaggio delle sequenze

L'RNA totale è stato estratto da ciascuna larva usando il kit NucleoSpin RNA II e XS (Macherey–Nagel, Düren, Germany) secondo le procedure previste dalla casa produttrice inclusa la digestione con DNAase. L'RNA estratto da ciascuna larva è stato poi trattato termicamente per 10' a 65°C in termoblock (Accublok, Labnet International Inc.) e successivamente analizzato per concentrazione e integrità mediante biofotometro (Biofotometer Plus, Eppendorf) e bioanalyser (Agilent 2100). I campioni con RNA avente numero di integrità (RIN) < 7.5 venivano scartati e l'estrazione ripetuta. Tutti i campioni di RNA sono stati conservati a -80°C.

Per la creazione di cDNA è stato utilizzato un pool di RNA costituito prelevando 2µl da 6 campioni di RNA, ciascuno estratto da una larva appartenente ad ognuno dei 6 periodi di campionamento. Un quantitativo di 1.85µg di RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando Superscript III (Invitrogen). Il prodotto è stato amplificato in un termociclatore (Vapo protect, Eppendorf) utilizzando Taq DNA polimerasi DNA (Bioline) Bio-21040, e primers *forward* e *reverse* (500nM) per tripsinogeno 1, chimotripsinogeno e amilase ottenute da Sogliola senegale (*Solea senegalensis*) (Manchado et al., 2008). Le condizioni di reazione sono state le seguenti: 10 min a 95°C; 35 cicli di 30s a 95 °C, 30s a 50.0-51.7-52.8-55.4-58.8 °C (temperatura di 5 differenti colonne), 30s a 72 °C; seguito da 10min a 72 °C. I prodotti amplificati sono stati dissolti in gel elettroforesi (agarosio 1.5%) per 30 min utilizzando Hyper Ladder II (Bioline) come marker. Gli amplificati che hanno dato singole bande sono stati legati nel vettore PCR 4-TOPO (Invitrogen). I plasmidi ricombinanti sono stati trasformati in Top Ten Competent *Escherichia coli* (Invitrogen) e posti in coltura in agar contenente LB medium e ampicillina (100mg/ml). Successivamente è stato condotto uno *screening* di 5 colonie per inserto clonato, mediante PCR utilizzando come *templates* i batteri e T3 e T7 (Topo TA Cloning Kit, Invitrogen) come primers *forward* e *reverse* (500nM, volume finale 20µl). Le colonie positive (contenenti l'inserto clonato), sono state coltivate in 3ml di

LB/ampicillina (ampicillina 100mg/ml) per 18h prima di procedere all'estrazione dei plasmidi (NucleoSpin Plasmid, Macherey–Nagel, Düren, Germany). I plasmidi che hanno rilasciato l'inserto in seguito a digestione con ECO R1 (TAKARA 1040A) sono stati sequenziati presso un laboratorio esterno (Bioarray, Spagna).

5.2.3 qRT-PCR

Ciascun campione di RNA totale proveniente da ciascuna larva è stato trasformato in cDNA (qScript cDNA Synthesis Kit, Quanta Biosciences Inc.) per un totale di 125ng di RNA per campione.

La quantificazione dei livelli di mRNA di *sstryp1*, *amy*, e *chymt* è stata condotta mediante RT-PCR con il Metodo della *Relative Standard Curve* (quantificazione relativa) utilizzando primers specifici (200nM) disegnati sulle sequenze di *Solea solea* ottenute nel processo di clonazione. Le condizioni di amplificazione sono state le seguenti: 10min 95°C, (15s 95 °C, 30s 60 °C x 40 cicli) , 15s 95 °C, 15s 60 °C e curva di calibrazione. L'amplificazione è avvenuta in duplicato, un controllo positivo con RNA e uno negativo con acqua DEPC è stato condotto durante la taratura della curva standard. Come standard è stata utilizzata una serie di diluizioni di cDNA preparati da un pool di RNA totale di ogni campione di larve. La B-actina di *Solea solea* è stata amplificata per ogni campione e utilizzata come *housekeeping gene* per provvedere ad un controllo interno dell'espressione dei precursori enzimatici.

5.3 Risultati

I prodotti amplificati in seguito a clonazione presentavano delle dimensioni di 124, 357 e 427 pb e sono stati identificati rispettivamente come tripsinogeno, chimotripsinogeno e amilasi in seguito al sequenziamento. I frammenti sono stati allineati (BLAST) con altre sequenze degli stessi precursori enzimatici per altre specie ittiche e altri vertebrati depositati in *Genebank*. Confrontando con altri teleostei le maggiori similitudini sono state rinvenute con *Solea senegalensis* per il tripsinogeno (97% di similitudine), 88% è stata la similitudine del chimotripsinogeno con il *Pagrus major* mentre del 90% quella dell'amilasi con il *Thunnus orientalis*. Tutti e 3 i precursori hanno mostrato una similitudine compresa tra il 65 e il 70% rispetto all'*Homo sapiens*.

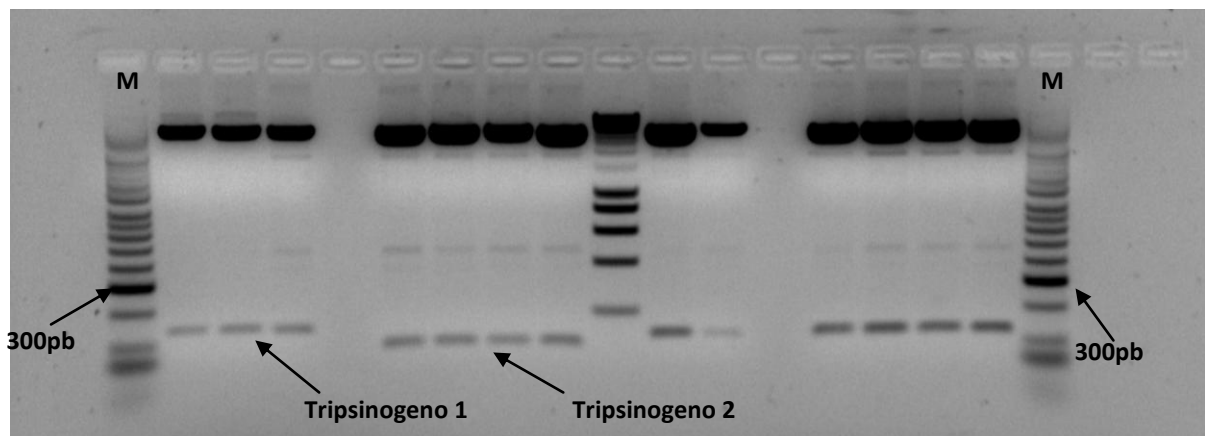


Figura 1. Gel elettroforesi dei frammenti di cDNA di tripsinogeno in seguito a clonazione e successiva digestione del vettore PCR-4 TOPO con enzima di restrizione ECO -R1. M=marker; pb= paia basi.

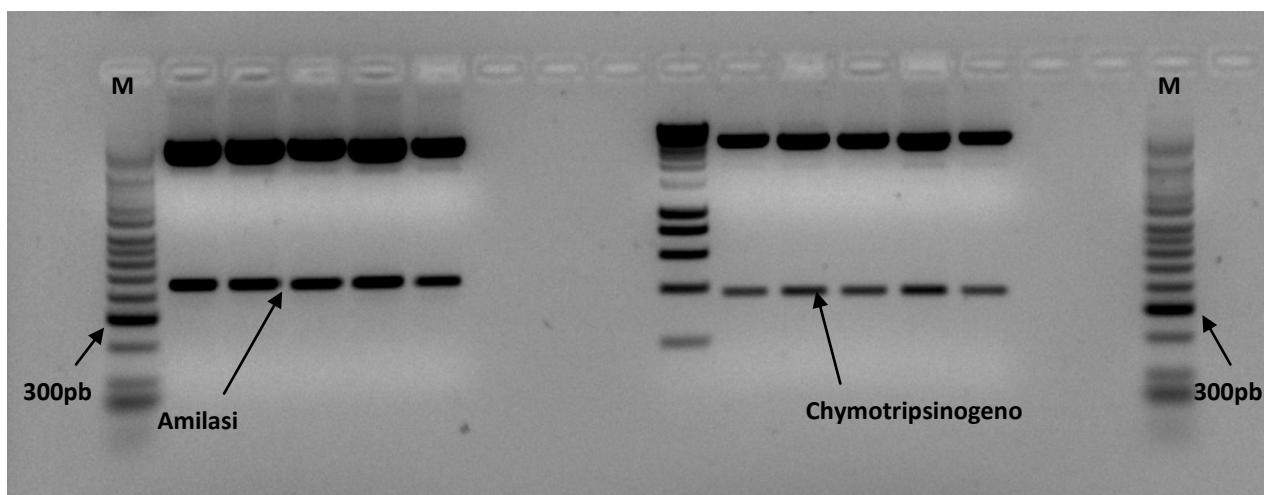
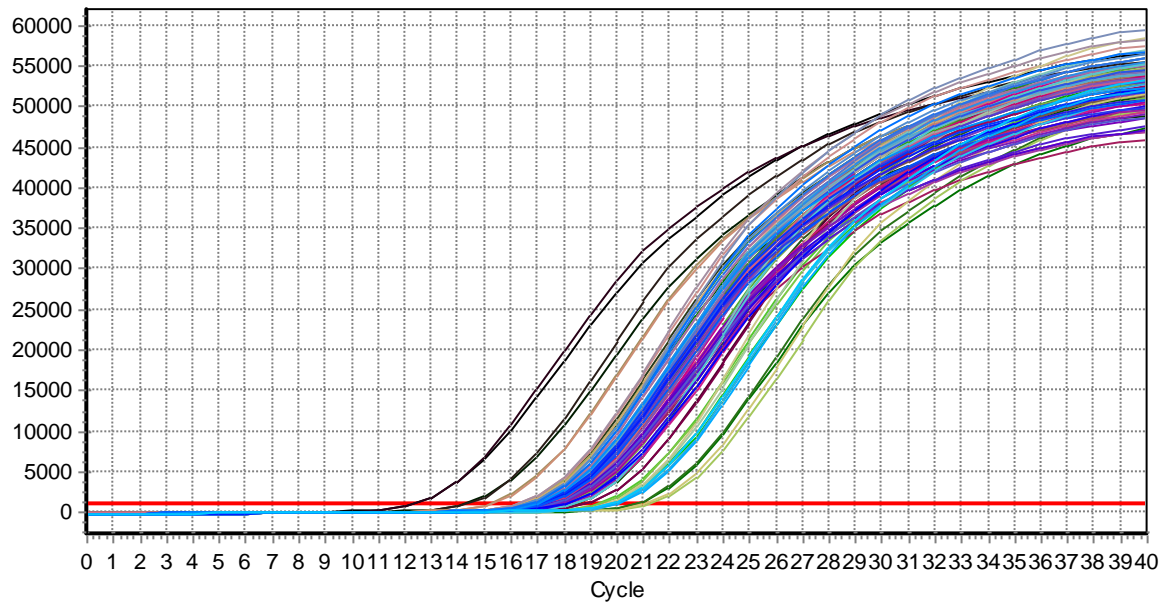


