



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Dipartimento Scienze Della Vita E Dell'Ambiente

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina

EFFETTI DI INGREDIENTI INNOVATIVI E SOSTENIBILI
SULLA RIPRODUZIONE DI ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

EFFECTS OF INNOVATIVE AND SUSTAINABLE INGREDIENTS
ON THE REPRODUCTION OF ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*)

Tesi di Laurea Magistrale di:

Angrilli Anna

Relatore:

Chiar.mo Prof. Olivotto Ike

Correlatore:

Dott. Randazzo Basilio

Sessione autunnale

Anno Accademico 2018-2019

Indice

1. Introduzione	4
1.1 Nuovi ingredienti alimentari in acquacoltura	7
1.2 Dieta a base di insetti: potenziale	15
1.3 Influenza della dieta sulla crescita	25
1.4 Riproduzione e alimentazione	27
1.5 Ciclo riproduttivo di zebrafish	30
1.5.1 Asse Ipotalamo-Ipofisi-Gonade	33
1.5.2 Stadi di sviluppo ovocitario	35
1.5.3 Vitellogenesi	38
2. Scopo della tesi	46
3. Materiali e Metodi	47
3.1 Modello sperimentale	47
3.1.1 Zebrafish	47
3.1.2 Black soldier fly	49
3.2 Aspetti etici	52
3.3 Formulazione delle diete	53
3.4 Pesci	55
3.5 Disegno sperimentale	56
3.6 Programma di alimentazione	57
3.7 Biometria	58
3.8 Estrazione dei lipidi e analisi degli acidi grassi	59
3.9 Raccolta delle uova	60
3.10 Istologia e analisi degli ovari	61
3.11 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier	62
3.12 Analisi molecolari	65
3.13 Analisi statistica	67
4. Risultati	68
4.1 Biometria	68
4.2 Contenuto e composizione di acidi grassi	68
4.3 Conteggio delle uova	72

4.4	Contenuto e composizione degli acidi grassi delle uova ovulate	73
4.5	Istologia e analisi degli ovari	75
4.6	Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier	76
4.7	Real-Time PCR	78
5.	Discussione	80
6.	Conclusioni	87
7.	Bibliografia	88

1. INTRODUZIONE

L'ONU stima che la popolazione mondiale raggiungerà i nove miliardi nel 2040, con una crescita del 30% della popolazione attuale. Di conseguenza, la richiesta di proteine animali è in costante e progressivo aumento (UN, 2019). Il consumo umano attuale di pesce è stimato in circa 20 Kg pro capite e approssimativamente la metà deriva dall'acquacoltura (FAO, 2016). Nel 2014 il 50% dei prodotti di origine acquatica consumati dalla popolazione mondiale proveniva dall'allevamento. Negli ultimi decenni le produzioni di pesca sono progressivamente aumentate, con una crescita dei prodotti d'acquacoltura impressionante, che è passata dal 13,4% nel 1990, al 25,7% nel 2000 e al 47 % nel 2012, su un totale di 189 milioni di tonnellate di prodotti acquatici nel mondo (FAO, 2018) (Fig. 1).

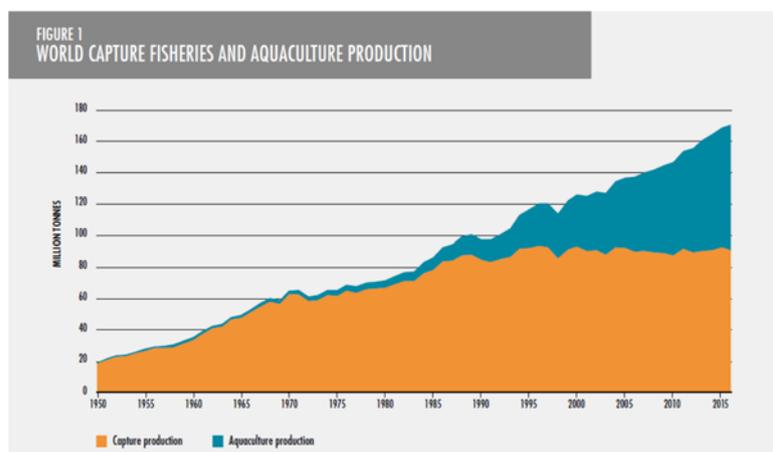


Fig. 1: Produzione mondiale della pesca e dell'acquacoltura

Per soddisfare la crescente domanda di pesce da parte della popolazione in continua espansione, è divenuto imperativo incrementare l'efficienza e la

sostenibilità dell'acquacoltura (FAO, 2018). La capacità dell'acquacoltura e della pesca di fornire cibo per la popolazione futura dipenderà, in parte, dalla gestione e dalla sostenibilità della pesca e dalla capacità di ridurre l'impatto ambientale dell'acquacoltura (FAO, 2016). L'alimentazione degli organismi acquatici allevati ha subito un'evoluzione negli ultimi cinquant'anni che ha notevolmente contribuito ad aumentare la produttività dell'acquacoltura a livello mondiale.

Si è partiti molti decenni fa con l'utilizzo di alimenti crudi e sottoprodotti dell'industria di trasformazione; attualmente si fa largo impiego, per la formulazione dei mangimi, della farina e dell'olio di pesce, dato il loro profilo nutrizionale completo, in grado di soddisfare le richieste alimentari delle specie allevate (Gomez, 2019). Le farine e oli di pesce derivano per lo più dalla lavorazione di piccoli pesci pelagici pescati e non destinati al consumo diretto da parte dell'uomo. Solo una parte marginale delle farine e oli di pesce utilizzati nella formulazione dei mangimi, infatti, deriva dalla lavorazione degli scarti del pesce destinato al consumo umano. La FAO ha stimato che nel 2009 la pesca ha fornito circa 90 milioni di tonnellate di prodotto, di cui circa 20 milioni di tonnellate sono state utilizzate per la produzione di farine e oli di pesce. La risorsa ittica da cui si ricavano queste materie prime è sottoposta quindi a una forte pressione di pesca e gli stock ittici naturali risultano in calo e sovrasfuttati

a livello mondiale, con la conseguenza che il prezzo di queste materie prime è in costante aumento (FAO, 2009).

In parallelo, è progressivamente cresciuta l'attenzione e la sensibilità nei confronti delle tematiche di sostenibilità ambientale, nel tentativo di ridurre al minimo la pressione della pesca destinata all'acquacoltura. La ricerca scientifica, di conseguenza, si è indirizzata verso l'individuazione e la scelta di ingredienti alternativi e più sostenibili nella formulazione della dieta per i pesci allevati.

1.1 Nuovi ingredienti alimentari in acquacoltura

Negli ultimi anni sono stati raggiunti nuovi interessanti progressi nella progressiva sostituzione di farine e oli di pesce nella mangimistica con diverse tipologie di ingredienti. I primi tentativi di sostituzione parziale o totale dei mangimi a base di oli e di farina di pesce sono stati basati sull'impiego di prodotti di origine vegetale, in particolare la soia (Smith, 1977). A favore vi è l'elevata digeribilità e l'alto contenuto proteico. Nello stesso tempo va considerato che l'utilizzo ai fini dell'alimentazione dei pesci d'allevamento degli oli e farine vegetali compete con l'utilizzo umano di queste stesse risorse (O' Keefe, 2003). Inoltre, i mangimi di origine vegetale presentano alcune caratteristiche svantaggiose rispetto alla farina di pesce, come maggiori livelli di fibre, carboidrati non solubili, profilo amminoacidico squilibrato e presenza di fattori antinutrizionali, che in maniera diretta o indiretta interferiscono con l'assimilazione e la digestione del cibo, con conseguenze sulla crescita e sulla salute dei pesci (Gatlin et al., 2007). Un'altra limitazione legata ai composti di origine vegetale risiede nel loro profilo lipidico, caratterizzato dalla mancanza di acidi grassi altamente insaturi (HUFA), come ad esempio gli acidi eicosapentaenoico (EPA; 20: 5n-3) e docosaesaenoico (DHA; 22: 6n-3) (Merrifield et al, 2011).

L'assenza o la riduzione di questi acidi grassi essenziali può avere un impatto significativo sul valore nutrizionale del prodotto d'allevamento (Mulligan & Trushenski, 2013). In relazione al contenuto proteico, invece, i mangimi di origine vegetale ne hanno un buon contenuto, in grado di coprire il 40-45% del contenuto proteico dei mangimi tradizionali, anche se presentano carenze di amminoacidi solforati quali la metionina (O'Keefe, 2003).

Soia. Il contenuto relativamente elevato di proteine e il buon profilo di amminoacidi della soia, hanno reso la farina di soia un ingrediente “appetibile” per l'alimentazione dei pesci d'allevamento. La farina di soia è ottenuta come sottoprodotto dell'estrazione di olio di soia. Le farine si ottengono mediante processi di estrazione con trattamento termico (torrefazione a flusso d'aria calda) dei semi di soia o con solventi dei grassi, generalmente l'esano. Le farine ottenute con i metodi di trattamento termico possono essere efficacemente utilizzate nelle diete formulate per un'ampia varietà di specie ittiche (Lim e Akiyama, 1989), quali la trota (Smith, 1977), il pesce gatto (Saad, 1979) e la tilapia (Tacon et al, 1983). Il contenuto proteico della soia è elevato, con un profilo amminoacidico generalmente superiore alle altre proteine vegetali (Tab.1).

Contenuto in amminoacidi espresso come % di proteine						
	Menhaden	Soia	Arachidi	Semi di cotone	Colza	Mais
Arginina	6,1	7,4	9,5	10,2	5,6	3,4
Istidina	2,4	2,5	2,0	2,7	2,7	2,3
Isoleucina	4,7	5,0	3,7	3,7	3,7	4,2
Leucina	7,3	7,5	5,6	5,7	6,8	16,8
Lisina	7,7	6,4	3,7	4,1	5,4	1,7
Metionina	2,9	1,4	0,9	1,4	1,9	2,9
Cistina	0,9	1,7	1,5	1,9	0,8	1,7
Fenilalanina	4,0	4,9	4,2	5,9	3,8	6,6
Tirosina	3,2	3,4	3,2	2,0	2,2	5,3
Treonina	4,1	3,9	2,4	3,4	4,2	3,6
Triptofano	1,1	1,4	1,0	1,4	1,2	0,5
Valina	5,3	5,1	3,9	4,6	4,8	5,1

Tab. 1: Confronto dei contenuti in amminoacidi essenziali dei più comuni vegetali utilizzati nella produzione di mangimi con quello del Menhaden (piccolo pelagico da cui si ricava mangime tradizionale).

Tra le criticità riguardanti i mangimi derivati dalla soia c'è il loro contenuto in fattori anti-nutrizionali, che possono influenzare negativamente la crescita e la salute dei pesci. Questi includono inibitori della proteasi, emoagglutinine, goitrogeni (antitiroidei) e fitati (Liener, 1980). Alcuni di questi possono essere inattivati o eliminati mediante trattamento termico. L'unico fattore anti-nutrizionale termostabile di significato pratico nella nutrizione dei pesci è l'inibitore della tripsina. Se una quantità elevata di questo enzima è presente nel mangime di soia, può legare la tripsina inibendo la digestione delle proteine, ma il trattamento termico inattiva efficacemente questo enzima. In acquacoltura, sono ritenuti accettabili 1-3 mg di attività inibitrice della tripsina

per grammo di mangime (Akiyama, 1988). I carboidrati della soia includono gli oligosaccaridi saccarosio, raffiniosio e stachiosio. Mentre il saccarosio è digerito dai pesci, gli altri due oligosaccaridi non lo sono. La loro presenza nel contenuto intestinale aumenta la pressione osmotica e interferisce con l'assorbimento di acqua. Questi oligosaccaridi indigeribili non presentano alcun problema nei pesci d'acqua dolce, che espellono costantemente l'acqua per mantenere la pressione osmotica dei loro fluidi corporei in ambiente iposmotico come l'acqua dolce. Nelle specie marine, invece, può rappresentare una fonte di stress della regolazione osmotica. Refsstie et al. (1999) hanno evidenziato che i polisaccaridi non amilacei nell'alimentazione del salmone dell'atlantico (*Salmo salar*) hanno indotto una ridotta digeribilità di grassi e proteine data la maggiore viscosità del contenuto intestinale, limitando la diffusione e l'azione degli enzimi digestivi. Questa osservazione non è mai stata riportata negli studi con pesci d'acqua dolce.

Cotone. I semi di cotone sono la seconda fonte più abbondante di proteine vegetali. Come per la soia, questo seme oleoso viene lavorato in diversi modi per produrre olio di semi di cotone e una varietà di farine. Nelle zone ad alta produzione di cotone, le farine di cotone sono meno costose rispetto a quelle di soia. Rispetto a quella della soia, la farina di cotone è molto ricca di arginina, ma è gravemente carente di lisina e leggermente carente di isoleucina e

amminoacidi solforati, quali metionina e cistina (Tab. 1). Nell'alimentazione del pesce gatto, l'apporto effettivo di amminoacidi essenziali delle farine di cotone è stato inferiore rispetto a quelle di soia (Wilson et al, 1981). L'uso di prodotti a base di farina di semi di cotone nei mangimi per le specie di acquacoltura è stato limitato per la presenza di componenti anti-nutrizionali, quale il gossipolo, un'aldeide polifenolica, tossico per i pesci.