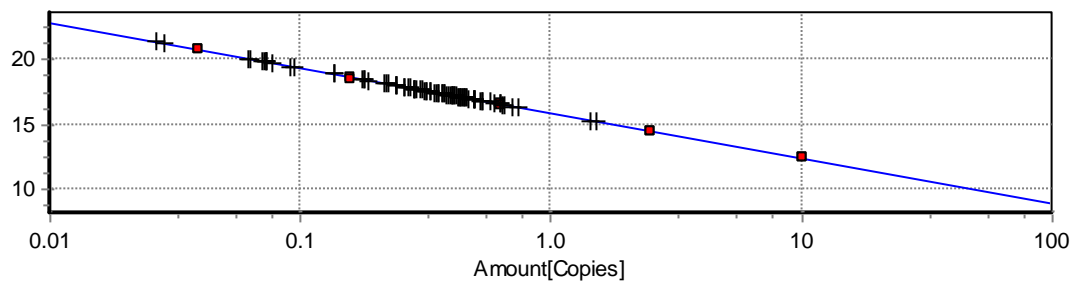
Figura 2. Gel elettroforesi dei frammenti di cDNA di amilasi e chimotripsinogeno in seguito a clonazione e successiva digestione del vettore PCR-4 TOPO con enzima di restrizione ECO -R1. M=marker; pb= paia basi.

I livelli di espressione di tripsinogeno, chimotripsinogeno e amilasi rinvenuti nelle larve di sogliola ai giorni 4, 8, 13, 18, 27 e 33 sono illustrati in Fig. 1, 2, 3. L'espressione per tutti i 3 precursori enzimatici è stata osservata dal giorno 4 (giorno dell'apertura boccale) al giorno 33 dopo la schiusa. I livelli di mRNA di tripsinogeno e chimotripsinogeno hanno mostrato un rapido aumento tra il giorno 4 e 8. Successivamente il tripsinogeno ha seguito un andamento fluttuante e omogeneo fino al 33 dph.



Threshold: 1072 (Noiseband)
 Baseline settings: automatic, Drift correction OFF

Figura 3. qrt-PCR Quantificazione relativa. Esempio di amplificazione di 45 campioni usando cDNA di larve di sogliola comune con primers specifici per tripsinogeno.



Slope: -3.458
 Y-Intercept: 15.86
 Efficiency: 0.95
 R²: 0.999

Figura 4. Curva Standard di riferimento. Livello di efficienza (Efficiency) e linearità dell'amplificazione (R²)

Similare è stato il trend osservato per il chimotripsinogeno, ma in questo caso un aumento dell'espressione è stato osservato tra i giorni 27 e 33. L'espressione dell'mRNA per l'amilasi ha seguito un trend di crescita nel corso di tutto il periodo di osservazione.

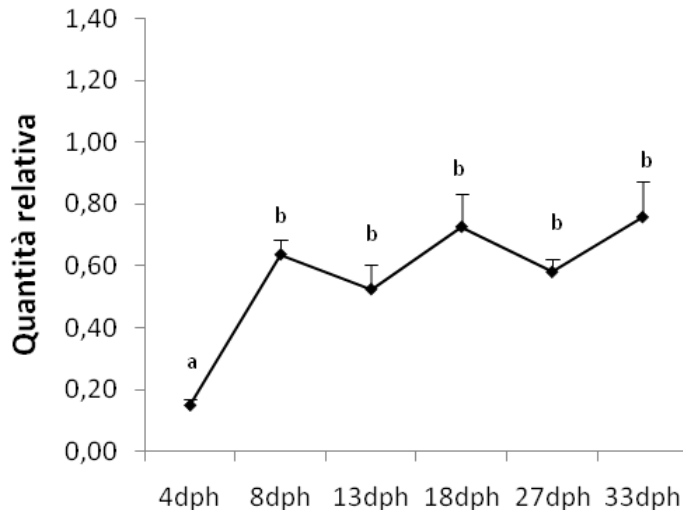


Figura 5. Livelli di mRNA per tripsinogeno nelle larve di sogliola comune (*Solea solea*) nel corso della sperimentazione. DPH: giorni dopo la schiusa. Ogni valore rappresenta la media (N=9) ± SE. Dati con lettere differenti in apice sono statisticamente differenti ($P \leq 0.05$).

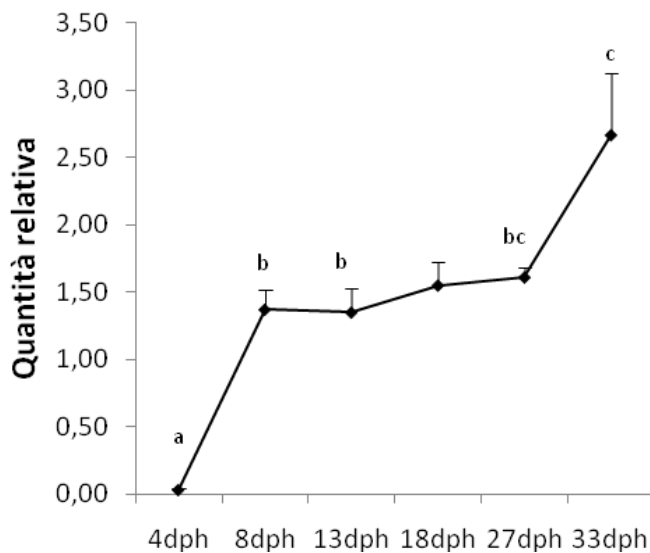


Figura 6. Livelli di mRNA per chimotripsinogeno nelle larve di sogliola comune (*Solea solea*) nel corso della sperimentazione. DPH: giorni dopo la schiusa. Ogni valore rappresenta la media (N=9) ± SE. Dati con lettere differenti in apice sono statisticamente differenti ($P \leq 0.05$).

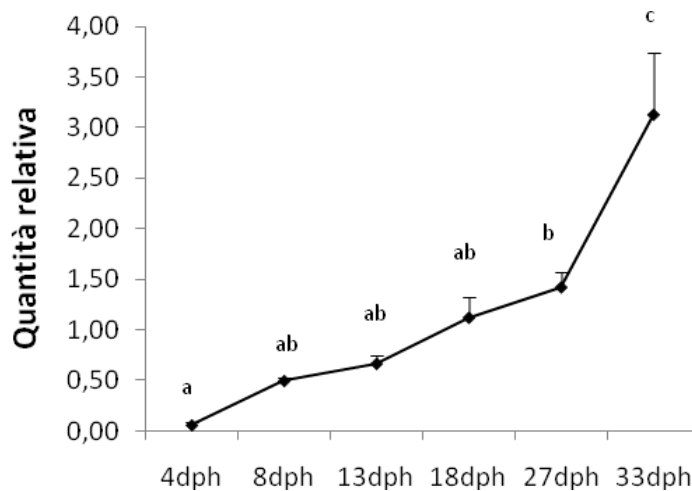


Figura 7. Livelli di mRNA per amilasi nelle larve di sogliola comune (*Solea solea*) nel corso della sperimentazione. DPH: giorni dopo la schiusa. Ogni valore rappresenta la media (N=9) ± SE. Dati con lettere differenti in apice sono statisticamente differenti ($P \leq 0.05$).

5.4 Discussioni e conclusioni

Le larve nel corso della prova hanno ottenuto un peso medio finale di 30mg ed una percentuale di sopravvivenza del 50-55% in accordo con quanto rinvenuto da Bonaldo et al., (2011) (Cap. V) per la stessa specie. Le sequenze parziali di mRNA di tripsinogeno, chimotripsinogeno e amilasi clonate in questa sperimentazione, rappresentano la prima raccolta di nucleotidi di questi precursori enzimatici nella sogliola comune (*Solea solea*). Le sequenze parziali di tripsinogeno hanno mostrato un'elevata somiglianza (97%) con quelle rinvenute per *Solea senegalensis* (Manchado et al., 2008), mentre le sequenze di chimotripsina e amilasi risultavano rispettivamente del 90 e 87% identiche a quelle di *Thunnus orientalis* e *Pagrus major* (Bae et al., 2008, non pubblicato). I livelli di mRNA, per il tripsinogeno sono incrementati rapidamente (300%) tra il 4° e l'8° giorno dopo la schiusa in concomitanza con l'inizio dell'alimentazione esogena. Un rapido incremento dell'espressione del tripsinogeno a livello di transcriptoma nei primi giorni dopo l'inizio dell'alimentazione esogena è stato descritto in larve di altre specie ittiche marine (Murray et al., 2004; Garcia-Gasca et al., 2006). L'aumento di espressione di tale precursore è stato inoltre associato all'aumento di attività enzimatica di tripsina in larve di merluzzo (Kortner et al., 2011) nei

primi giorni dopo l'apertura boccale. I risultati di questa sperimentazione supportano quelli di Machado et al., (2008) dove il tripsinogeno 1 è stato tra le differenti forme di tripsinogeno quello maggiormente espresso durante le prime fasi larvali in *Solea senegalensis*. Successivamente al rapido incremento osservato tra i giorni 4 e 8 dopo la schiusa, l'espressione del tripsinogeno si è mantenuta costante nel corso di tutta la sperimentazione. Tale osservazione è in contrasto con quanto osservato per altre specie ittiche marine dove è stato rinvenuto un *trend* di diminuzione dell'espressione dopo 2-3 settimane di vita delle larve (Kortner et al., 2011). La diminuzione di tripsina osservata nel corso dello sviluppo larvale è stata messa in relazione alla comparsa dell'attività gastrica che generalmente compare tra 30 e 60 giorni di vita delle larve. A questo stadio, infatti, il pepsinogeno acquisterebbe una maggior importanza nell'attività proteolitica rispetto alla tripsina. Nella sogliola comune e nella sogliola senegalese non ci sono informazioni precise a riguardo dell'attività della pepsina a livello gastrico. Yufera et al., (2007), hanno osservato come il pH gastrico in larve e giovanili di *Solea senegalensis* si mantenga a dei livelli maggiori di 6.0, indicando come la proteolisi a livello gastrico in questa specie sia limitata e avvenga principalmente a livello intestinale in un ambiente alcalino. L'espressione del chimotripsinogeno ha avuto un andamento simile a quella del tripsinogeno in accordo con Gamboa-Delgado et al., (2011). Tuttavia a differenza del tripsinogeno i livelli di mRNA di chimotripsinogeno hanno mostrato un incremento nell'ultimo periodo di osservazione (27-33 dph). Un aumento nell'espressione di tale enzima all'aumentare dello sviluppo della larva è stato rinvenuto anche per altre specie ittiche marine (Manuel Yufera, comunicazione personale). Rispetto agli enzimi proteolitici oggetto della sperimentazione, l'amilase ha mostrato un *trend* di crescita costante nel periodo di osservazione e dipendente dall'età/sviluppo della larva. L'amilasi è responsabile della scissione del legame 1.4 α glicosidico dell'amido e del glicogeno. Sono presenti solo alcuni studi su specie ittiche marine sull'espressione di tale enzima e questo studio rappresenta il primo nella Sogliola comune (*Solea solea*). L'espressione di tale enzima ha mostrato dei livelli relativamente elevati all'apertura boccale in larve di specie marine come il merluzzo, *Gadus morua*, (Kortner et al., 2011), il barramundi, *Lates calcarifer* (Ma et al., 2001) e il branzino, *Dicentrarchus labrax* (Darias et al., 2008). Inoltre con l'avanzare dello sviluppo della larva è stato descritto un rapido declino dell'espressione dell'amilasi (Kortner et al., 2011). Nonostante le ragioni scientifiche dell'ontogenesi dell'amilasi nelle larve di specie ittiche marine rimangano poco note, alcuni autori hanno avanzato l'ipotesi che l'amilasi contribuisca alla digestione delle

microalghe ingerite insieme allo zooplancton durante le prime fasi larvali (Kortner et al., 2011). Tale enzima è inoltre noto per essere maggiormente presente nelle specie ittiche onnivore rispetto a quelle carnivore (Hidalgo et al., 2001). In questo enzima il *trend* di crescita costante osservato nel presente studio a partire da livelli di espressione inferiore a quelli per tripsinogeno e chimotripsinogeno ne fa presupporre la minor importanza nei processi digestivi che occorrono nei primi giorni di alimentazione esogena. Tuttavia un andamento crescente dell'espressione con l'avanzare dello sviluppo larvale fa ipotizzare l'importanza di tale enzima in una fase successiva. Dai risultati in nostro possesso l'aumento dell'espressione dell'amilasi coinciderebbe con l'avanzare della metamorfosi momento in cui la sogliola perde le abitudini alimentari pelagiche per diventare una specie bentonica onnivora.

In conclusione questa sperimentazione descrive per la prima volta nella sogliola comune (*Solea solea*) l'ontogenesi di alcuni enzimi digestivi di rilevante importanza nelle prime fasi larvali. Tali indicazioni necessiteranno di ulteriori studi in particolare per verificare gli effetti che differenti trattamenti alimentari possono avere sull'espressione di tali enzimi. Questi primi risultati confermano come la tripsina e la chimotripsina siano gli enzimi proteolitici di maggiore importanza nei processi digestivi delle prime fasi larvali. Il *trend* dell'amilasi sembra essere direttamente proporzionale allo sviluppo della larva e potrebbe essere un enzima particolarmente importante nelle fasi successive a quelle larvali.

5.5 Bibliografia

- Bae, Y., Kato, K., Tsunemoto, K., Mukai, Y., Okada, T., Sawada, Y., Murara, O. and Miyashita, S., 2008. cDNA cloning and expression analysis of larvae and juveniles Pacific bluefin tuna, *Thunnus orientalis* and red sea bream, *Pagrus major*, Unpublished.
- Bonaldo, A., Parma, L., Badiani, A., Serratore, P., Gatta, P.P., 2011. Very early weaning of common sole (*Solea solea* L.) larvae by means of different feeding regimes and three commercial microdiets: Influence on performances, metamorphosis development and tank hygiene. *Aquaculture*, 321, 237-244.
- Darias, M.J., Murray, H.M., Gallant, J.W., Douglas, S.E., Yufera, M., Martinez-Rodriguez, G., 2007. The spatiotemporal expression pattern of trypsinogen and bile salt activated

- lipase during the larval development of red porgy (*Pagrus pagrus*, Pisces, Sparidae). *Marine Biology* 152, 109–118.
- Darias, M.J., Zambonino Infante, J.L., Hugot, K., Cahu, C.L., Mazurais, D., 2008. Gene expression patterns during the larval development of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by microarray analysis. *Marine Biotechnology* (NY) 10, 416–428.
- Garcia-Gasca, A., Galaviz, M.A., Gutierrez, J.N., Garcia-Ortega, A., 2006. Development of the digestive tract, trypsin activity and gene expression in eggs and larvae of the bullseye puffer fish *Sphoeroides annulatus*. *Aquaculture* 251, 366–376.
- Gamboa-Delgado, J., Le Vay, L., Díaz, C.F., Cañavate, P., Ponce, M., Zerolo, R., Manchado, M., 2011. Effect of different diets on proteolytic enzyme activity, trypsinogen gene expression and dietary carbon assimilation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part. B.* 158, 251–258
- Hidalgo, M.C., Urea, E., Sanz, A., 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170, 267–283.
- Howell, B., Conceição, L.E.C., Prickett, R., Canavate, P., Mananos, E., 2008. Proceedings of the IV Workshop on the Cultivation of Soles. Centre of Marine Science (CCMAR), University of the Algarve, Faro, Portugal.
- Ma, P., Sivaloganathan, B., Reddy, P.K., Chan, W.K., Lam, T.J., 2001. Ontogeny of alpha amylase gene expression in sea bass larvae (*Lates calcarifer*). *Marine. Biotechnology* 3, 463–469.
- Manchado, M., Infante, C., Asensio, E., Crespo, A., Zuasti, E., Cañavate, J.P., 2008. Molecular characterization and gene expression of six trypsinogens in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup) during larval development and in tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology, B. Biochemistry and Molecular Biology* 149, 334–344.
- Murray, H.M., Perez-Casanova, J.C., Gallant, J.W., Johnson, S.C., Douglas, S.E., 2004. Trypsinogen expression during the development of the exocrine pancreas in winter flounder (*Pleuronectes americanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology part A. Molecular and Integrative Physiology* 138, 53–59.
- Murray HM, Gallant JW, Johnson SC, Douglas SE (2006) Cloning and expression analysis of three digestive enzymes from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) during

- early development: Predicting gastrointestinal functionality. *Aquaculture*, 252, 394-408.
- Kortner, T., Overrein, I., Øie, G., Kjørsvik, E., Arukwe, A., 2011. The influence of dietary constituents on the molecular ontogeny of digestive capability and effects on growth and appetite in Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*). *Aquaculture* 315, 114-120.
- Yúfera, M., Daria, M.J., 2007. Changes in the gastrointestinal pH from larvae to adult in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 267, 94-99.
- Yúfera, M., Darias, M.J., 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture*, 268, 53-63.
- Zambonino Infante, J.L., Cahu, C.L., 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 130, 477-487.

**Capitolo VI - Influenza di diete contenenti differenti livelli
proteici sulle performance di accrescimento in giovanili di
Sogliola comune**

6.1 Abstract

This study was undertaken to determine the influence of dietary protein levels on growth, feed utilization and liver histology in common sole. Four isoenergetic diets were formulated to contain four different crude protein levels: 39 (P39), 45 (P45), 51 (P51) and 57 (P57) % dry weight. Fifty animals per tank (initial weight 10.2 ± 0.4 g) were randomly distributed into twelve 500 liter square tanks (bottom surface: 5600 cm^2) connected to a closed recirculation system. Diets were tested in triplicate for 84 days. At the end of the experiment final weight ranged from 19.6 (P39) to 25.4 g (P57). Specific Growth Rate (SGR) showed statistical differences between groups with the best results in group fed diet P57 ($1.07\% \text{ day}^{-1}$). Significant differences between groups were also recorded for Feed Conversion Ratio (FCR) with values of 1.31, 1.28, 1.12 and 0.94 in P39, P45, P51 and P57, respectively. Gross Lipid Efficiency (GLE) was also significantly affected by dietary treatment, with the highest value (42.07%) found in P57. Ammonia excretion, expressed as $\text{g.100 g protein intake}^{-1}$, was significantly lower for group P39 (2.46) than groups P51 (4.70) and P57 (4.75). Increased incidence of lipid droplets in hepatocytes was observed when dietary protein levels increased and/or dietary lipid decreased.