Microalghe. L'uso delle micro-alghe in acquacoltura è pratica comune da molti anni. Il loro ruolo in questo settore è importante soprattutto nelle prime fasi di sviluppo dei pesci e degli invertebrati allevati. Le micro-alghe sono usate come alimento diretto per tutte le fasi del ciclo vitale dei molluschi bivalvi e per le primissime fasi di sviluppo larvale dei pesci e dei crostacei (Brown, 2002). Esse, inoltre, sono spesso inserite nelle vasche di allevamento degli avannotti in una procedura che prende il nome di "allevamento in acqua verde" (Shields et al., 2012). La loro presenza in vasca, oltre ad alimentare i piccoli invertebrati, a loro volta preda degli avannotti, fa sì che si crei un filtro naturale per la radiazione luminosa e permette di mantenere elevate concentrazioni di ossigeno. Il loro principale impiego in acquacoltura consiste nell'utilizzo come alimento per rotiferi (*Brachionus spp.*) e piccoli crostacei (*Artemia salina*) comunemente usati come mangimi vivi per gli avannotti (Borowitzka, 1997). I rotiferi, in particolare, hanno la caratteristica di modificare il proprio profilo

lipidico in base a ciò di cui si nutrono. Le micro-alghe utilizzate con questo scopo condividono una serie di caratteristiche chiave: hanno dimensioni comprese tra 10 e 100 μm , hanno tassi di crescita elevati, non producono tossine, sopportano ampie variazioni di temperatura e radiazione luminosa e possiedono un buon profilo nutrizionale. Le principali micro-alghe con queste caratteristiche sono ritrovabili nei generi *Nannochloropsis*, *Pavlova*, *Isochrysis*, *Tetraselmis* e *Rhodomonas* (Brown, 2002).

Queste alghe possono essere utilizzate come fonte proteica alternativa ma soprattutto come fonte di PUFAs. Effetti positivi della somministrazione di micro- e macro-alghe e loro derivati sono noti da anni. L'inclusione al 50% di micro-alghe come *Chlorella* e *Scenedesmus* ha effetti positivi sulla crescita e sull'assimilazione delle proteine (Badwy et al., 2008).

Macro-alghe. La possibilità di utilizzare le macro-alghe come additivo o sostituito nelle diete tradizionali è stata meno analizzata. Il loro valore nutrizionale e il loro contenuto in PUFAs è comunque inferiore rispetto a quello osservabile nelle micro-alghe e nei mangimi commerciali.

Nonostante ciò, l'aggiunta di *Ulva clathrata* nei mangimi utilizzati per il gambero *Litopenaeus vannamei* ha comportato un incremento nei tassi di crescita, dimostrando la capacità di quest'alga di poter agire come fattore nutrizionale o comunque di incrementare le capacità di assimilazione negli

organismi che di essa si nutrono (Cruz-Suàrez et al., 2010). Altri effetti positivi dell'aggiunta di *Ulva clathrata* alle diete tradizionali, quali l'incremento della resistenza allo stress e all'insorgenza di malattie e il miglioramento dell'assimilazione proteica sono stati riscontrati anche negli studi condotti da Fleurence et al. (2012).

I principali fattori che limitano l'utilizzo di queste risorse nell'ambito della mangimistica risiedono nei costi di produzione, almeno per quanto riguarda le micro-alghe. Gli studi di Borowitzka (1997) hanno evidenziato che i costi per il mantenimento delle colture micro-algali possono arrivare a rappresentare il 30-40% delle spese sostenute dalle avannotterie. Un secondo fattore limitante, relativo sia alle micro che alle macro-alghe, risiede nella scarsa digeribilità. L'utilizzo di micro-alghe e macro-alghe offre proteine di buona qualità ma comunque non come le proteine animali (Rizwan et al., 2018). Le proteine animali sono ricche della maggior parte degli amminoacidi essenziali e comprendono grandi quantità di proteine idrosolubili, che presentano il vantaggio di essere altamente digeribili (Tacon et al., 2015). In questo contesto, dal giugno 2013, la farina di pesce può essere parzialmente sostituita da una varietà di miscele di proteine animali non ruminanti, tipo farine di sottoprodotti del pollame (Rimoldi et al., 2018).

In un recente studio, Rimoldi et al. (2018) hanno valutato l'impatto della parziale sostituzione della farina di pesce tradizionale con una miscela di sottoprodotti di origine animale e proteine di origine vegetale sul microbiota intestinale della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), ottenendo un buon risultato in termini di rendimento di crescita e assenza di variazioni significative nella ricchezza del microbiota intestinale.

1.2 Dieta a base di insetti: potenziale

Tra le varie alternative proposte, gli insetti rappresentano un candidato molto promettente nella sostituzione di farina ed olio di pesce. In primo luogo, rispetto agli altri ingredienti proposti, hanno il vantaggio di avere una tipologia di allevamento sostenibile e la capacità di crescere su substrati organici di scarto, convertendoli in biomassa di buona qualità. Inoltre, il substrato di scarto potrebbe essere ricavato da rifiuti organici di aziende terrestri aumentando la sostenibilità dell'utilizzo degli insetti in un'ottica di economia circolare. Gli insetti sono parte della dieta naturale di molte specie di pesci (Van Huis, 2013; Tran et al., 2015). Larve di insetti (*Hermetia illucens* e *Tenebrio molitor*) sono state impiegate con successo come ingredienti alimentari dell'alimentazione del branzino (*Dicentrarchus Labrax*) (Magalhaes et al., 2017), dell'occhione (*Pagellus Bogarevo*) (Iaconisi et al., 2017), della carpa (*Cyprinus carpio* varietà Jan) (Li et al., 2017), della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (Borgogno et al., 2017), e del salmone dell'atlantico (*Salmo salar*) (Lock et al., 2016). Nell'ultimo decennio si è riscontrato un interesse crescente nell'utilizzo di insetti come fonte proteica nella produzione di cibo per animali, soprattutto per l'alta qualità e quantità di proteine di alcune specie di insetto (Sanchez-Muros et al., 2014). Il quantitativo proteico riscontrabile negli insetti

oscilla tra il 42% e il 63%, ben paragonabile a quello presente nella soia e poco inferiore a quello che si ritrova nelle farine e oli di pesce (Tran et al., 2015).

Gli insetti impiegati a tale scopo hanno crescita rapida, facile riproduzione e soprattutto non richiedono l'impiego di terreni coltivabili (Barroso et al., 2014; Sanchez-Muros et al., 2014; Henry et al., 2015).

In Occidente le tre specie di insetto più promettenti sono la *Musca domestica*, il *Tenebrio molitor* e l'*Hermetia illucens* (Veldkamp et al., 2012; Tran, 2015), grazie alla loro capacità di crescere su rifiuti organici con grande efficienza di bio-conversione (Veldkamp et al., 2012; Cickova et al., 2015; Nguyen et al., 2015).

Un potenziale problema correlato all'utilizzo degli insetti è il rischio che essi siano potenziali vettori di patogeni quali batteri, miceti, virus e protozoi. In effetti tali patogeni sono stati isolati dagli insetti; tuttavia, con adeguate misure igieniche nella catena produttiva, inerenti l'impiego di adeguati substrati di accrescimento e di efficaci tecniche di lavorazione, il rischio di trasmissione all'uomo è minimizzato (EFSA, 2016). Riguardo ai rischi di trasmissione di patogeni, gli insetti adulti di Black Soldier Fly (BSF) (*Hermetia illucens*) non avvicinano gli esseri umani, non mordono né pungono e non fungono da veicolo per alcuna malattia. Un'altra importante caratteristica di BSF è rappresentata dal suo coinvolgimento nel controllo dei parassiti della *Musca*

domestica, come dimostrano alcuni lavori nei quali la quantità di larve di mosca presente sul letame viene azzerata dopo lo sviluppo delle larve di BSF (Sheppard, 1983).

L'utilizzo degli insetti come ingrediente sostitutivo è però ancora fortemente limitato dal contenuto di chitina, presente nel loro esoscheletro, e dal profilo di acidi grassi sbilanciato verso una maggiore componente di saturi rispetto ai polinsaturi.

Chitina: I pesci hanno una capacità di digestione della chitina limitata ed è stato dimostrato che le diete che ne sono ricche possono avere un impatto negativo sull'assunzione di cibo, digeribilità e assorbimento dei nutrienti e quindi sulla performance di crescita (Kroeckel et al., 2012). Gli insetti hanno un esoscheletro composto principalmente da chitina, un polisaccaride costituito da più unità di N-acetilglucosammina (N-acetil-D-glucos-2-ammina) legate tra di loro con un legame di tipo β -1,4. I polimeri di chitina tendono a formare microfibrille caratterizzate da elevata idrofobicità, insolubilità in acqua e in solventi organici, e particolare resistenza alla degradazione enzimatica (Gutowska et al., 2004).

Gli enzimi in grado di degradare la chitina includono le chitinasi e la p-N-acetilglucosaminidasi che catalizzano l'idrolisi del legame glicosidico β -1,4. Questi enzimi si trovano anche in organismi che non contengono la chitina ma

utilizzano la chitina come fonte di nutrienti (Merzendorfer & Zimoch, 2003). Le chitinasi sono presenti anche nel tubo digerente di molte specie ittiche, indipendentemente dalle abitudini alimentari. Ad esempio, l'attività chitinasica è stata rilevata nel merluzzo (*Gadus morhua*) quando l'animale si nutre di crostacei, ma tale attività potrebbe essere attribuita anche ad alte concentrazioni di chitinasi nella preda (Krogdahl et al., 2005). Tuttavia, sembra che vi sia la capacità di alcuni pesci di produrre chitinasi intestinali ed endogene (Danulat, 1986).

Ikeda et al. (2017) hanno anche descritto l'espressione dei geni della chitinasi e l'attività della chitinasi in organi di pesce che non sono coinvolti nella digestione, suggerendo che le chitinasi svolgono ruoli multipli nei vertebrati. Koch et al. (2014) hanno identificato sei chitinasi e proteine simil-chitinasiche di zebrafish chiamate *CHIA. 1-6*. Gli autori hanno anche esplorato il modello di espressione di ciascuno dei sei geni *CHIA* di zebrafish, dallo stato di zigote al 5° giorno di stato larvale. Le prime chiare differenze nel pattern di espressione si sono riscontrate a 4-5 giorni dalla fecondazione. I geni *CHIA.1*, *CHIA.2* e *CHIA.3* erano quasi esclusivamente espressi dal rivestimento dello stomaco, mentre *CHIA.4*, *CHIA.5* e *CHIA.6* mostravano debole espressione gastrica e elevata espressione epatica.

Tuttavia la chitina se fornita a basse concentrazioni può avere un'azione immunostimolante. Esteban et al. (2001), infatti, hanno riportato che bassi livelli di chitina nella dieta migliorano l'attività immunitaria dell'orata (*Sparus aurata*).

Nonostante la presenza di chitinasi endogene sia stata riscontrata sia in pesci di mare che di acqua dolce, onnivori e carnivori, la chitina rimane un componente non digerito delle diete a base di insetti (Rust, 2002). La sua bassa digeribilità sembra associata alla sua inclusione in una matrice a base proteica, lipidica e di altre molecole componenti la cuticola degli insetti. La presenza di questa matrice potrebbe ridurre la penetrazione delle chitinasi e di altri enzimi, riducendo la digestione della chitina e anche di altre proteine e lipidi.

Composizione in acidi grassi: I lipidi sono fondamentali nell'alimentazione dei pesci teleostei. Sono infatti la principale fonte energetica per il metabolismo cellulare nonché fonti di acidi grassi insaturi regolatori della fluidità e funzionalità delle membrane cellulari. Favoriscono inoltre l'assorbimento intestinale di vitamine liposolubili (in particolare A, D e K) e sono precursori di una famiglia importante di ormoni, quella delle prostaglandine, trombossani e leucotrieni (Asturiano et al., 2000; Sorbera et al., 2001). I lipidi, inoltre, una volta assorbiti e metabolizzati, influenzano la quantità di grassi depositati nel corpo e la loro composizione in acidi grassi. Ne risultano quindi influenzate le

caratteristiche organolettiche del pesce intero o delle sue porzioni propriamente edibili quali il gusto, l'aroma, la consistenza, la lavorabilità e la conservabilità dei filetti (Henry et al., 2015). Gli insetti sono carenti di acidi grassi omega-3 eicosapentaenoico (EPA) e docosaesaenoico (DHA) e ciò può rappresentare una limitazione al loro impiego nell'alimentazione dei pesci.

L'acido α -linolenico (ALA; 18:3n-3) e l'acido linoleico (LA; 18:2n-6) sono definiti acidi grassi essenziali (EFA) nelle diete dei vertebrati a causa della loro incapacità di produrli. Questi EFA possono essere ulteriormente desaturati ed elongati per formare acidi grassi altamente insaturi (HUFA) fondamentali con C20 e C22, come l'acido arachidonico (AA; 20:4n-6), l'acido eicosapentaenoico (EPA; 20:5n-3) e l'acido docosaesaenoico (DHA; 22:6n-3).