6.2 Introduction

Salmonids, gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) and European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) play a lead role in European fish production, however other farmed fish species are required to differentiate and widen market supply. From emerging candidate species, Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and common sole (*Solea solea* L.) show promise, as stated formerly by Howell (1997) and more recently by Imsland et al., (2003). Hatchery production of *Solea* spp. has been accomplished quite easily, and this has been a common bottleneck in commercial production of other potential marine fish species. However it is during the juvenile stages where several factors combine to reduce growth performance and thereby reduce the potential for commercial farming activities. These factors include feeding behaviour, susceptibility to disease and stocking density (Day et al., 1997; Imsland et al., 2003; Schram et al., 2006; Piccolo et al., 2008; Sánchez et al., 2010). Focusing on

nutrition and feeding of common sole juveniles and on-growing, which seem to be particularly critical points, some significant steps forward have recently been achieved for *S. senegalensis* (Rema et al., 2008; Borges et al., 2009; Rubio et al., 2009) establishing optimal protein and lipid levels for growth. Other recent findings on juveniles of *S. senegalensis* (Silva et al., 2009) and *S. aegyptiaca* (Chabanaud, 1927) (Bonaldo, et al., 2006) demonstrated the ability of *Solea* spp. to grow equally well when fed diets containing vegetable proteins in partial substitution of fish meal. Less information is currently available for common sole (*Solea solea*) nutrition (Piccolo et al., 2008) and it is inappropriate to rely on data from Senegalese sole, given differences in growth performance, optimal thermal regime, broodstock behaviour and natural range (Imsland et al., 2003 and Palazzi et al., 2006). Because dietary energy and protein are recognized as a key factors to influence both adequate fish nutrition and feeding costs (Watanabe, 2002) and considering the lack of specific knowledge on *S. solea*, the first aim of this research was to assess growth response and feed utilization when feeding common sole juveniles isoenergetic diets with different protein levels. Furthermore, considering the importance of liver as an indicator of nutritional and physiological status of fish (Bell et al., 1995; Robaina, et al., 1997; Caballero et al., 1999) the second purpose of this trial was to assess common sole liver histology in response to experimental diets.

6.3 Materials and methods

6.3.1 Diets

Four isoenergetic diets (estimated gross energy: 23.5 MJ kg⁻¹ DM) were formulated to contain different protein concentrations: 39 (P39), 45 (P45), 51 (P51) and 57 (P57) % DM. The energy level was chosen based on those used in previous trials on juvenile Senegalese sole (Dias et al., 2004; Rema et al., 2008). Protein sources of the diets were represented by fishmeal and vegetable protein ingredients such as soybean protein concentrate and wheat gluten meal at an increasing ratio. Their increase was in the same proportion at each step in order to keep the amino acids ratio constant among diets. In the absence of specific data on vitamin, mineral and trace mineral requirements of common sole, requirement data for other species were applied (National Research Council, 1993). The ingredients and the proximate composition are given in Table 1. Pellets of 4 mm were produced using an experimental extruder by Skretting Aquaculture Research Center, Stavanger, Norway. Pellets were crumbled and sieved to obtain suitable particles sizes.

Table 1. Ingredients and proximate composition of the experimental diets

	Diet			
	P39	P45	P51	P57
Dietary ingredients (%)				
Fish meal LT	26.7	32.0	34.7	40.0
Soybean protein concentrate	10.7	12.8	13.9	16.0
Wheat	31.1	24.5	21.0	14.4
Fish oil	19.0	16.2	14.7	11.9
Wheat gluten meal	10.7	12.8	13.9	15.9
Vitamin and mineral premix*	1.8	1.8	1.8	1.8
Proximate analysis				
Dry matter (DM) (%)	91.8	93.2	92.7	91.4
Crude protein (% DM)	39.0	45.2	51.0	56.6
Crude fat (% DM)	23.3	22.8	20.4	18.1
Ash (% DM)	6.1	6.4	7.0	7.6
Gross Energy (MJ Kg ⁻¹)	23.5	23.5	23.8	23.0
CP/GE (Kg MJ ⁻¹)	16.6	19.2	21.4	24.6

* Skretting standard vitamin and mineral premix

6.3.2 Fish, experimental set-up and sampling

The experiment was carried out at the Laboratory of Aquaculture, Faculty of Veterinary Medicine, Cesenatico, Italy. The common sole (*S. solea*) juveniles with an initial average weight 10.2 ± 0.4 g were obtained from the hatchery Solea B.V IJmuiden, The Netherlands. Prior to the experiment, the fish were acclimatized for four weeks to the experimental facilities and fed commercial fish meal-based diets (Skretting, Verona, Italy; crude protein 55%, crude fat 18%). At the start of the trial, 50 fish were randomly distributed into each of twelve 500 liter square tanks (bottom surface: 5600 cm^2). Each diet was fed to triplicate tanks for 84 days. Tanks were provided with natural seawater and connected to a unique closed recirculation system consisting of a mechanical sand filter, an ultraviolet light and a biofilter. Water exchange rate per tank was 100% every 2 hours. Overall water renewal of the system was 5% daily. Temperature was kept constant at 20 ± 1 °C throughout the experiment; photoperiod was held constant at a 12-h day length through artificial light (200 lux at the water surface — Delta Ohm luxmeter HD-9221; Delta-Ohm, Padua, Italy). Water temperature and dissolved oxygen ($\geq 6.5 \text{ mg L}^{-1}$) were monitored daily in each tank. Ammonia (total ammonia nitrogen $\leq 0.1 \text{ mg L}^{-1}$), nitrite ($\text{NO}_2^- \leq 0.2 \text{ mg L}^{-1}$) and nitrate ($\text{NO}_3^- \leq 50 \text{ mg L}^{-1}$) were determined spectrophotometrically once weekly (Spectroquant Nova 60, Merk, Lab business) at 12.00 p.m. At the same time, pH (7.8–8.2) and salinity ($28\text{--}33 \text{ g L}^{-1}$) were also determined. Fish were hand-fed twice daily (at 9.00 a.m. and 5.00 p.m.) at a fixed rate of 1.3% body weight.day⁻¹, seven days per week. According to the appetite of fish registered in previous trials conducted in our facilities (unpublished data), this ratio was considered close to satiation. Feeding levels were recalculated daily for each tank according to the FCR and SGR obtained at each intermediate weighing. Feed losses were minimal throughout the trial but, when necessary, remaining feed was estimated and deducted from feed intake for overall calculations. At the beginning and at the end of the experiment, all the fish of each tank were individually weighed and total length was recorded. Total biomass was also determined at day 28 and 56 by bulk weighing. Carcass proximate composition was determined at the beginning and at the end of the trial. In the former case, five pooled samples of five fish each were sampled to determine initial proximate composition while in the latter case one pooled sample of five fish from each tank was collected to determine final proximate composition. Furthermore, at the end of the trial, wet weight, viscera and liver weight were individually

recorded from 5 fish per tank for determination of visceral and hepatosomatic indices. At this time, two fish per tank were also randomly sampled for liver histology.

In order to evaluate nitrogen metabolism, after the end of the growth trial, ammonia excretion was measured in all tanks during a 24 h cycle, integrating repeated collected values according to the following formula given by Kaushik (1980):

$$Et = V_0 \times \Delta C + Ct \times \Delta W$$

Where V_0 = volume of water in the tank

ΔC = difference in total nitrogen ammonia ($C_i - C_{i-t}$)

C_t = mean of total nitrogen ammonia concentration between two consecutive intervals ($(C_i + C_{i-t})/2$)

ΔW = flow rate/unit of time "t"

t = unit of increment in time in which concentration variation is considered minimal

Et = total nitrogen ammonia excreted by fish per unit of time retained

The water inflow was kept constant at 250 l/h in each tank the day before and during ammonia sampling. Water of each tank was sampled from the outlet at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18, and 24 hrs after the first meal. A tank without fish was used as a blank.

Samples were immediately stored at -32 °C until analysis. Ammonia concentration in samples was measured by the indophenol method (Koroleff, 1983) and overall data were expressed as g of total nitrogen ammonia per 100 g protein intake.

All experimental procedures were evaluated and approved by the Ethical-scientific Committee for Animal Experimentation of the University of Bologna, in accordance with the European Community Council directive (86/609/ECC).

6.3.3 Analyses of diets and body composition

The experimental diets and carcasses were analyzed for dry matter (drying to constant weight in a stove at 105 °C), crude protein ($N \times 6.25$, determined by the Kjeldahl method), fat (Folch, et al., 1957) and ash content (incineration to constant weight in a muffle oven at 450 °C).

6.3.4 Calculations

The formulae employed were calculated as follows:

Specific growth rate (SGR) ($\% \text{ day}^{-1}$) = $100 \times (\ln \text{FBW} - \ln \text{IBW}) / \text{days}$, where FBW and IBW represent final and initial weights (tank means), respectively. Feed conversion rate (FCR) = feed given / weight gain. Condition factor (CF) = $100 \times (\text{body weight} / \text{total length}^3)$. Viscerosomatic index (VSI) (%) = $100 \times (\text{viscera weight} / \text{body weight})$. Hepatosomatic index (HSI) (%): $100 \times (\text{liver weight} / \text{body weight})$. Protein efficiency ratio (PER) = body weight gain / protein intake. Gross protein efficiency (GPE) (%) = $100 \times ((\% \text{ final body protein} \times \text{final body weight}) - (\% \text{ initial body protein} \times \text{initial body weight})) / \text{total protein intake fish}$. Gross lipid efficiency (GLE) (%) = $100 \times ((\% \text{ final body lipid} \times \text{final body weight}) - (\% \text{ initial body lipid} \times \text{initial body weight})) / \text{total lipid intake fish}$.

6.3.5 Liver histology

At the end of the trial, two fish per tank were sampled for liver histology. Samples were fixed in 10% buffered formalin, dehydrated in a graded ethanol series and embedded in paraffin. Section series of 4 μm were stained with hematoxylin and eosin (H&E). From each fish, a sample of liver was snap-frozen in liquid nitrogen. Quenching was accomplished by putting a small amount of embedding medium for frozen tissue specimens (OCT) (Tissue-Tek, Sakura) onto a cork disc where the sample was positioned, and then dropping it into a beaker containing isopentane and liquid nitrogen for 1 min and stored at -80°C . Frozen sections of 3 μm were cut in cryostat (Leica) and stained with Oil red O. Histological samples were evaluated objectively by two pathologists (R.S., L.M.) and blindly with respect to diet group; liver sections were scanned at 40x lens with a light microscope and 10 fields were selected; according to grade of severity and distribution of the fatty infiltration within the cells (hepatic steatosis) and through the histological section (from multifocal to diffuse distribution), cases were classified as mildly affected (cytoplasmic filling of a clear, optically-empty content forming microvesicular spaces), moderately affected (cytoplasmic filling of a clear, optically-empty content pulling the nucleus at the cell periphery and forming macrovesicular spaces) or severely affected (cytoplasmic filling of a clear, optically-empty content giving an appearance of signet-ring cells). If these changes were not present, livers were considered normal.

6.3.6 Statistical analyses

The performance response and the proximate composition of fish fed the experimental diets were analyzed using nested ANOVA and Newman-Keuls post-hoc test. The presence of morphological changes in the distal intestinal structure of different groups of fish at the end of the trials were compared using the Kendall tau rank correlation coefficient. All statistical analyses were performed using SAS computer software (SAS 2004). Tank was used as the experimental unit for analyzing the growth performance and ammonia excretion; a pool of five sampled fish was considered the experimental unit for analyzing carcass composition, whereas individual fish was used for analyzing CF, VSI and HSI and morphological changes. Significant differences were assumed when $P \leq 0.05$.

6.4 Results

Table 2. Growth, feed utilization and ammonia excretion of sole fed with experimental diets

Parameters	Diet			
	P39	P45	P51	P57
IBW	10.1 ± 0.3	10.1 ± 0.7	10.2 ± 0.3	10.3 ± 0.3
FBW	19.6 ± 0.2 ^a	20.0 ± 1.6 ^a	21.6 ± 1.2 ^a	25.4 ± 0.3 ^b
WG	9.6 ± 0.4 ^a	9.9 ± 0.9 ^a	11.4 ± 0.9 ^b	15.1 ± 0.3 ^c
SGR	0.80 ± 0.04 ^a	0.81 ± 0.02 ^a	0.89 ± 0.04 ^b	1.07 ± 0.03 ^c
FCR	1.31 ± 0.02 ^a	1.28 ± 0.01 ^a	1.12 ± 0.07 ^b	0.94 ± 0.02 ^c
PER	1.93 ± 0.10	1.73 ± 0.03	1.73 ± 0.09	1.86 ± 0.03
GPE	35.06 ± 0.42	29.68 ± 5.25	30.33 ± 1.80	33.72 ± 7.82
GLE	26.23 ± 2.50 ^a	27.29 ± 4.60 ^a	32.19 ± 3.37 ^{ab}	42.07 ± 5.25 ^b
Total ammonia nitrogen excretion	2.46 ± 0.26 ^a	3.51 ± 0.21 ^{ab}	4.70 ± 0.89 ^b	4.75 ± 0.23 ^b

Data (mean ± SD, n=3) in the same row with different subscripts are significantly different ($P \leq 0.05$). IBW, initial body weight (g); FBW, final body weight (g); WG, weight gain (g) = FBW – IBW; SGR, specific growth rate (% day⁻¹) = 100 x (ln FBW – ln IBW) / days; FCR, feed conversion rate = feed given / WG; PER, protein efficiency ratio = body weight gain / protein intake; GPE, gross protein efficiency (%) = 100 x ((% final body protein x final body weight) – (% initial body protein x initial body weight)) / total protein intake fish; GLE, gross lipid efficiency (%) = 100 x ((% final body lipid x final body weight) – (% initial body lipid x initial body weight)) / total lipid intake fish); total ammonia nitrogen excretion (g 100g protein intake⁻¹) = 100 x (total ammonia nitrogen (g) / protein intake (100g)).

All fish readily accepted the experimental diets and feed intake was determined directly by the feeding regime. Overall mean mortality in terms of number of fish was less than 2% and no significant differences were recorded between groups ($P= 0.9707$). Growth and feed utilization are shown in Table 2. Final weight, weight gain and SGR in fish fed Diet P57 were significantly higher than those found in the other groups. Similarly fish fed Diet P57 had significantly lower FCR in comparison to the other fish groups. Fish fed diets P39 and P45 showed similar results, while the group fed Diet P51 had intermediate values with statistical differences for weight gain, SGR and FCR.

Table 3. Whole body proximate composition and biometric parameters of sole fed with the experimental diets

	P39	P45	P51	P57
Proximate composition				
Moisture	75.35 ± 0.38	75.20 ± 0.58	75.56 ± 0.19	75.23 ± 0.88
Protein	16.56 ± 0.35	16.05 ± 1.58	16.39 ± 0.78	16.79 ± 2.40
Lipid	6.93 ± 0.38	6.85 ± 0.61	6.67 ± 0.35	6.61 ± 0.49
Ash	2.83 ± 0.07	2.48 ± 0.20	2.17 ± 0.07	2.39 ± 0.45
Biometric parameters				
CF	1.04 ± 0.12	1.05 ± 0.13	1.04 ± 0.13	1.07 ± 0.12
VSI	4.88 ± 0.48	5.04 ± 0.59	5.31 ± 0.95	5.42 ± 0.77
HSI	1.07 ± 0.22	1.06 ± 0.18	1.11 ± 0.26	1.19 ± 0.17

Data are shown as mean ± SD

Moisture, protein, lipid and ash (% wet weight), $n=1$ pool of 5 fish/tank; CF, condition factor = $100 \times (\text{body weight}/\text{total length}^3)$, $n= 50/\text{tank}$. VSI, viscerosomatic index (%) = $100 \times (\text{viscera weight}/\text{body weight})$, $n= 10/\text{tank}$; HSI, hepatosomatic index (%) = $100 \times (\text{liver weight}/\text{body weight})$, $n= 10/\text{tank}$.

Data on nutrient retention efficiency and ammonia excretion are presented in Table 2. PER and GPE were not statistically different among groups. GLE was higher in fish fed Diet P57 and significantly different from fish fed diets P39 and P45. Ammonia excretion was not statistically different between groups fed diets P45, P51 and P57 and significant differences were only recorded between group P39 and both P51 and P57. Carcass proximate composition and biometric parameters were very similar between groups, with no significant differences (Table 3).

According to the histology observation, livers were pink or white, and the rich vascular network, which constitutes a physiological feature of these fish, was evident. .