I tessuti sia dei pesci d'acqua dolce che dei pesci marini sono generalmente molto ricchi di acidi grassi C20 e C22, in particolare EPA e DHA. E' risaputo che la via della biosintesi di EPA e DHA da ALA è presente nei pesci d'acqua dolce e allo stesso tempo vi è la prova che questa conversione non si verifica nei pesci marini (Vargas et al., 2018). Questa differenza riflette il fatto che EPA e DHA sono molto abbondanti nell'ambiente marino e vengono trasmessi intatti dal fitoplancton ai pesci attraverso lo zooplancton. In questo modo i pesci marini non hanno avuto alcuna pressione evolutiva per conservare la capacità di produrre HUFA. Al contrario, la preda naturale di molti pesci d'acqua dolce,

in particolare le loro prede invertebrate, non è ricca di DHA ma ricca di acido linoleico e acido α -linolenico. Tuttavia, esperimenti in vivo su rombo (*Psetta maxima*) e orata (*Sparus aurata*) hanno dedotto che l'apparente incapacità dei pesci marini di biosintetizzare gli HUFA non è dovuta alla completa assenza dei geni richiesti, ma al fatto che uno o più di questi geni non sembrano sufficientemente espressi (Tocher, 2003). Secondo questo assunto Lee et al. (2003) hanno dimostrato che l'alimentazione dei giovanili di passera stellata (*Platichthys stellatus*) con diete a diverso contenuto lipidico provocava una crescita ridotta nei pesci alimentati con diete carenti di n-3 HUFA. Inoltre, le diete ricche di n-3 HUFA hanno evidenziato un aumento di questi acidi grassi nei pesci, a differenza di quanto avviene nei pesci alimentati con diete carenti, suggerendo che ha poca o nessuna capacità di sintetizzare questi acidi grassi. In uno studio sulla carpa Jian (*Cyprinus carpio* var. Jian) è stata studiata la possibilità di sostituire parzialmente o totalmente la farina di pesce con farina di larve di mosca soldato nera (BSF). Sebbene la dieta con *Hermetia illucens* non abbia influenzato negativamente né la crescita del pesce né l'utilizzo dei mangimi, è stato rilevato un grave impoverimento di n-3 HUFA in tutto il corpo del pesce. Il cDNA di elongasi di acidi grassi (Elovl; allungamento di acidi grassi a catena molto lunga) è stato clonato da diverse specie di acqua dolce come zebrafish, tilapia e salmonidi oltre che da specie marine di merluzzo,

rombo e orata (Glencross, 2009; Tocher, 2010). In particolare il cDNA di Elov15 e Elov12 isolato da zebrafish ha mostrato un'elevata somiglianza con Elov15 ed Elov12 dei mammiferi, con il primo principalmente coinvolto nell'allungamento di C18 e C20 PUFA e il secondo principalmente attivo verso C20 e 22 PUFA (Tocher, 2010). Analogamente, i cDNA delle desaturasi di acidi grassi (Fad) sono stati isolati da trota iridea e da zebrafish (Glencross, 2009; Tocher, 2010).

Tra le diverse specie di insetti che sono state allevate e studiate per la loro possibile applicazione in acquacoltura, *Hermetia illucens* rappresenta una delle più interessanti (St-Hilaire et al., 2007). L'allevamento di BSF è stato proposto dal 1990 come un efficiente modo per convertire i rifiuti organici in biomassa ricca di proteine e di grassi adatta a vari scopi, tra cui l'alimentazione animale (Diener et al., 2011). Belghit et al. (2018) hanno valutato l'effetto della farina di insetti (IM) e dell'olio di insetti (IO) sulla performance di crescita, composizione corporea e digeribilità del salmone atlantico allevato in acqua dolce. L'IM e l'IO sono stati prodotti da larve di BSF. Gli autori non hanno riscontrato differenze significative nelle performance di crescita. L'inclusione delle diete a base di IM ha aumentato significativamente sia l'indice epatosomatico che quello somatico viscerale del salmone atlantico. L'attività proteinasica intestinale non è stata influenzata dall'inclusione delle larve di BSF

nella dieta, mentre l'attività della leucina aminopeptidasi è stata inferiore nei pesci nutriti con farina di insetto rispetto al gruppo di controllo. Il contenuto corporeo proteico, lipidico e amminoacidico non è stato influenzato dalla fonte proteica o lipidica.

In sintesi, questo studio dimostra che la farina di insetto e l'olio delle larve di BSF hanno un grande potenziale come fonte di nutrienti per il salmone atlantico. Vargas et al. (2018) hanno valutato, per la prima volta, la possibile applicazione di una dieta integralmente basata su BSF nell'allevamento larvale di zebrafish.

I risultati in termini biometrici, di composizione in acidi grassi, di espressione di geni coinvolti nella crescita, nella risposta allo stress, nel metabolismo lipidico, nell'attività chitinolitica, nell'infiammazione intestinale e nella composizione macromolecolare del fegato suggeriscono una possibile applicazione di una dieta derivata da insetti per l'allevamento larvale di zebrafish. Tuttavia, gli autori suggeriscono la necessità di ulteriori studi per meglio comprendere le potenzialità di questa specie di insetto nell'allevamento dei pesci. Proseguendo in questa direzione, Zarantoniello et al. (2019) hanno recentemente dimostrato che, dopo un periodo di sei mesi di alimentazione a base di prepupe di BSF al 50 %, gli zebrafish hanno mostrato una maggiore espressione dei geni di elongasi e desaturasi (*elovl2*, *elovl5* e *fads2*) rispetto al

gruppo di controllo nutrito con farina di pesce, e le analisi gascromatografiche hanno rivelato la presenza di HUFA, sottolineando la capacità dello zebrafish di promuovere conversioni lipidiche.

In sintesi, i risultati descritti mostrano che l'utilizzo degli insetti nell'acquacoltura ha potenzialità di rilievo, soprattutto per la componente proteica (Sanchez-Muros et al., 2014). Inoltre la sostenibilità di questa risorsa è strategica, in quanto non competitiva con la pesca o l'agricoltura, ma rappresenta una via ecosostenibile per il riutilizzo della materia organica definita come scarto o rifiuto (Gomez et al., 2019). Tuttavia, le quantità ottimali di farina di BSF includibili nella dieta sono ancora da definire.

1.3 Influenza della dieta sulla crescita

La crescita nei vertebrati è sotto controllo genetico e modulato da organi endocrini. A partire dall'ipotalamo, viene prodotta la somatostatina (GHRH) che stimola la ghiandola pituitaria a produrre l'ormone della crescita (GH). I recettori GH si trovano principalmente nel fegato dove stimolano la sintesi e il rilascio del fattore di crescita insulino-simile 1 (IGF-1) che è coinvolto nella crescita del corpo ma anche in diversi processi cellulari (Moriyama, 2000). Solo nei pesci ossei è presente un altro IGF, chiamato IGF-2, anch'esso controllato da GH. IGF-2, come IGF-1, non è coinvolto solo nella crescita corporea ma anche in diversi schemi metabolici. Il suo mRNA è stato rilevato nel fegato e in numerosi altri organi (Reinecke et al., 2005). Il regime nutrizionale può regolare la crescita influenzando direttamente il sistema IGF. Gli esperimenti con il salmone coho (*Oncorhynchus kisutch*) hanno sottolineato una riduzione della lunghezza e della crescita del corpo dopo un periodo di inedia. I livelli epatici di IGF-1 mRNA erano inferiori ai livelli iniziali, ma dopo un periodo di rialimentazione i livelli furono ripristinati, dimostrando un effetto soppressivo della deprivazione alimentare sull'espressione di mRNA di IGF-1 (Duan & Plisetskaya, 1993). Nei giovani di orata (*Sparus aurata*) la sostituzione parziale o totale della farina di pesce con una miscela di fonti proteiche vegetali ha comportato una riduzione del peso corporeo finale e

dell'assunzione di mangime, in parallelo con la diminuzione dei livelli di mRNA IGF-1, che mostra cambiamenti regolati dall'alimentazione (Gomez-Requeni et al., 2004). Piccolo et al. (2014) hanno riscontrato una riduzione della crescita della *Sparus aurata* quando la farina di pesce era sostituita a metà con farina di larve di *Tenebrio molitor*. Invece, la sostituzione della farina di pesce fino al 40% con *Tenebrio molitor* non ha influenzato né la crescita né l'assunzione di cibo dei pesci gatto africani (*Crarias gariepinus*) (Ng et al., 2002).

Un'altra molecola che è coinvolta nella regolazione della crescita dei pesci è la miostatina, che è un componente della superfamiglia Trasforming Growth Factor- β (TGF- β). Il suo gene è stato clonato da diverse specie di pesci tra cui zebrafish ed è coinvolto nella inibizione della crescita dei muscoli scheletrici. Nello zebrafish, infatti, l'inibizione della funzione della miostatina ha determinato un aumento del numero di miofibre e iperplasia muscolare (Xu et al., 2003).

1.4 Riproduzione e alimentazione

L'energia ottenuta dal cibo è indispensabile per i pesci per una serie di eventi fisiologici come la crescita e la riproduzione (Mc Bride et al., 2015). Una alimentazione bilanciata ed equilibrata è quindi in grado di influenzare le performance riproduttive dei pesci.

Lazzarotto et al. (2015) hanno valutato le prestazioni riproduttive della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) dopo un ciclo completo di allevamento con una dieta totalmente priva di ingredienti marini e quindi di acidi grassi polinsaturi a catena lunga (LC-PUFA n-3). Due gruppi di femmine di trota iridea sono stati alimentati dalla prima alimentazione con dieta commerciale (C, ingredienti marini e vegetali) o con dieta 100% vegetale (V, miscela di proteine vegetali e oli vegetali). Sebbene la dieta V fosse priva di LC-PUFA n-3, quantità significative di EPA e DHA sono state trovate in fegato e uova, dimostrando la bioconversione efficace dell'acido linolenico e orientamento selettivo verso l'oogenesi. Si è osservato per la prima volta che la trota nutrita con dieta a base vegetale al 100% in un ciclo di allevamento di 3 anni è in grado di produrre uova vitali, sebbene più piccole. La sopravvivenza della prole delle femmine alimentate a V era inferiore (-22%) alla prima generazione, ma non alla seconda. Lo studio ha dimostrato che, oltre a poter crescere con una dieta a base vegetale, la trota iridea allevata interamente con una dieta del genere può

produrre con successo uova in cui gli LC-PUFA n-3 neo-sintetizzati sono accumulati, portando a una prole vitale. Da Silva Filipa et al. (2016) hanno studiato l'effetto della composizione della dieta e del trattamento ormonale sullo sviluppo riproduttivo dell'anguilla europea. E' stato evidenziato che con bassi livelli di PUFA non vi è alcuna differenza nell'effetto dei trattamenti ormonali sull'indice gonadosomatico (GSI). Inoltre, indipendentemente dal trattamento ormonale, la dieta con livelli più alti di PUFA comporta un corretto sviluppo degli ovociti. In conclusione, il livello di PUFA nella dieta favorisce la crescita degli ovociti più di quanto faccia il trattamento ormonale.

In sintesi, la qualità dell'alimentazione migliora notevolmente la qualità delle uova. Lo sviluppo gonadico e la fecondità sono influenzati da alcuni nutrienti dietetici essenziali, specialmente nei riproduttori continui con brevi periodi vitellogenicici. Pertanto, negli ultimi due decenni, è stata prestata maggiore attenzione al livello di diversi nutrienti nelle diete degli individui maturi (broodstock) (Izquierdo, 2001). La composizione lipidica della dieta dei broodstock è stata identificata come il principale fattore che determina il successo della riproduzione e la sopravvivenza della prole (Izquierdo, 2001). Alcune specie di pesci incorporano prontamente gli acidi grassi insaturi della dieta nelle uova, anche durante la stagione della deposizione delle uova (Izquierdo, 2001). Gli HUFA con 20 o più atomi di carbonio influenzano,

direttamente o attraverso i loro metaboliti, la maturazione dei pesci e la steroidogenesi (Moore, 1995). Newman et al. (2016) hanno riscontrato che il successo riproduttivo di zebrafish (*Danio rerio*) correla con la quantità di cibo, con minor produzione di uova da parte delle femmine malnutrite.

Karga et al. (2017) hanno invece valutato il ruolo dell'apporto proteico nella performance riproduttiva di zebrafish, rilevando che un apporto proteico di 400 g. kg⁻¹ danno tassi di fecondità e produzione di uova che vengono perse quando la quantità di proteine scende a 300 g. kg⁻¹. Proteine e lipidi a parte, anche l'apporto vitaminico è un fattore importante ai fini riproduttivi. La carenza di vitamina E influisce sulle prestazioni riproduttive, causando immaturità gonadica e un tasso inferiore di schiusa e di sopravvivenza della prole (Izquierdo & Fernandez-Palacios, 1997; Fernandez-Palacios et al., 1998). Inoltre l'aumento dei livelli dietetici di α -tocoferolo riduce la percentuale di uova anormali e aumenta la fecondità nello zebrafish (Merhad et al., 2012).

1.5 Ciclo riproduttivo di zebrafish (*Danio rerio*)

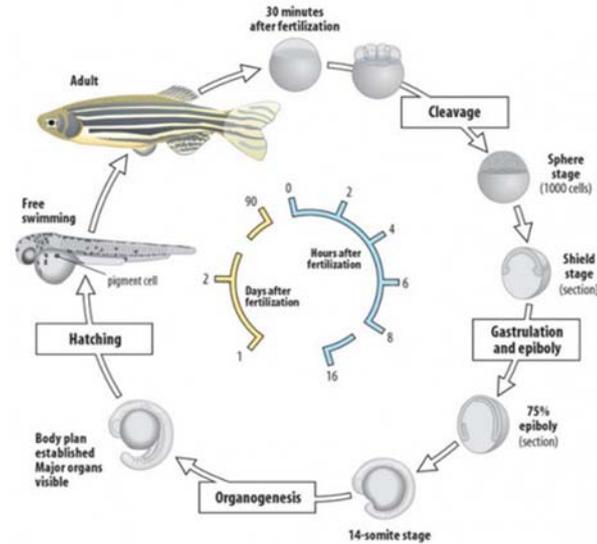


Fig. 2: Ciclo riproduttivo dello zebrafish

Zebrafish (*Danio rerio*) (Fig. 2) è un pesce d'acqua dolce appartenente alla famiglia dei Ciprinidi (Cyprinidae) e all'ordine Cipriniformi, originario dell'Asia meridionale.

In natura, zebrafish mostra una gamma di comportamenti sociali, ma in genere tende ad associarsi in gruppi che variano per dimensioni e attività in relazione al tipo di habitat (Suriyampola, 2016). In cattività, la strutturazione sociale e la territorialità sono comuni e dipendenti dalla densità. La riproduzione in natura è relativamente complessa e dipende dai cicli di luce e dai ritmi circadiani (Gerlach et al., 2006; Lawrence et al., 2012). Relativamente poco si sa sulla deposizione delle uova in ambiente naturale. Tuttavia, la riproduzione nelle strutture di ricerca è stata ragionevolmente ben caratterizzata (Spence et al.,

2006; Spence et al., 2007; Moretz et al., 2007; Castranova et al., 2011; Nasiadka et al., 2012; Kalueff et al., 2013). Il successo della deposizione delle uova dipende fortemente da fattori come la dieta e il comportamento sociale, e queste variabili possono essere manipolate per migliorare l'efficienza riproduttiva (Lawrence, 2007; Nasiadka et al., 2012). Ad esempio, il successo riproduttivo potrebbe essere massimizzato alloggiando pesci a densità più elevate (12 pesci/L) per ridurre gli effetti gerarchici.

L' alloggiamento di pesci a densità inferiore (6 pesci/L) potrebbe infatti intensificare la loro gerarchia sociale aumentando i livelli di cortisolo (Ramsay et al., 2006; Parker et al., 2012). I ricercatori sono stati in grado di raccogliere 10.000 embrioni in 10 minuti usando questo metodo (Dockser, 2012). Ciò che attira le femmine non è attualmente compreso. La presenza di piante, anche di plastica, apparentemente incoraggia anche la deposizione delle uova (Dockser, 2012).

Le femmine sono in grado di deporre le uova ad intervalli di due o tre giorni, deponendo centinaia di uova per volta. Dopo il rilascio, inizia lo sviluppo embrionale. Le uova fecondate diventano quasi immediatamente trasparenti, una caratteristica che rende *Danio rerio* un modello di ricerca molto utilizzato (Spence et al., 2008). La riproduzione nei pesci è un processo complesso che risente di numerosi fattori quali il comportamento, la scelta del partner, il

corteggiamento, sensoriali (derivanti da percezioni olfattive, visive o mediate dalla linea laterale), ambientali (fotoperiodo, temperatura e chimica dell'acqua) (Tsang et al., 2017). Altri fattori comprendono la disponibilità e la quantità di cibo, dato che l'atto riproduttivo comporta un importante dispendio energetico, soprattutto per le femmine che devono affrontare l'ovogenesi. Se è vero che l'ovogenesi segue uno schema pressoché costante nelle varie specie, la principale differenza è nel modo in cui gli ovociti vanno a maturazione (Mc Bride et al., 2015). Vi sono infatti specie con ovario sincrono, sincrono a gruppi, o asincrono. *Danio rerio* rientra nell'ultima categoria ed è quindi possibile trovare sempre ovociti in tutte le fasi di maturazione (Lubzens et al., 2009). La riproduzione nei vertebrati è sotto il controllo dell'asse Ipotalamo-Ipofisi-Gonade ed è mediata da ormoni.

1.5.1 Asse Ipotalamo-Ipofisi-Gonade

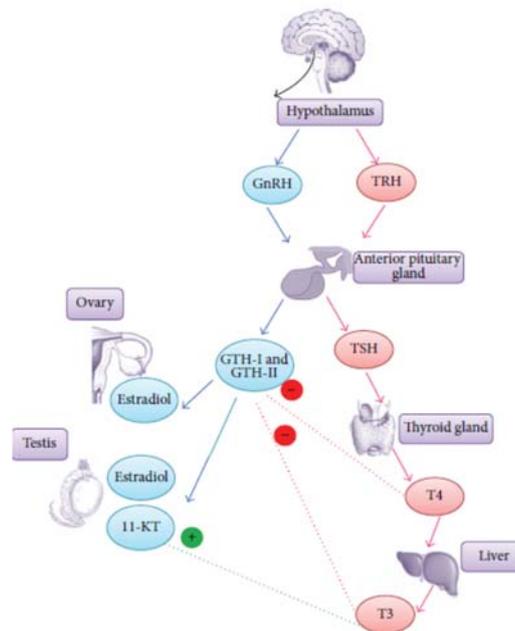


Fig.3 : Asse Ipotalamo-Ipofisi-Gonade dello zebrafish

Segnali elaborati a livello ipotalamico inducono l'attivazione della secrezione degli ormoni che avviano il processo riproduttivo (Fig. 3) (Ramezani-Fard et al., 2013). Il processo è avviato dal rilascio del Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH). Il legame del GnRH al suo recettore sulle cellule secretorie dell' ipofisi innesca la sintesi e il rilascio delle Gonadotropine (GTH). Nei pesci le due principali gonadotropine prodotte sono l'ormone follicolo-stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH) (Ji et al., 2013). La secrezione delle due gonadotropine nei pesci con ovario sincrono segue dei pattern temporali differenti, con picchi di FSH seguiti da elevate concentrazioni di LH. Nei pesci con ovario asincrono, come zebrafish, sono state riscontrate variazioni molto

ampie del tasso di sintesi e rilascio delle gonadotropine durante il ciclo di sviluppo ovocitario. Tali fluttuazioni, pur essendo variabili tra le specie, possono essere descritte attraverso tre modelli principali: (1) il quantitativo di LH ed FSH in circolo dipende dalla percentuale di ovociti che si trovano nelle fasi precoci di crescita e maturazione nella gonade; (2) fluttuazioni della concentrazione di entrambe le gonadotropine durante le varie fasi di sviluppo ovocitario; (3) livelli in circolo di LH costanti e semplice decremento dell'FSH rilasciato durante le fasi di maturazione (Rosenfeld et al., 2007). L'andamento dell'espressione di questi recettori da parte delle cellule somatiche della gonade segue le fluttuazioni di rilascio osservabili nelle gonadotropine. In zebrafish, l'espressione di FSH-R è strettamente correlato alla fase di crescita vitellogena, mentre l'espressione di LH-R è associato alla fase finale di maturazione (Rosenfeld et al., 2007). Il legame di LH al recettore posto sulle cellule della teca dà inizio alla steroidogenesi; tra di essi, il principale ormone femminilizzante coinvolto nel processo riproduttivo è il 17β -estradiolo (E2), la cui sintesi richiede un lavoro sinergico tra le cellule della teca e le cellule della granulosa. Sempre per azione di LH, allo stesso tempo, viene stimolata la sintesi della proteina StAR (Steroidogenic Acute Regulatory-protein). Questa proteina permette l'ingresso del colesterolo, molecola precursore degli ormoni steroidei, nel mitocondrio, sede della steroidogenesi. Nel mitocondrio delle

cellule della teca avviene dunque la prima parte del processo, la quale si conclude con la sintesi di un androgeno, solitamente il testosterone. Questo è successivamente libero di diffondere nelle cellule della granulosa dove l'enzima aromatasi ne determina la conversione in estradiolo nelle cellule in cui è avvenuto il legame tra FSH e FSH-R (Nagahama, 1994). Una volta sintetizzato, E2 viene immesso nel sistema circolatorio e raggiunge il fegato. Il legame tra E2 e il suo recettore innesca una serie di reazioni che portano alla trascrizione del gene per la vitellogenina, la quale poi raggiungerà la gonade attraverso il circolo ematico e sarà internalizzata dagli ovociti competenti.

1.5.2 Stadi di sviluppo ovocitario

L'ovogenesi può essere suddiviso in sei fasi principali (Patino et al., 2002; Lubzens et al., 2010) (Fig. 4):

- (1) segregazione delle cellule della linea germinale con formazione delle Primordial Germ Cell (PGC);
- (2) differenziamento sessuale e trasformazione delle PGC in ovogoni;
- (3) inizio meiosi e contestuale trasformazione degli ovogoni in ovociti;
- (4) crescita e sviluppo degli ovociti durante il periodo di arresto meiotico;
- (5) ripresa della meiosi e maturazione degli ovociti;
- (6) ovulazione.

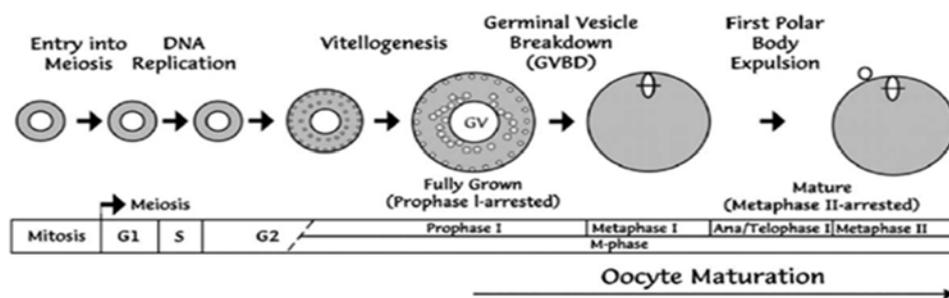


Fig. 4: Principali fasi di sviluppo ovocitario (1-5)

L'individuazione delle diverse fasi di sviluppo ovocitario sono artificiose e derivanti dall'osservazione di alcune specifiche caratteristiche osservabili in ogni singolo stadio. Tuttavia, l'ovogenesi è un processo estremamente dinamico e quindi è spesso molto complesso riuscire a distinguere tra l'una e l'altra fase (Lubzens et al., 2010). Contestualmente all'inizio della meiosi osservabile negli ovociti, si nota l'inizio di un secondo processo: la follicologenesi. Durante la follicologenesi, i singoli ovociti vengono circondati da cellule somatiche predisposte a favorire l'avanzamento dello sviluppo dell'ovocita stesso. All'interno di ogni follicolo è possibile distinguere due tipi cellulari: le cellule della granulosa, che si dispongono in intimo contatto con l'ovocita, e le cellule della teca, che invece si distribuiscono esternamente (Patino et al., 2002). Lo sviluppo dell'ovocita e quello del follicolo progrediscono di pari passo fino al momento dell'ovulazione. Durante le prime fasi di sviluppo si osservano una serie di processi che vengono collettivamente definiti "fasi di crescita primaria". La crescita primaria, o pre-vitellogenica, si protrae fino alla

comparsa degli alveoli corticali ed è caratterizzata dalla sintesi di tutte le molecole e gli organuli necessari ad affrontare le fasi di sviluppo successive (Lubzens et al., 2010). Ad essere maggiormente sintetizzati sono gli rRNA e gli mRNA che codificano per i recettori della vitellogenina e per gli enzimi coinvolti nel suo processamento (Patino et al., 2002). L'aumento nel numero e nel volume degli alveoli corticali e la comparsa degli "yolk-granules" derivanti dall'accumulo di vitellogenina e di lipidi determinano l'inizio della "crescita secondaria" (Lubzens et al., 2010). Gli alveoli corticali sono delle strutture vescicolari che immagazzinano le varie molecole utili allo sviluppo dell'ovocita e che devono il loro nome al fatto che si dispongono nella periferia cellulare, a livello della faccia interna della membrana plasmatica. Lo sviluppo degli alveoli corticali è associato ad un incremento dei livelli plasmatici di FSH e 17β -estradiolo (E2), ma anche all'espressione dei trascritti relativi alla proteina StAR (Lubzens et al., 2010). La crescita secondaria si conclude con la vitellogenesi, fenomeno dettagliatamente riportato nel successivo paragrafo. Il ciclo di sviluppo degli ovociti si conclude con la maturazione. Dal punto di vista ormonale, la maturazione è associata a un picco di LH e di MIS (Maturation-Inducing Steroids) (Patino et al., 2002). Queste molecole sono dei derivati specie-specifici del progesterone che, mediante il legame ad appositi recettori di membrana, sono in grado di attivare il Maturation Promoting Factor

(MPF); questo a sua volta induce la ripresa della meiosi. Il MPF stimola la disgregazione della membrana nucleare in un processo noto come Germinal Vesicle Breakdown (GVBD) e permette la realizzazione della prima divisione meiotica (Le Menn et al., 2007). Con l'inizio della maturazione si riscontra anche un importante aumento in volume dell'ovocita dovuto all'assorbimento di acqua. L'idratazione degli ovociti è indotta dalla presenza nell'ooplasma di ioni e amminoacidi liberi, derivanti dalla proteolisi del tuorlo (Lubzens et al., 2016). I principali enzimi coinvolti in questo processo proteolitico sono la Catepsina B e la Catepsina L (Sullivan et al., 2018). L'ovulazione avviene al termine della maturazione, con rilascio dell'uovo maturo dal follicolo (Lubzens et al., 2016).