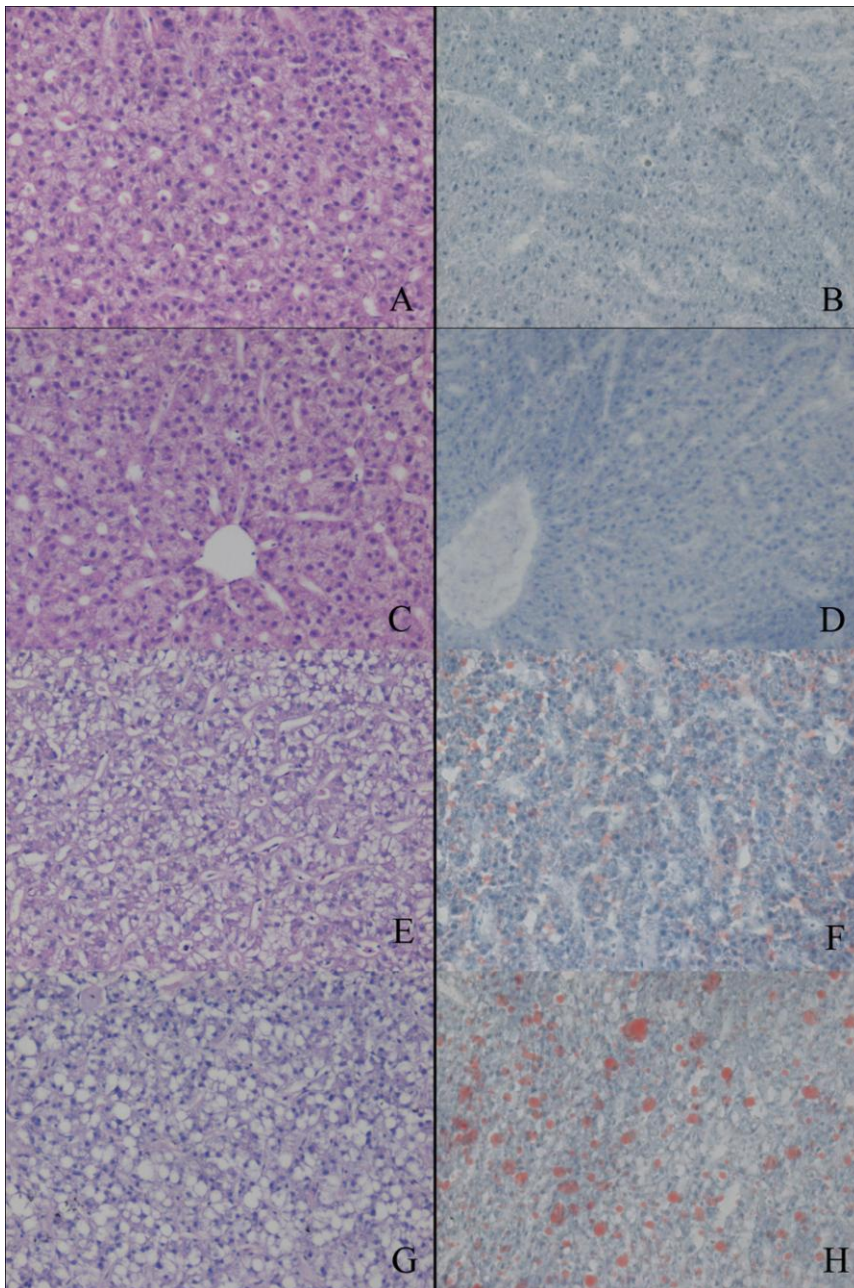


Figure 1. Figure 1 (A-D): hepatic parenchyma from sole fed diet P39 (A and B) and diet P45 (C and D) was considered as “Normal”. Absence of intracytoplasmic lipidic droplets in the hepatocytes, both on H&E (A, C) and Oil Red O stainings (B, D), 40x lens. (E and F): hepatic parenchyma from sole fed diet P51 was considered with mild hepatic fatty infiltration. Hepatocytes contain a clear, optically-empty content forming microvesicular intracytoplasmic spaces (E). Oil Red O stain demonstrated small, single, intracellular orange droplets (F), 40x lens. (G and H): hepatic parenchyma from sole fed diet P57 was considered with moderate hepatic fatty infiltration. Hepatocytes are filled with clear, optically-empty content that pulls the nucleus at the cell periphery and gives a macrovesicular appearance (G). Oil Red O stain detected large orange droplets. (H), 40x lens.

Twelve cases, which did not show intracytoplasmic lipidic droplets in the hepatocytes both on H&E and Oil Red O staining, were classified as normal (Fig.1 A and B).

In six cases there was a cytoplasmic filling of a clear, optically-empty content forming microvesicular spaces (mild hepatic fatty infiltration); in these cases Oil Red O stain demonstrated small, intracellular orange droplets (Fig. 2 A and B). In the other six cases this material, markedly pulling the nucleus at the cell periphery, gave macrovesicular appearance to the hepatocytes, and showed multifocal to diffuse distribution through the histological section (moderate, multifocal to diffuse hepatic fatty infiltration) (Fig.3 A); Oil Red O stain depicted larger orange droplets. Occasionally, very large extracellular orange droplets were found, due to rupture of cytoplasmic membranes during freezing and condensation of the lipidic content (Fig. 3 B). In all cases a mild, diffuse cytoplasmic swelling was detected (hepatic hydropic degeneration). All this findings were statistically more frequent in fish fed diets P51 and P57 than in those fed diets P39 and P45.

6.5 Discussion

While growth of common sole has been studied for many years (Howell, 1997) and many attempts have been made to overcome low growth rates, poor results has been achieved so far. Sole have two unusual features which may limit growth potential; they have a peculiar gut morphology which presents a relatively small stomach without pyloric caecae and a long intestine; furthermore feeding behaviour in natural environment occurs almost entirely by means of chemoreception and with a frequent ingestion of small prey items (de Groot, 1971). In juveniles of Senegalese sole fed isoenergetic diets with five different protein levels (CP 43; 48; 53; 57; 60) Rema et al. (2008) found SGR ranging from 0.93 to 1.22%.day⁻¹ with statistical differences related to dietary protein levels. In particular, at least 53% CP was necessary to obtain the maximum growth rate. In the present trial SGR ranged from 0.80 to 1.07% day⁻¹. SGR was significantly affected by dietary protein level, with the highest values recorded for fish fed Diet D57. These findings, although the experiment was shorter, are comparable to the growth rate described by Howell (1997) in common sole, indicating that diet P57 is able to sustain good performance of *Solea solea* juveniles.

Concerning feed utilization, the present study demonstrated the influence of dietary protein levels on FCR and GLE but not on PER and GPE. A comparison with other data on common sole is quite difficult because the paucity of sources. Piccolo et al., (2008) evaluated the

performance of 30 g common sole fed diets containing 50% (Diet A) and 54% (Diet B) crude protein for 300 days. The FCR were 2.65 and 2.49 for diet A and B respectively, with a statistical difference between treatments. The authors reported the presence of uneaten feed throughout the experimental period and hence those values could not represent the real FCR. Rema et al., (2008) carried out a trial on Senegalese sole juveniles to define the optimal protein levels with experimental diets containing a crude protein percentage of 43, 48, 53, 57 and 60. They found feed efficiency very close to 1 for the last three groups. In the present trial FCR decreased progressively from 1.31 in fish fed the lowest protein level to 0.94 in fish fed the highest protein level. In the current trial, the highest protein level (Diet P57) resulted in the lowest FCR. This was lower than previously reported for Senegalese sole fed optimal dietary protein levels (Rema et al., 2008). There are no data available regarding protein utilization for common sole and hence a comparison can be only made with other fish species. The present study showed no influence of dietary protein level on PER and GPE and this is in accordance with previous findings by Rema et al., (2008) for juvenile of Senegalese sole fed diets containing different protein levels ranging from 43 to 60%.

Cadena-Roa (1983) studied protein requirements of common sole using semi-purified diets based on casein and gelatin with protein levels ranging from 24 to 77% and the best performance was obtained at 57 to 58% dietary protein. This finding supports the results of the present trial for fish fed Diet P57, where SGR and FCR were not only the best among the other groups but also very similar to what was found for Senegalese sole. Data shown in the present study cannot clarify if a higher dietary protein level could improve common sole growth performance, however it seems reasonable to consider 57% crude protein to be a reference point quite close to the requirements for juvenile common sole. In addition to growth results, GLE increased significantly with increasing dietary protein levels (Table 2). Since higher dietary protein levels were balanced by a proportional lipid and carbohydrate reduction (Table 1) and assuming that higher protein levels gave a good nitrogen utilization in this experiment, it is probable that lipid retention is mainly related to dietary lipid and carbohydrate levels, with negligible influence of dietary protein levels. This hypothesis is in accordance to the results found by Rema et al., (2008) where lower dietary lipid content (between 10% to 13%) resulted in higher lipid retention. These data may suggest a lower dietary lipid content than those used in the present trial is capable to fulfill common sole lipid requirements, irrespective of the dietary protein levels, as already stated for Senegalese sole (Rema et al., 2008, Borges et al., 2009). Whole body composition (Table 3) was in

accordance with values found for Senegalese sole (Dias et al., 2004; Rema et al., 2008). Surprisingly, the proximate carcass composition was not affected by dietary treatments in contrast to Rema et al., (2008) who found that increased dietary protein levels tended to decrease whole-body fat deposition. Carcass proximate composition in the present study is similar to previously reported data for other flatfish species, such Atlantic halibut (Aksnes et al., 1996). HSI observed in this study, ranging from 1.06 to 1.19, are within the values found in a trial conducted by Dias et al., (2004) with juvenile Senegalese sole whereas VSI were slightly higher in the present study.

Table 4. Number of animals per dietary treatment that displayed of morphological changes in liver ($n= 6$)

Diet	Normal	Mild lipidic morphological changes	Moderate lipidic morphological changes
P39	6	0	0
P45	5	1	0
P51	0	3	3
P57	1	2	3
Tau	0.421		
<i>P</i>	0.019		

Liver histology showed an higher density of intracytoplasmic lipidic droplets (steatosis) in fish fed diets P51 and P57 (Table 4). Steatosis can be associated with an excess of lipids in the diet, resulting in fat accumulation in the liver (Rueda-Jasso, et al., 2007) or to a deficiency in lipotropic factors which are able to prevent or remove an excessive accumulation of fat in the liver (Mato et al., 2008). In this case, the inverse correlation between dietary lipid levels and the presence of lipid droplets in hepatocytes led us to lean towards a third mechanism. Liver is the major site of *de novo* fatty acid synthesis in fish (Henderson & Sargent, 1981; Lin et al., 1977) as in mammals (Hillgartner et al., 1995) and it is proposed that the elevated incidence of intracytoplasmic lipidic droplets for the high protein/low lipid diet is due to

increased hepatic lipogenesis. This is supported by elevated activity of lipogenic enzymes, i.e. FAS, G6PDH, ME and 12 ACC that have been previously described for a variety of fish species fed similar diets, including channel catfish (Likimani & Wilson 1982), carp (Shimeno et al., 1995), European sea bass (Dias et al., 1998), Atlantic salmon (Arnesen et al., 1993) or rainbow trout (Kolditz et al., 2008).

6.6 Conclusion

In conclusion dietary protein levels employed in this trial demonstrated a considerable influence on growth, feed utilisation and nitrogen excretion in common sole juveniles with the highest SGR and the lowest FCR achieved with diet containing 57% crude protein ($1.07\% \text{ day}^{-1}$ and 0.94, respectively). Lipid retention increased when dietary protein raised and dietary lipids decreased. Further research is needed to clarify both protein and protein/energy ratio requirements of common sole juveniles and protein level influences on GLE. Regarding liver histology, the presence of lipid droplets in hepatocytes suggested a lipogenesis enhancement when dietary protein levels increase and/or dietary lipids decrease. Finally the overall performances of common sole juvenile, especially those related to growth and feed conversion rate of group P57, allow us to confirm the good potential of this fish species for intensive aquaculture.

6.7 Acknowledgements

This research was supported by grants from the Italian Region Emilia-Romagna. We thank Lorenzo Mariani, Marina Silvi and Sara Giuliani for technical assistance, Elettra Pignotti for statistical analyses and Leo Nankervis for English editing. Diets were kindly provided by Skretting ARC, Stavanger, Norway.

6.8 References

- Aksnes, A., Hjertnes, T. & Opstvedt, J., 1996. Effect of dietary protein level on growth and carcass composition in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L). *Aquaculture* 145, 225-233.
- Arnesen, P., Krogdahl, Å., Kristiansen I.Ø., 1993. Lipogenic enzyme activities in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 105, 541-546.
- Bell, J.G., Tocher, D.R., MacDonald, F.M. Sargent, J.R., 1995. Effects of dietary borage oil [enriched in γ -linolenic acid,18:3(n-6)] or marine fish oil [enriched in eicosapentaenoic acid,20:5(n-3)] on growth, mortalities, liver histopathology and lipid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). *Fish Physiology and Biochemistry* 14, 373-383.
- Bonaldo, A., Roem, A.J., Pecchini, A., Grilli, E., Gatta, P.P., 2006. Influence of dietary soybean meal levels on growth, feed utilization and gut histology on Egyptian sole (*Solea aegyptiaca*) juveniles. *Aquaculture* 261, 580-586.
- Borges, P., Oliveira, B., Casal, S., Dias, J., Conceição, L., Valente, L.M.P., 2009. Dietary lipid level affects growth performance and nutrient utilisation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *British Journal of Nutrition* 102 (7), 1007 – 1014.
- Caballero, M.J., López-Calero, G., Socorro, J., Roo, F.J., Izquierdo, M.S., Fernández, A.J., 1999. Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 179, 277–290.
- Cadena-Roa, M., 1983. Etude expérimentale de l'alimentation de la sole (*Solea vulgaris*, Q.) en élevage intensif, Thèse Doctorat de 3ème Cycle Univ. de Bretagne Occidentale, Brest, France.
- Day, O.J., Howell, B.R. Jones, D.A., 1997. The effect of dietary hydrolysed fish protein concentrate on the survival and growth of juvenile Dover sole, *Solea solea* (L.), during and after weaning. *Aquaculture Research* 28, 911-921.
- Dias, J., Rueda-Jasso, R., Panserat, S., Conceição, L.E.C., Gomes, E.F. Dinis, M.T., 2004. Effect of dietary carbohydrate-to-lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Aquaculture Research* 35, 1122-1130.

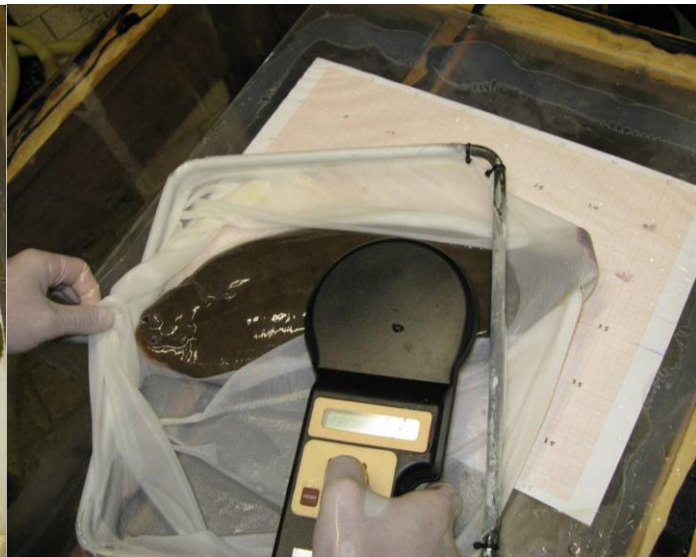
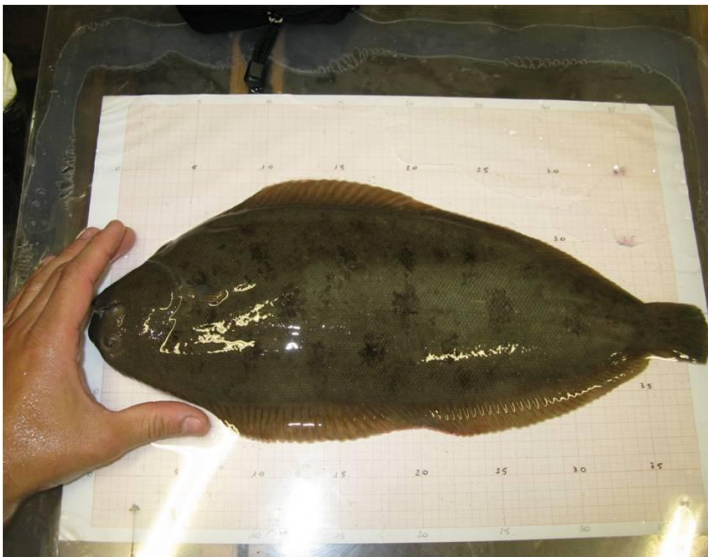
- Dias, J., Alvarez, M.J., Diez A., Arzel, J., Corraze, G., Bautista, J.M., Kaushik, S.J., 1998. Regulation of hepatic lipogenesis by dietary protein/energy in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 161, 169-186.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.G., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal Biological Chemistry* 226, 497–509.
- Groot, S.J., de 1971. On the inter-relationships between the morphology of the alimentary tract, food and feeding behavior in flatfishes (Pisces: Pleuronectiformes). *Netherland Journal of Sea Research* 5, 121–196.
- Henderson, R.J., Sargent, J.R., 1981. Lipid biosynthesis in rainbow trout, *Salmo gairdnerii*, fed diets of differing lipid content. *Comparative Biochemistry and Physiology C* 69, 31-37.
- Hillgartner, F.B., Salati, L.M., Goodridge, A.G., 1995. Physiological and molecular mechanisms involved in nutritional regulation of fatty acid synthesis. *Physiological Review* 75, 47-76.
- Howell, B.R., 1997. A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture* 155, 355-365.
- Imsland, A.K., Foss, A., Conceição, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P., 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13, 379-408.
- Kaushik, S. J., 1980. Influence of nutritional status on the daily patterns of nitrogen excretion in the carp (*Cyprinus Carpio* L.) and the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *Reproduction Nutrition Development* 20, 1751-1765.
- Kolditz, C., Borthaire, M., Richard, N., Corraze, G., Panserat, S., Vachot, C., Lefevre, F. Medale, F., 2008. Liver and muscle metabolic changes induced by dietary energy content and genetic selection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 294, 1154-1164.
- Koroleff, F., 1983. Determination of ammonia. In: R. Grasshoff, M. Ehrhardt and R. Kromling, Editors, *Methods of Seawater Analysis* (2nd edition), Verlag Chemic, Weimheim, Germany, pp. 150–162.
- Likimani, T.A., Wilson, R.P., 1982. Effects of diet on lipogenic enzyme activities in channel catfish hepatic and adipose tissue. *Journal of Nutrition* 112, 112-117.

- Lin, H., Romsos, D.R., Tack, P.I., Leveille, G.A., 1977. Influence of Diet on in Vitro and in Vivo Rates of Fatty Acid Synthesis in Coho Salmon [*Oncorhynchus Kisutch* (Walbaum)]. *Journal of Nutrition* 107, 1677-1682.
- Mato, J.M., Martínez-Chantar, M.L., Lu, S.C., 2008. Methionine metabolism and liver disease. *Annual Review of Nutrition* 28, 273-293.
- Myers, R.K., Mc Gavin, M.D., 2007. Cellular and tissue responses to injury. In: Gavin M. D., Zachary J.F. (Eds.). *Pathologic basis of veterinary disease*. 4th edition. Mosby Year Book, St. Louis, Missouri, 3-62.
- National Research Council (NRC) 1993. *Nutrient Requirements of Fish*. National Academy Press, Washington, DC.
- Palazzi, R., Richard, J., Bozzato, G., Zanella, L., 2006. Larval and juvenile rearing of common sole (*Solea solea* L.) in the Northern Adriatic (Italy). *Aquaculture* 255, 495-506.
- Piccolo, G., Marono, S., Bovera, F., Tudisco, R., Caricato, G., Nizza, A., 2008. Effect of stocking density and protein/fat ratio of the diet on the growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture Research* 39, 1697-1704.
- Rema, P., Conceição, L.E.C., Evers, F., Castro-Cunha, M., Dinis, M.T., Dias, J., 2008. Optimal dietary protein levels in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Nutrition* 14, 263-269.
- Robaina, L., Moyano, F.J., Izquierdo, M.S., Socorro, J., Vergara, J.M., Montero, D., 1997. Corn gluten and meat and bone meals as protein sources in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*): Nutritional and histological implications. *Aquaculture* 157, 347-359.
- Rubio, V.C., Boluda Navarro, D., Madrid, J.A., Sánchez-Vázquez, F.J., 2009. Macronutrient self-selection in *Solea senegalensis* fed macronutrient diets and challenged with dietary protein dilutions. *Aquaculture* 291, 95-100.
- Rueda-Jasso, R., Conceição, L.E.C., Dias, J., De Coen, W., Gomes, E., Rees, J.F., Soares, F., Dinis, M.T., Sorgeloos, P., 2004. Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture* 231, 417-433.
- SAS 2004 SAS Institute Inc., 2004. SAS Version 9.0. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Sánchez, P., Ambrosio, P.P., Flos, R., 2010. Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 123, 234-245