1.5.3 Vitellogenesi

La produzione di uova nei pesci comprende una serie di eventi che gradualmente trasformano gli ovogoni in ovociti maturi. Una delle fasi cruciali dell'ovogenesi è la vitellogenesi. In questo processo, la vitellogenina, ossia la principale proteina che costituisce il tuorlo, viene depositata negli ovociti in via di sviluppo (Connolly et al., 2014). La vitellogenina è una grande glicolipofosfoproteina (300-600 kDa) la cui sintesi avviene principalmente nel fegato, sotto stimolo dell'E2 (Patino et al., 2002). Più recentemente è stata

anche osservata la sintesi di vitellogenina in tessuti extra-epatici come l'intestino e l'ovario, seppur in quantità molto ridotte rispetto a quelle osservabili nel fegato (Wang et al., 2005). Numerosi studi hanno riportato la presenza di tre forme di vitellogenina (Vtg A, Vtg B, Vtg C), ognuna delle quali può essere codificata da uno o più geni. In particolare, in zebrafish sono stati ritrovati sette geni codificanti per la vitellogenina: *Vtg1*, *Vtg4*, *Vtg5*, *Vtg6* e *Vtg7* codificano per la VtgA; *Vtg2* codifica per la VtgB; *Vtg3* codifica per la Vtg C. Quest'ultima forma differisce dalle prime due per la ridotta dimensione, o completa assenza, del dominio della Fosvitina (Connolly et al., 2014). La vitellogenina prodotta dal fegato viene trasportata attraverso il circolo ematico fino all'ovario, dove gli ovociti competenti la internalizzano con processi di endocitosi recettore-dipendente e la sfruttano per il proseguimento del loro sviluppo (Carnevali et al., 2006). È stato osservato che la Vtg C potrebbe mancare di uno specifico recettore e il suo ingresso nell'ovocita potrebbe essere mediato da semplice endocitosi o essere facilitato da alcune proteine di membrana (Sullivan et al., 2018). Una volta all'interno dell'ovocita, la vitellogenina è oggetto di tagli proteolitici da parte della Catepsina D (Carnevali et al., 2006). La scissione della vitellogenina porta alla formazione di quattro componenti principali: la Lipovitellina (Lv), la Fosvitina (Pv), i β -componenti e il dominio C-terminale. La Lipovitellina è costituita da una

catena pesante (LvI) e da una leggera (LvII) e rappresenta la principale fonte di amminoacidi e lipidi durante lo sviluppo embrionale. La Fosvitina si comporta invece da vettore di minerali, soprattutto Fosforo e Calcio. Dal dominio C-terminale originano invece proteine minori, mentre il ruolo dei β -componenti non è ancora noto (Patino et al., 2002). La vitellogenina è anche il principale carrier di lipidi per l'ovocita, i quali possono arrivare a rappresentare il 20% del suo peso molecolare (Lubzens et al., 2016). La maggior parte dei lipidi associati alla vitellogenina (60-80%) sono rappresentati da lipidi polari come la Fosfatidilcolina e la Fosfatidiletanolamina, lipidi tipicamente ricchi in acidi grassi polinsaturi (Patino et al., 2002). I lipidi neutri, come i trigliceridi, vengono portati all'interno degli ovociti mediante le Very low density lipoprotein (Vldl) e si accumulano nell'ooplasma formando delle gocce lipidiche che, durante la maturazione, si fondono formando un'unica massa oleosa (Lubzens et al., 2016). Questi lipidi vengono utilizzati dall'embrione in via di sviluppo per ricavare energia mentre gli acidi grassi polinsaturi trasportati mediante la vitellogenina svolgono un ruolo strutturale divenendo parte integrante delle membrane cellulari (Patino et al., 2002). Relativamente all'aspetto ormonale, l'ingresso degli ovociti in vitellogenesi è accompagnato a una riduzione nei livelli di Growth differentiation factor 9 (GDF9) e di Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) e a un aumento dei livelli di LH e FSH.

Anche i livelli di Attivina- β A aumentano con il progredire dello sviluppo follicolare fino a raggiungere un picco nel corso della vitellogenesi (Lubzens et al., 2010). L'ovogenesi dello zebrafish è stata accuratamente descritto da Selman et al. nel 1993, con individuazione di cinque stadi, sulla scorta di criteri morfologici e eventi fisiologici e biochimici.

Stadio IA: E' la fase di crescita pre-follicolare (diametro dell'ovocita = circa 7-20 μ m). I piccoli ovociti vengono man mano rivestiti da cellule pre-follicolari. I nuclei di questi ovociti sono centrali e grandi rispetto alla quantità di ooplasma. I nucleoli sono piccoli e presenti in numero variabile.

Stadio IB: fase follicolare (diametro del follicolo = circa 20-140 μ m). I follicoli sono trasparenti e il nucleo dell'ovocita è visibile al loro interno. L'ovocita è circondato da un singolo strato di cellule follicolari squamose e man mano che cresce, l'ooplasma diventa più basofilo e proliferano organuli intracellulari. Poco dopo l'inizio dello stadio IB, i cromosomi iniziano a decondensarsi e, entrati nel diplotene, rimangono immutati per il resto dello sviluppo degli ovociti. Inizialmente, uno o pochi nucleoli grandi (fino a 15 μ m di diametro) sono evidenti all'interno della vescicola germinale, ma man mano che l'ovocita cresce, i nucleoli proliferano, rimpiccioliscono e si spostano in periferia all'interno della vescicola germinale. L'ovocita è avvolto da strati di tessuti somatici e si forma così il follicolo definitivo. Questo è costituito da un ovocita

circondato da un singolo strato di cellule follicolari squamose che giacciono su una membrana basale distinta. Questo complesso è circondato da un tessuto connettivo vascolarizzato, la teca, ricoperta da un epitelio di superficie. Compare un materiale amorfo denso agli elettroni, inizialmente come chiazze isolate, tra numerosi microvilli corti che si estendono dalla superficie dell'ovocita verso le sovrastanti cellule follicolari e viceversa. Questo materiale extracellulare è la prima manifestazione dell'involucro vitellino in via di sviluppo (zona radiata), che è spesso meno di $0.15\ \mu\text{m}$ alla fine dello stadio I.

Stadio II: stadio degli alveoli corticali (diametro del follicolo = $0,14-0,34\ \text{mm}$). L'inizio dello stadio II è indicato dalla comparsa di alveoli corticali all'interno dell'ovocita. Man mano che i follicoli aumentano di dimensioni e proliferano gli alveoli corticali, gli ovociti diventano opachi e le vescicole germinali sono difficili da vedere. Gli alveoli corticali sono vescicole di dimensioni variabili che si colorano con i reagenti per proteine e carboidrati. Compaiono per primi nelle immediate vicinanze del complesso del Golgi. Come l'ovocita cresce, gli alveoli corticali aumentano di numero e dimensioni, raggiungendo diametri di circa $25\ \mu\text{m}$, e alla fine dello stadio II occupano gran parte dell'ooplasma. Gli alveoli corticali vengono man mano sospinti nella periferia degli ovociti a causa dell'accumulo centripeto del tuorlo, e infine il loro contenuto viene rilasciato dalle uova in un processo definito reazione dei granuli corticali (Hart et al.,

1977; Hart e Yu, 1980; Hart, 1990). Durante la fase alveolo corticale, la vescicola germinale continua ad ampliarsi, diventa di forma irregolare, e al suo interno si verificano notevoli cambiamenti. I nucleoli proliferano fino anche a 1.500 all'interno della vescicola germinale (Hisaoaka e Firlit, 1962), diventando pleomorfi e di dimensioni variabili. All'interno dell'ooplasma, i mitocondri si allungano e rimangono strettamente associati con cisterne di reticolo endoplasmatico. Verso la fine dello stadio II, corpuscoli simili a lisosomi diventano abbastanza evidenti. Essi contengono sia materiale membranoso che componenti granulari a densità variabile, e spesso si trovano adiacenti agli alveoli corticali. Un altro importante evento sintetico che si verifica all'interno dei follicoli allo stadio II è la formazione di un involucro tripartito di vitellina. Vicino all'inizio dello stadio II, l'involucro sviluppa un secondo strato, tra lo strato iniziale (formatosi alla fine dello stadio I) e l'oolemma. Lo strato esterno rimane omogeneo e moderatamente denso di elettroni, mentre lo strato interno appena formato è più lucido agli elettroni. Alla fine, appare un terzo strato, più vicino all'oolemma. I tre strati sono stati definiti zona radiata esterna, zona radiata media, zona radiata interna (Ulrich, 1969). Con l'inizio della vitellogenesi, l'involucro della vitellina raggiunge il suo spessore massimo di circa 6,0 μm . La vitellina appena formata è perforata da pori, che sono attraversati da lunghi microvilli provenienti sia dagli ovociti sia dalle cellule

follicolari con contatti giunzionali tra di essi (Kessel et al., 1985b). All'esterno dell'ovocita e dell'involucro della vitellina, le cellule del follicolo diventano cuboidali, continuano a dividersi attorno all'ovocita in crescita e rimangono attaccate l'una all'altra da numerosi desmosomi e da altre giunzioni intercellulari (Kessel et al., 1988). All'interno della teca compaiono cellule specializzate distinte dai fibroblasti. Queste "cellule speciali della teca" o "cellule interstiziali ovariche" secernono verosimilmente steroidi (Lambert, 1978).

Stadio III: vitellogenesi (diametro del follicolo = 0,34-0,69 mm). I follicoli diventano sempre più opachi e la vescicola germinale è completamente oscurata. Durante questo stadio di crescita, l'ovocita aumenta di dimensioni principalmente a causa dell'accumulo di tuorlo (Wallace et al., 1985).

Stadio IV: maturazione degli ovociti (diametro del follicolo = 0,69-0,73 mm). La vescicola germinale migra verso la periferia degli ovociti, l'involucro nucleare si rompe, si verifica la prima divisione meiotica e i cromosomi procedono alla seconda metafase meiotica dove si arrestano; a questo punto, l'ovocita diventa uovo (Selman e Wallace, 1989).

Stadio V: L'uovo è maturo (diametro 0,73-0,75 mm). Le uova traslucide vengono ovulate nel lume ovarico. L'involucro vitellino rimane tripartito, ha

uno spessore inferiore a 3,0 μm ed è ancora attraversato da pori (Hart et al., 1992).

L' Ovogenesi dello zebrafish è ancora attivo oggetto di studi al fine di acquisire informazioni più dettagliate soprattutto nelle fasi precoci del processo. Le fasi avanzate dell'ovogenesi sono state meglio descritte rispetto alle fasi iniziali e mancano informazioni ampie e dettagliate sui primi passi nello sviluppo degli ovociti e sul loro contesto ovarico.

2. SCOPO DELLA TESI

Il progressivo sviluppo dell'acquacoltura ha indotto la ricerca a individuare ingredienti innovativi, alternativi rispetto agli ingredienti come olio e farina di pesce, al fine di rendere questa attività più sostenibile. Negli ultimi anni si sono registrati dei progressi in tale ambito. Sono stati inizialmente sperimentati mangimi di derivazione vegetale, soprattutto a base di soia, semi di cotone e alghe, scoprendone gli aspetti positivi e quelli negativi. Più recentemente la ricerca si è indirizzata verso la valutazione dell'introduzione nei regimi alimentari dei pesci d'allevamento delle farine di insetti. Diversi studi sono stati condotti al fine di acquisire informazioni sui vari effetti dell'introduzione parziale o totale di farine di insetto nei mangimi sulla fisiologia del pesce. Finora però essi hanno prodotto informazioni parziali e relative a singoli aspetti della fisiologia del pesce. Un aspetto particolarmente rilevante è la conoscenza degli effetti delle diete contenenti farine di insetto sulla riproduzione dei pesci. Oggetto della presente tesi è la valutazione a lungo termine, con approccio multidisciplinare comprendente indagini biometriche, istologiche, molecolari e spettrofotometriche, degli effetti biologici di inclusioni parziali nella dieta di farina di BSF (25 e 50% di sostituzione della farina di pesce) sulla riproduzione dello zebrafish.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Modello sperimentale

3.1.1 Zebrafish (*Danio rerio*)



Fig. 5: Esemplare di zebrafish (*Danio Rerio*)

Zebrafish (*Danio Rerio*) (Fig. 5) è stato utilizzato come modello biologico per la prima volta negli anni '70 grazie ai costi di mantenimento contenuti. Zebrafish presenta una serie di caratteristiche che lo rendono un organismo modello. Fin dall'inizio del suo sviluppo, dopo solo 18 ore dalla fecondazione, zebrafish mostra occhi e segmenti muscolari e cerebrali ben sviluppati; dopo circa 24 ore la segmentazione è completata e dopo 72 ore le uova si schiudono. Un' importante caratteristica, utile per lo sviluppo degli studi biologici, è data dal fatto che l'embrione è completamente trasparente; in questo modo è possibile osservare in maniera diretta lo sviluppo dei vari organi. Poiché sia l'embrione che le larve sono trasparenti, la visualizzazione dei vasi e del flusso circolatorio è possibile grazie all'uso di proteine fluorescenti. Inoltre, l'elevata prolificità di zebrafish permette di ottenere, in presenza di condizioni ottimali

per la riproduzione e crescita, circa 200 uova a settimana. Per quel che concerne il genoma, questo è stato interamente sequenziato, rivelando una elevata similitudine con quello umano; i geni associati allo sviluppo delle malattie mostrano infatti una omologia pari al 70% circa con quelli umani. Zebrafish si è rilevato altamente utile nel comprendere i meccanismi di insorgenza, crescita e diffusione dei tumori, dal momento che la biologia delle neoplasie dei pesci e degli umani è la stessa. Zebrafish è inoltre ampiamente usato in molti campi dell'acquacoltura per lo studio e l'identificazione di geni coinvolti nei meccanismi che presiedono il metabolismo dei nutrienti, lo sviluppo muscolare e lo stress (Reed & Jennings, 2010; Khan & Alhewairini, 2018).

3.1.2 Black soldier fly (*Hermetia illucens*)



Fig. 6: Esemplare di Black soldier fly (*Hermetia illucens*)

La mosca soldato nera (BSF) (*Hermetia illucens*) (Fig.6) appartiene alla famiglia Stratiomyidae; si tratta di un insetto coinvolto nella decomposizione delle sostanze organiche. Il ciclo vitale di BSF varia dalle 6 alle 30 settimane, passando attraverso gli stadi di uova, larva, prepupa e terminando con lo sviluppo dell'insetto adulto (van Huis et al., 2013). La schiusa delle uova avviene in circa 4 giorni, mentre lo stadio larvale ha la durata di circa 18 giorni. Dopo aver completato la loro trasformazione da prepupa allo stato adulto, gli insetti lasciano il loro substrato nutritivo e raggiungono un luogo asciutto. Questo comportamento, detto "self-harvesting, auto-raccolta" è molto utile nel loro allevamento poiché elimina una fase di manodopera intensa (Ferrarezi et al., 2016). Questo atteggiamento alla migrazione delle prepupe si verifica a causa della loro necessità di lasciare il letame e trasformarsi in adulti. In questo stadio gli insetti raggiungono il loro massimo peso, avendo accumulato una notevole quantità di grasso necessario al loro sostentamento durante la

metamorfosi. Il tratto gastro-enterico delle prepupe che migrano risulta vuoto, ed esse non si nutrono più, ma useranno il loro apparato buccale per trascinare il loro corpo alla ricerca di un luogo sicuro per l'impupamento (Newton et al., 2005). Come le prepupe, anche gli adulti non si alimentano e fanno affidamento sulle riserve di grasso accumulate nello stato larvale. Gli insetti adulti non avvicinano gli esseri umani, non mordono né pungono e non fungono da veicolo per alcuna malattia. Il periodo di sviluppo larvale è più lungo di quello di altre mosche come la mosca domestica e della mosca delle carogne; questo significa che ogni singola larva consumerà una quantità maggiore di substrato e produrrà una pupa più grande (Wang & Shelomi, 2017). Molti studi infatti riportano un elevato tasso di conversione in mangime da parte di *Hermetia illucens* che può portare ad una riduzione del 65-79% dei rifiuti forniti (Diener, 2011). E' noto, inoltre, che la larva di BSF è in grado di modificare alcuni componenti dei rifiuti come l'azoto e il fosforo, convertendo un prodotto di scarso valore economico in uno a più elevato valore, dal momento che i residui derivanti dalla digestione delle larve di BSF possono essere impiegate, ad esempio, come concime in agricoltura (Diener, 2011). Questa caratteristica rende *Hermetia illucens* un promettente strumento per la lavorazione dei rifiuti organici (Oliveira et al., 2015). Un'altra importante caratteristica di *Hermetia illucens* è rappresentata dal suo coinvolgimento nel controllo dei parassiti della

Musca domestica, come dimostrano alcuni lavori nei quali la quantità di larve di mosca presente sul letame viene azzerata dopo lo sviluppo delle larve di BSF (Sheppard, 1983). L'esatto meccanismo implicato in questa interazione non è ancora noto ma sembra che la competizione per il cibo e il territorio, e i cambiamenti sul substrato di allevamento causati da BSF possano esserne alla base (Bradley & Sheppard, 1984). Infine, *Hermetia illucens* presenta un buon profilo amminoacidico, diventando un valido sostituto della farina di pesce per gli allevamenti acquatici. L'unico svantaggio è dato dal fatto che *Hermetia illucens*, come altri insetti, presenta bassi livelli di n-3 HUFA, in particolare di DHA ed EPA che sono acidi grassi essenziali nella la dieta dei pesci. Tuttavia, il contenuto di acidi grassi presenti in BSF può essere modificato con facilità attraverso l'arricchimento con n-3 HUFA dei substrati nutritivi destinati alle larve; in questo modo l'alimentazione a base di farine di BSF può essere considerata una valida fonte di nutrienti per il settore della piscicoltura.

3.2 Aspetti etici

Tutte le procedure sugli animali sono state condotte in linea con la legislazione italiana sulla sperimentazione sugli animali e con l'approvazione del comitato etico dell'Università politecnica delle Marche. Durante lo studio sono state utilizzate condizioni ottimali di allevamento. Ogni accortezza è stata impiegata allo scopo di minimizzare la sofferenza dei pesci con utilizzo di anestetico (MS222 1g/L, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA).

3.3 Formulazione delle diete

Nel presente studio sono state testate tre diete sperimentali. La dieta di controllo conteneva farina di pesce, mentre le altre 2 diete includevano il 25% (BSF 25%) e il 50% (BSF 50%) di farina di prepupe di BSF, in sostituzione dell'analogia quantità di farina di pesce. Le prepupe di BSF sono state acquistate dalla Smart Bugs s.s. Company (Ponzano Veneto, TV, Italia) e sono state allevate su un substrato composto da farina di mais e miscela di frutta e verdura (50:50). Le prepupe, una volta raccolte, sono state liofilizzate, tritate e congelate in azoto liquido (-80°C). Le tre diete sperimentali sono state setacciate per ottenere granulometrie differenti e impiegate in funzione della crescita del pesce. Le diete sono state formulate per essere isoazotate (CP 40%) e isolipidiche (EE18%) e sono state analizzate per composizione (AOAC, 1998) e il contenuto energetico è stato misurato con una bomba calorimetrica adiabatica (IKA C7000, Werke GmbH & Co, Staufen, Germania). (Tab.2)

	Controllo	BSF25%	BSF50%
<i>Ingredienti (g/kg)</i>			
Farina di pesce (Chile, super prime)	420	315	210
Concentrato proteico di piselli	55	78	100
<i>Hermetia illucens</i>	0	105	210
Farina di glutine di frumento	55	78	100
Farina di grano	290	268	255
Olio di pesce	70	40	28
Olio di palma	70	75	56
Vitamine e minerali	20	20	20
Legante	20	20	20
Metionina	0	1	1
<i>Composizione approssimativa (%)</i>			
Sostanza secca	4.2±0.03	5.5±0.18	5.3±0.42
Proteine	40.0±0.47	40.2±0.39	41.1±0.10
Lipidi	18.6±0.14	17.7±0.20	17.0±0.13
Ceneri	14.2±0.23	14.1±0.31	12.2±0.59
NFE	23.0±0.31	22.5±0.60	24.4±0.99
Energia (MJ/kg)	22.1±0.11	22.3±0.03	21.3±0.06

Tab. 2: Ingredienti, composizione, analisi approssimata e contenuto energetico delle diete sperimentali

3.4 Pesci

Gli embrioni di zebrafish sono stati mantenuti 48 ore in un sistema Tecniplast (Varese, Italia) alle seguenti condizioni: temperatura 28° C, pH 7.0, concentrazioni di NO₂ e NH₃ <0,01 mg/L, NO₃ <10 mg/L, rispettivamente e fotoperiodo 12L/12D. Dopo questo primo periodo, gli embrioni sono stati raccolti, contati allo stereomicroscopio (Leica Wild M3B, Leica Microsystems, Nussloch, Germania) e divisi in maniera randomizzata in tre gruppi sperimentali (in triplicato) secondo le tre diete sperimentali.

3.5 Disegno sperimentale

Le larve di zebrafish sono state inizialmente allevate in 9 vasche da 20 litri (3 vasche per gruppo sperimentale con 500 pesci per vasca, 1500 per gruppo dietetico) e alimentate con le tre diete sperimentali. L'acqua nelle vasche veniva sostituita dieci volte al giorno da un sistema di gocciolamento. I lati della vasca erano coperti da pannelli neri per ridurre la luce. Dopo 30 giorni dalla deposizione delle uova (dps), i pesci di ogni vasca sono stati trasferiti in vasche più grandi da 100 L (9 in totale, 3 per ciascun gruppo dietetico) dotati di filtrazione meccanica e biologica (Panaque, Roma, Italia) e hanno proseguito le stesse diete per 12 mesi. Gli zebrafish adulti di 12 mesi sono stati prelevati, anestetizzati con una dose letale di MS222 (1g/L, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA) e contati per valutare il tasso di sopravvivenza. Il fegato, gli ovari e pesci interi sono stati conservati per indagini future.

3.6 Programma di alimentazione

A partire da 5 giorni dopo la deposizione delle uova (dps) e fino a 12 mesi gli zebrafish sono stati così alimentati: Gruppo di controllo con farina e olio di pesce, gruppo BSF 25% con l'inclusione nella dieta del 25% di farina di prepupe di BSF, gruppo BSF 50% con l'inclusione del 50% di farina di prepupe di BSF. Le dimensioni delle particelle del mangime sono state <100 µm dal 5° al 15° dps, 101-200 µm dal 16° al 30° dps, 201-400 µm dal 31° al 60° dps e 401-600 µm dal 61° dps fino al termine della sperimentazione. Gli zebrafish sono stati alimentati due volte al giorno (2% del peso corporeo) e in aggiunta, dal 5° al 15° dps, con il rotifero *Brachionus plicatilis* (5 ind/mL) secondo Lawrence et al. (2012).

3.7 Biometria

Crescita. Per la valutazione dell'accrescimento, 10 femmine di zebrafish per vasca (30 per gruppo sperimentale) sono state raccolte in maniera randomizzata a 12 mesi e misurate e pesate individualmente. La lunghezza standard è stata determinata con calibro Measy 2000 Typ 5921, Svizzera, precisione: 0,1 mm. Il peso è stato valutato con bilancia analitica OHAUS Eplorer (Greifensee, Switzerland), precisione: 0,1 mg.

Sopravvivenza. La sopravvivenza è stata valutata al termine della sperimentazione contando il numero dei pesci rispetto al numero iniziale delle larve.

Indice gonadosomatico. Tutti gli ovari sono stati pesati singolarmente per calcolare l'indice gonadosomatico (GSI) secondo la seguente formula: peso ovario/peso corporeo totale \times 100.

3.8 Estrazione dei lipidi e analisi degli acidi grassi

Le diete sperimentali, i pesci interi (3 pesci per vasca, 9 per gruppo dietetico) e le uova appena fecondate sono stati analizzati per contenuto e composizione in acidi grassi. I campioni sono stati tritati, omogeneizzati (omogeneizzatore MZ 4110; DCG Electronic) e liofilizzati (Edwards EF4; Crawley, Sussex, Inghilterra). L'estrazione dei lipidi è stata effettuata su polveri liofilizzate dopo estrazione assistita da microonde (MAE) (Truzzi et al., 2017). Gli esteri metilici degli acidi grassi (FAMES) sono stati preparati secondo Truzzi et al. (2017), usando l'estere metilico dell'acido nonadecanoico (19: 0; Dr. Ehrenstorfer GmbH; Germania) come standard interno. I FAMES sono stati analizzati su un sistema GC Agilent-6890 accoppiato ad un rivelatore selettivo di massa quadrupolare Agilent-5973N. Una colonna capillare CPS ANALITICA CC-wax-MS (30m x 0,25mm ID, spessore 0,25 µm) è stata utilizzata per separare i FAMES. Le condizioni strumentali sono state impostate secondo Truzzi et al. (2017). Per ciascun campione, sono state eseguite almeno tre prove sul GC-MS. La precisione del metodo proposto è stata valutata secondo Truzzi et al. (2014) e i limiti di rilevazione (LOD) e quantificazione (LOQ) calcolati secondo Truzzi et al. (2014) e Zarantoniello et al. (2018).