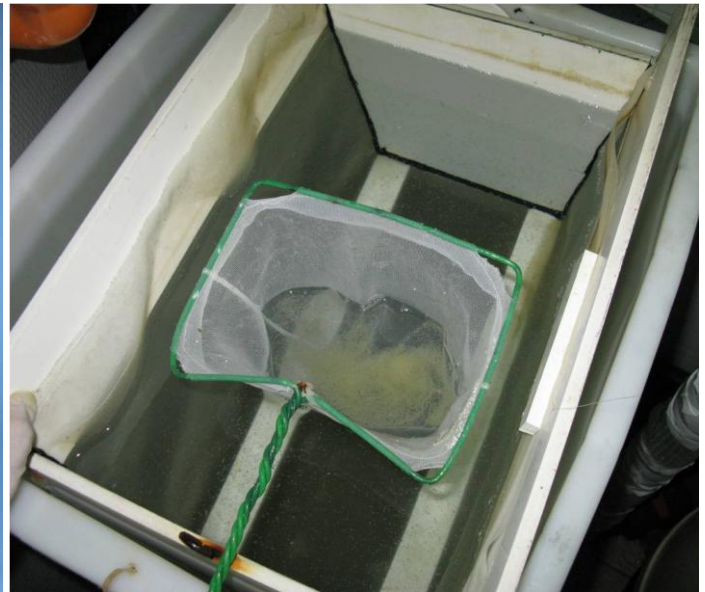
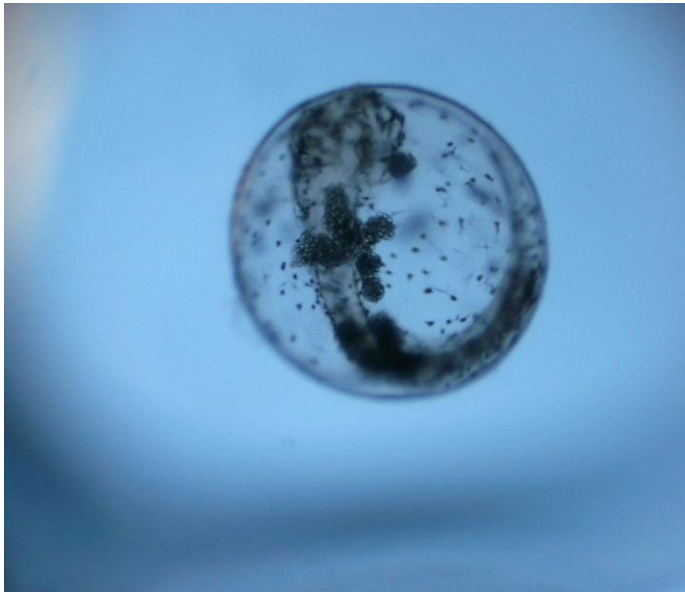
- Schram, E., Van der Heul, J.W., Kamstra, A. Verdegem, M.C.J., 2006. Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture* 252, 339-347.
- Shimeno, S., Kheyyali, D. Shikata, T., 1995. Metabolic response to dietary lipid to protein ratios in common carp. *Fisheries Science* 61, 977-980.
- Silva, J.M.G., Espe, M., Conceição, L.E.C., Dias, J., Valente, L.M.P., 2009. Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) grow equally well on diets devoid of fish meal provided the dietary amino acids are balanced. *Aquaculture* 296, 309-317.
- Watanabe, T., 2002. Strategies for further development of aquatic feeds. *Fisheries Science* 68, 242-252.

Documentazione fotografica

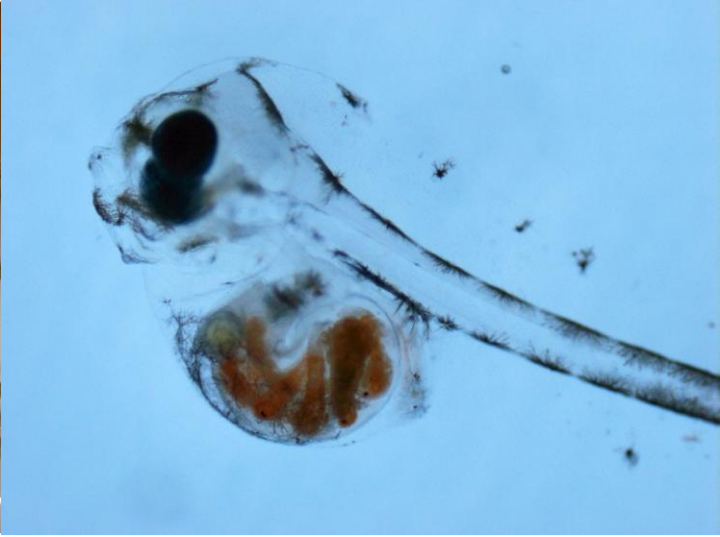
Attività di gestione e campionamento di esemplari riproduttori di sogliola comune (*Solea solea*). (Cap. II)



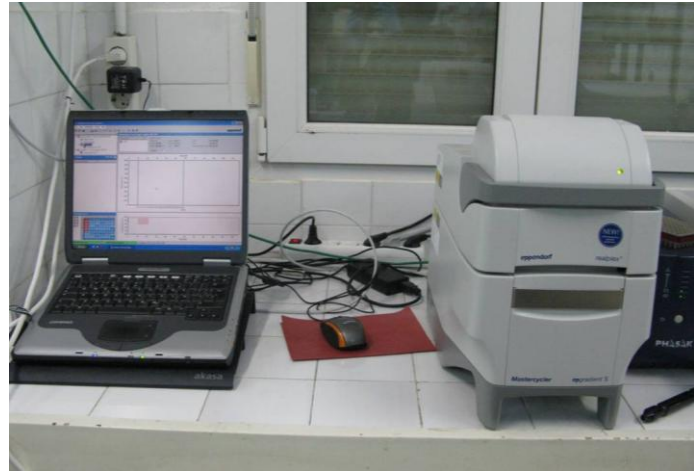
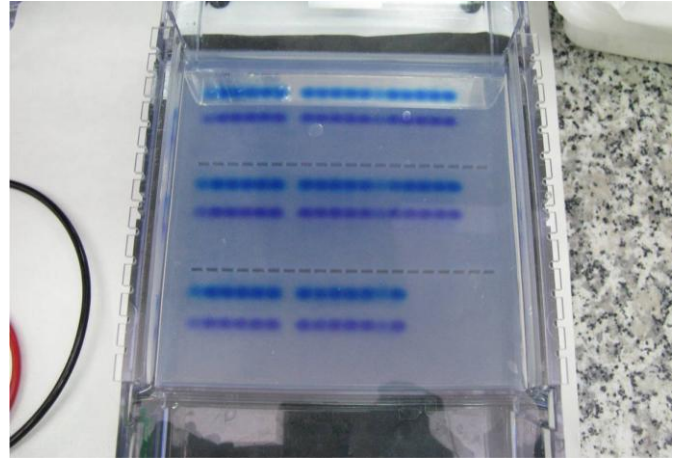
Gestione delle uova di sogliola comune (Cap. III)



Prove con larve e giovanili di sogliola comune (Cap. IV-VI)



Attività e strumentazione di laboratorio (Cap. V)



Publicazioni e partecipazioni a convegni

1. Bonaldo, A., Parma, L., Badiani, A., Serratore, P., Gatta, P. P. (2011). Very early weaning of common sole (*Solea solea* L.) larvae by means of different feeding regimes and three commercial microdiets: Influence on performances, metamorphosis development and tank hygiene. *Aquaculture* vol. 321, pp. 237-234
2. Gatta, P. P., Parma, L., Guarniero, I., Mandrioli, L., Sirri, R., Fontanillas, R., Bonaldo, A. (2011). Growth, feed utilization and liver histology of juvenile common sole (*Solea solea* L.) fed isoenergetic diets with increasing protein levels. *Aquaculture research*, vol. 42, pp. 313-321
3. Parma, L., Gatta, P.P., Badiani, A., Serratore, A., Mariani, L., Bonaldo, A. (2011) Evaluation of very early weaning of common sole (*Solea solea* L.) using commercial diets: implications on performances, larval quality and tank hygiene. Oral presentation at XIX Congress of Animal Science and Production Association A.S.P.A, Cremona, Italy, June 7-10, 2011
4. Guarniero, I., Parma, L., Rongai, F., Bonaldo, A., Trentini, M., Gatta, P. P. (2010). Parentage assignment of Common sole (*Solea solea* Q.) larvae inferred by microsatellites: preliminary data. *Aquaculture Europe 2010*, Porto, Portugal, October 5-8, 2010. Conference Proceedings, p. 376
5. L. Parma, A. Bonaldo, I. Guarniero, L. Mariani, P.P. Gatta. (2009). Studio di adattamento e prestazioni riproduttive di un lotto selvatico di sogliola comune (*Solea solea* L.) proveniente dall'Alto Adriatico. Presentazione orale. Atti di Convegno "Il Mediterraneo: aspetti emergenti e risposte dalle scienze del mare". Convegno organizzato dal CRISM Il Mediterraneo: aspetti emergenti e risposte dalle scienze del mare. Cesenatico (FC) 8-10 luglio 2009. (pp. 22 - 23).
6. I. Guarniero, F. Rongai, A. Bonaldo, L. Parma, P.P. Gatta, M. Trentini (2009). L'acquacoltura a supporto della pesca: Studio di fattibilità genetica su uno stock allevato di *Solea vulgaris* destinato al ripopolamento ittico. Atti di Convegno "Il Mediterraneo: aspetti emergenti e risposte dalle scienze del mare". Convegno organizzato dal CRISM Il Mediterraneo: aspetti emergenti e risposte dalle scienze del mare. Cesenatico (FC) Italy, 8-10 luglio 2009, (pp.11-13).

Partecipazione al V Workshop on the Cultivation of Soles, 5-7 Aprile 2011, Faro, Portogallo

Partecipazione al convegno: Aquaculture Europe 2011, Rodi, Grecia, 18-21 ottobre 2011

Partecipazione al convegno: Aquaculture Europe 2010, Porto, Portugal, October 5-8, 2010

Partecipazione al convegno: Acquacoltura Med 2009, Mediterranean Expo-Conference on sustainable Aquaculture & Seafood; Verona (Italy), October 22-23, 2009