3.9 Raccolta delle uova

Per la raccolta delle uova sette maschi e cinque femmine di zebrafish per vasca (in triplicato) sono stati raccolti in maniera casuale a 12 mesi e trasferiti in una vasca d'allevamento prima del buio. La parte inferiore di ogni vasca è stata coperta da una griglia in acciaio inossidabile per consentire alle uova di passare in vassoi separati e prevenire il cannibalismo da parte dei pesci nella vasca. Circa 20-30 minuti dopo l'inizio della luce, i vassoi sono stati rimossi e le uova sono state raccolte e conservate per ulteriori analisi. Per stimare il tasso di riproduzione, le uova di ciascun gruppo (in triplicato) sono state contate ogni mattina con uno stereomicroscopio (Leica Wild M3B; Leica Microsystems, Nussloch, Germania) per 10 giorni. Per stimare la velocità di schiusa, gli embrioni sviluppati normalmente da ciascun gruppo dietetico (in triplicato) sono stati selezionati e distribuiti casualmente in tre piastre di Petri (30 embrioni per piastra) contenenti fish buffer e quindi incubati a temperatura ambiente (26 ° C) fino alla schiusa (~ 3 dps). Infine sono state contate le larve.

3.10 Istologia e analisi degli ovari

Gli ovari raccolti da 5 diversi esemplari di zebrafish per vasca (15 per gruppo) sono stati fissati per immersione nella soluzione di Bouin (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) e conservati a 4 ° C per 24 ore. I campioni sono stati lavati tre volte con etanolo (70%) per dieci minuti e conservati nella stessa soluzione di etanolo. I campioni sono stati quindi disidratati in soluzioni crescenti di etanolo (80, 95 e 100%), lavati con xilene (Bio-Optica, Milano, Italia) e inclusi in paraffina (Bio-Optica). I blocchi di paraffina solidificati sono stati tagliati con un microtomo (Leica RM2125 RTS, Nussloch, Germania) e le sezioni di 5 µm sono state colorate con ematossilina di Mayer ed eosina Y (Sigma-Aldrich, Milano, Italia). Le sezioni sono state esaminate con un microscopio Zeiss Axio Imager.A2 (Oberkochen, Germania) per contare il numero di ovociti previtellogenicici, di classe III e IV. Le immagini sono state acquisite per mezzo di una fotocamera digitale a colori combinata Axiocam 503 (Zeiss, Oberkochen, Germania).

3.11 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier

Le misurazioni FTIRI sono state eseguite per mezzo di uno spettrometro Perkin Elmer Spectrum GX1 interfacciato con un microscopio 6X AutoImage e dotato di un rivelatore fotoconduttivo Hg-Cd-Te (MCT) da 0,25 mm, funzionante alla temperatura dell'azoto liquido (Waltham, Massachusetts, USA). Per l'analisi FTIRI, sono stati raccolti cinque campioni di ovari da zebrafish di 12 mesi appartenenti ai tre gruppi sperimentali. I campioni sono stati conservati a -80°C fino a quando non sono stati tagliati per mezzo di un criotomo (tre fette per ogni taglio del campione a $200\ \mu\text{m}$ di distanza l'una dall'altra, spessore $\approx 10\ \mu\text{m}$). Le sezioni sono state immediatamente depositate senza alcun processo di fissazione su finestre ottiche CaF_2 (spessore 1 mm, diametro 13 mm) e asciugate all'aria per 30 minuti (Vargas et al., 2019). Sono state analizzate 15 sezioni per ciascun gruppo sperimentale. Su ciascuna sezione, per mezzo di un obiettivo 15X, sono stati scelti per l'analisi IR 3-4 ovociti di classe III e IV. Su questi ovociti, le mappe IR sono state acquisite in modalità di trasmissione nell'intervallo MIR da $4000\ \text{cm}^{-1}$ a $800\ \text{cm}^{-1}$ (risoluzione spettrale $4\ \text{cm}^{-1}$, risoluzione spaziale $50 \times 50\ \mu\text{m}$, 64 scansioni per ciascuno spettro acquisito). La dimensione delle mappe IR variava da 500 a $900\ \mu\text{m}$, a seconda della dimensione degli ovociti. Prima di ogni acquisizione, lo spettro di fondo è stato acquisito su una porzione pulita della finestra ottica CaF_2 . Le mappe IR pre-

elaborate sono state quindi integrate nelle seguenti regioni spettrali per ottenere immagini a colori della distribuzione topografica di specifici componenti biochimici (Vargas et al., 2019): 3000-2824 cm^{-1} (rappresentativa di catene alchiliche lipidiche, denominate LIP); 1767-1710 cm^{-1} (rappresentativa degli acidi grassi, denominata FA); 1710-1478 cm^{-1} (rappresentativa delle proteine, chiamata PRT); 1478-1426 cm^{-1} (rappresentativa dei gruppi CH_2 , denominata CH_2); 1426-1358 cm^{-1} (rappresentativa dei gruppi COO^- degli amminoacidi, denominata COO); 1188-1148 cm^{-1} (rappresentativa dei gruppi COH, denominata COH) e 1148-992 cm^{-1} (rappresentativa dei gruppi PO_2^- , denominato PH). Per ogni blocco biochimico sono state adottate scale diverse, colori rosa chiaro/bianco che indicano i valori di assorbanza più alti, mentre il colore blu rappresenta i valori più bassi. Inoltre, le suddette aree integrate sono state usate per calcolare i seguenti rapporti di banda (routine di integrazione OPUS 7.1) (Vargas et al., 2019): 3000-2824 cm^{-1} (rappresentativa delle catene alchiliche lipidiche, denominate LIP); 1767-1710 cm^{-1} (rappresentante degli acidi grassi, denominato FA); 1710-1478 cm^{-1} (rappresentante delle proteine, chiamato PRT); 1478-1426 cm^{-1} (rappresentante dei gruppi CH_2 , denominato CH_2); 1188-1148 cm^{-1} (rappresentante dei gruppi COH, denominato COH) e 1141-992 cm^{-1} (rappresentante dei gruppi PO_2^- , denominato PH). Le aree integrate sopra definite sono state utilizzate per calcolare i seguenti rapporti di

area di banda: LIP/CELL (quantità relativa di lipidi complessivi); FA/CELL (quantità relativa di acidi grassi); PRT/CELL (quantità relativa di proteine); CH₂/CELL (grado di saturazione delle catene alchiliche lipidiche); COO/CELL (quantità relativa di COO⁻ negli aminoacidi); COH/CELL (quantità relativa di carboidrati) e PH/CELL (quantità relativa di fosfati e carboidrati). La CELL, calcolata come somma delle aree integrate delle regioni 3000-2824 cm⁻¹ e 1780-950 cm⁻¹, è stata considerata rappresentativa della biomassa cellulare complessiva.

3.12 Analisi molecolari

Estrazione di RNA e sintesi di cDNA. Campioni di fegato di 5 femmine di zebrafish di ciascuna vasca (15 pesci per gruppo dietetico) sono stati prelevati e conservati a -80° C per analisi molecolari. Per l'estrazione dell'RNA da ciascun campione è stato utilizzato il reagente RNazol® RT (Sigma-Aldrich, R4533) seguendo le istruzioni del produttore. L'RNA totale è stato eluito in 20 μ l di acqua priva di RNasi (Qiagen, Venlo, Olanda). La concentrazione finale di RNA è stata determinata con spettrofotometro Nanophotometer® P-Class Class (Implen, München, Germania). L'integrità dell'RNA è stata verificata mediante colorazione GelRed™ di bande di RNA ribosomiale 28S e 18S su gel di agarosio all'1%. L'RNA è stato conservato a -80° C fino al momento dell'uso. Infine, 2 μ g di RNA sono stati utilizzati per la sintesi di cDNA, utilizzando il kit di trascrizione inversa cDNA ad alta capacità (Bio-Rad, Milano, Italia) seguendo le istruzioni del produttore.

Real-Time PCR. Le PCR sono state eseguite con SYBER Green in un termociclatore iCQer iQ5 (entrambi di Bio-Rad) secondo Zarantoniello et al. (2018). È stata eseguita la quantificazione relativa dell'espressione dei geni coinvolti nella biosintesi degli acidi grassi polinsaturi a catena lunga (*elovl2*, *elovl5* e *fads2*). Il complesso ARP 2/3, subunità 1A (*arpc1a*) e la proteina ribosomiale 13 (*rpl13*) sono stati usati come standard interni in ciascun

campione per standardizzare i risultati eliminando le variazioni quantitative e qualitative di mRNA e cDNA. I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati ed è stata verificata l'omologia. I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il software di sistema ottico iQ5 versione 2.0 (Bio-Rad) inclusi i file GeneEx Macro iQ5 Conversion e genex Macro iQ5. Le sequenze di Primer sono state progettate usando Primer3 (210 v. 0.4.0) a partire dalle sequenze di zebrafish disponibili in ZFIN. Le sequenze di Primer utilizzate sono state riportate nella Tab. 3.

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	(5'-3')
<i>elov12</i>	5'-CACTGGACGAAGTTGGTAA-3'	5'- GTTGAGGACACACCACCAGA-3'	ZDB-GENE-060421-5612
<i>elov15</i>	5'-TGGATGGGACCGAAAACAT-3'	5'-GTCTCCTCCACTGTGGGTGT-3'	ZDB-GENE-040407-2
<i>fads2</i>	5'-CATCACGCTAAACCCAACA-3'	5'-GGGAGGACCAATGAAGAAGA-3'	ZDB-GENE-011212-1
<i>arpc 1a</i>	5'-CTGAACATCTCGCCCTTCTC-3'	5'-TAGCCGATCTGCAGACACAC-3'	ZDB-GENE-040116-1
<i>rp113</i>	5'-TCTGGAGGACTGTAAGAGGTATGC-3'	5'-AGACGCACAATCTTGAGAGCAG-3'	ZDB-GENE-031007-1

Tab. 3: Sequenze dei primer impiegati.

3.13 Analisi statistica

I dati sono stati analizzati tramite one-way ANOVA, con la dieta come unica variabile. Tutti i test ANOVA sono stati seguiti dal test post-hoc di Tukey. È stato impiegato il software Prism5 per l'elaborazione statistica (GraphPad Software). Il livello di significatività statistica è stato fissato a $p < 0.05$. Tutti i risultati sono stati presentati come media \pm deviazione standard.

4. RISULTATI

4.1 Biometria

Per quanto riguarda la lunghezza standard (Fig. 5a), gli zebrafish dei gruppi BSF 25% e BSF 50% sono risultati significativamente inferiori ($p < 0,05$) al controllo. Considerando il peso umido (Fig. 5b) e l'indice gonadosomatico (Fig. 5c) le differenze tra i tre gruppi sperimentali di zebrafish non sono state statisticamente significative ($p > 0,05$).

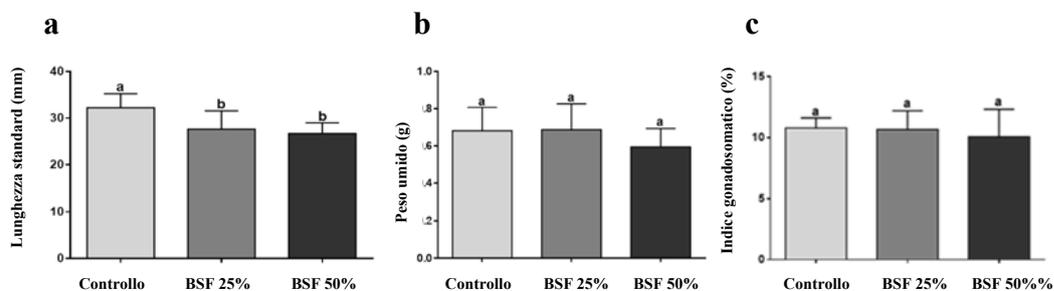


Fig. 5: (a) lunghezza, (b) peso umido e (c) indice gonadosomatico di zebrafish adulti. Le lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0,05$). I valori sono presentati come media \pm deviazione standard.

4.2 Contenuto e composizione di acidi grassi

I risultati riguardanti il contenuto e la composizione di acidi grassi sono riportati separatamente per le diete, le femmine di zebrafish e le uova ovulate. Viene descritto sia il confronto tra il gruppo di controllo e i gruppi BSF 25% e BSF 50%, sia il confronto tra i due gruppi alimentati con BSF.

Diete. L'inclusione di livelli crescenti di farina di prepupe di BSF ha determinato un incremento significativo ($p < 0,05$) e progressivo del contenuto in acidi grassi saturi (SFA) nelle diete BSF 25% e BSF 50%, rispetto alla dieta di controllo (Fig. 6a). Tra le diete BSF vi è una differenza significativa, con il valore più elevato nel gruppo BSF50%. Tra gli SFA, le quantità di acido palmitico (16:0) e acido laurico (12:0) sono risultate significativamente incrementate nelle diete BSF 25% e BSF 50%.

Riguardo al contenuto in acidi grassi polinsaturi (PUFA), la dieta di controllo ha mostrato valori significativamente più elevati ($p < 0,05$) rispetto agli altri due gruppi. Tra le diete BSF vi è differenza significativa, con i valori più bassi nella dieta BSF 50% (Fig. 6a).

Gli acidi grassi n3 docosaesaenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA) hanno valori significativamente più elevati ($p < 0,05$) nella dieta di controllo, rispetto alle altre due diete BSF. Tra queste ultime, il gruppo BSF50% presenta i valori minori ($p < 0,05$) (Fig.6a).

Riguardo agli acidi grassi n6, le diete BSF 25% e BSF 50%, non differenti tra loro, hanno valori significativamente più bassi ($p < 0,05$) rispetto alla dieta di controllo (Fig. 6a).

Considerando i contenuti in acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e gli acidi grassi n9, la dieta BSF 25% mostra valori significativamente più alti ($p < 0,05$) rispetto

alla dieta di controllo e alla dieta BSF 50%, non differenti tra loro (Fig. 6a). Ciò riflette le quantità diverse delle fonti lipidiche impiegate e la composizione in acidi grassi delle tre diete sperimentali. L'acido oleico (18: 1n9) è risultato essere il MUFA più rappresentato nelle tre diete.

Infine, non ci sono state differenze significative nel rapporto n6/n3 tra la dieta di controllo e la dieta BSF 25%, mentre la dieta BSF 50% ha mostrato un valore significativamente più alto ($p < 0,05$) rispetto alle altre due diete (Fig. 6b).

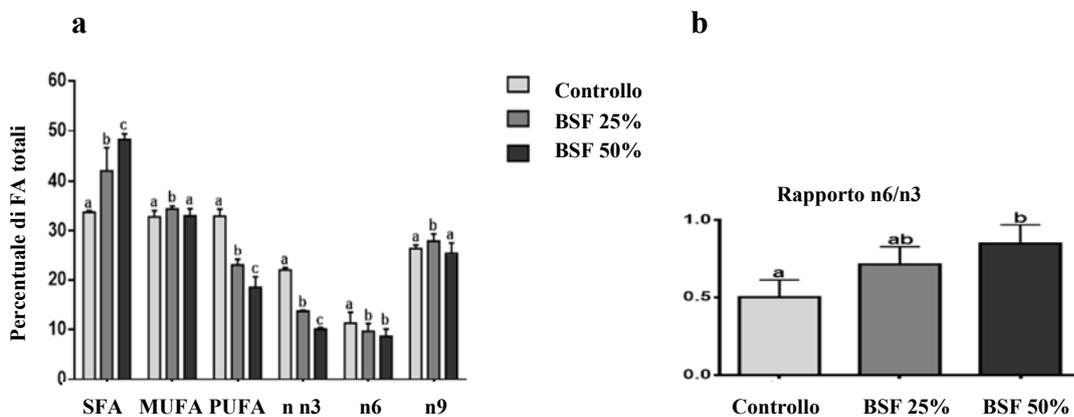


Fig. 6: (a) Contenuto percentuale in acidi grassi e (b) rapporto n6/n3. La dieta di controllo è a base di mangime di olio e farina di pesce. Le diete BSF 25% e BSF 50% includono rispettivamente il 25% e 50% di farina di BSF. Le lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0,05$), confrontati per le stesse classi di acidi grassi. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard.

Zebrafish. Il contenuto di SFA delle femmine di zebrafish ha un andamento crescente statisticamente significativo ($p < 0,05$) dal gruppo di controllo ai gruppi BSF 25% e BSF 50% (Fig. 7a). Tra i gruppi BSF, il BSF 50% ha valori significativamente più elevati ($p < 0,05$).

Riguardo ai PUFA, si sono osservati valori significativamente più alti ($p < 0,05$) nelle femmine di zebrafish del gruppo di controllo, rispetto a quelle dei gruppi BSF 25% e BSF 50%, e tra loro il gruppo BSF 50% ha un valore significativamente più basso ($p < 0,05$).

Il contenuto di acidi grassi n3 ha un andamento decrescente statisticamente significativo ($p < 0,05$): le femmine di zebrafish del gruppo di controllo hanno i valori più elevati; l'analisi dei gruppi BSF ha evidenziato che i valori più bassi sono nel gruppo BSF 50% (Fig.7a).

Riguardo agli acidi grassi n6, le femmine di zebrafish dei gruppi BSF 25% e BSF 50%, non differenti tra loro, hanno valori significativamente più alti ($p < 0,05$) rispetto a quelli del gruppo di controllo (Fig. 7a).

Per quanto riguarda i contenuti in MUFA, le femmine di zebrafish dei gruppi BSF 25% e BSF 50%, non differenti tra loro, hanno valori significativamente più alti ($p < 0,05$) rispetto al gruppo di controllo (Fig. 7a).

Riguardo agli acidi grassi n9, le femmine di zebrafish del gruppo BSF 25% hanno valori significativamente più alti ($p < 0,05$) rispetto a quelli del gruppo di controllo e del gruppo BSF 50%. Quest'ultimo ha valori significativamente più alti ($p < 0,05$) rispetto a quelli del gruppo di controllo (Fig 7a).

Per quanto riguarda il rapporto n6/n3, c'è un andamento crescente statisticamente significativo ($p < 0,05$): le femmine di zebrafish del gruppo di

controllo hanno valori più contenuti, rispetto a quelli dei gruppi BSF 25% e BSF 50%; tra di essi vi è una differenza significativa, con il valore più elevato nel gruppo BSF 50% (Fig. 7b).

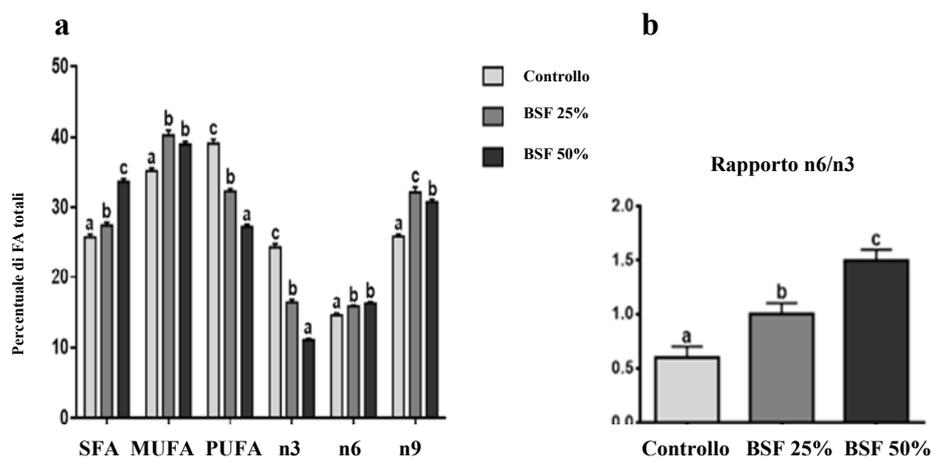


Fig. 7: (a) Contenuto percentuale in acidi grassi e (b) rapporto n6/n3 nelle femmine di zebrafish. Le lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0,05$) confrontati per le stesse classi di acidi grassi. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard.

4.3 Conteggio delle uova

Le uova sono state contate per 10 giorni nei tre gruppi sperimentali. La media complessiva delle uova, dopo 10 giorni, è risultata pari a $232,74 \pm 66,7$ nel gruppo di controllo, a $189,31 \pm 74,38$ nel gruppo BSF 25% e $58,41 \pm 52,88$ nel gruppo BSF 50%, con una differenza significativamente più bassa ($p < 0,05$) nel gruppo BSF 50%. Non vi sono state differenze significative tra gli altri due gruppi (Fig. 8). Inoltre, al giorno 6, non vi è stata deposizione di uova nel gruppo BSF 50%.

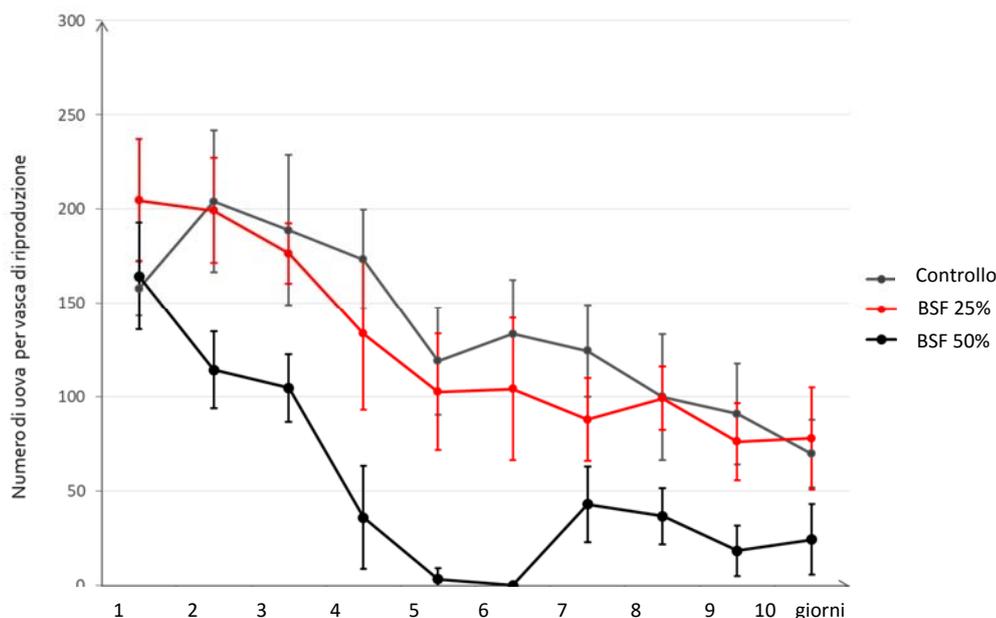


Fig. 8: Spawning rate dei tre gruppi sperimentali

4.4 Contenuto e composizione di acidi grassi delle uova ovulate

La percentuale di SFA delle uova ovulate delle femmine di zebrafish del gruppo BSF 50% è significativamente più alta ($p < 0,05$) rispetto a quella dei gruppi di zebrafish di controllo e del gruppo BSF 25% (Fig. 9a), tra i quali non vi è differenza.

Riguardo ai PUFA, le uova appartenenti al gruppo BSF 50% hanno valori significativamente più bassi ($p < 0,05$) rispetto alle uova del gruppo di controllo e del gruppo BSF 25% (Fig 9a), tra i quali non vi è differenza.

Il contenuto in n3 è significativamente più basso ($p < 0,05$) nelle uova del gruppo BSF 50%, rispetto a quello dei gruppi di controllo e BSF 25% (Fig.9a), tra i quali non vi è differenza.

L'analisi degli n6 ha evidenziato percentuali significativamente più alte ($p < 0,05$) nelle uova del gruppo BSF 50%, rispetto alle uova degli altri due gruppi (Fig. 9a), tra i quali non vi è differenza.

Considerando i MUFA, non si sono registrate differenze significative tra i tre gruppi sperimentali ($p > 0,05$) (Fig. 9a).

Riguardo agli acidi grassi n9, le uova del gruppo di controllo e del gruppo BSF 25%, non differenti tra loro, hanno valori significativamente più alti ($p < 0,05$) rispetto alle uova del gruppo BSF 50% (Fig. 9a).

Infine, per quanto riguarda il rapporto n6/n3, nelle uova del gruppo BSF 50% si sono riscontrati valori significativamente più alti ($p < 0,05$) rispetto a quelli dei gruppi di controllo e BSF 25% (Fig. 9b), tra i quali non vi è differenza.

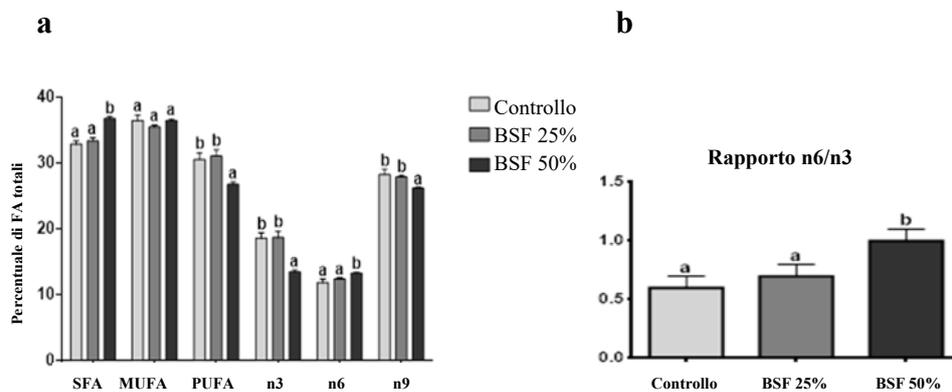


Fig. 9: (a) Contenuto percentuale in acidi grassi e (b) rapporto n6/n3 nelle uova dei tre gruppi sperimentali. Le lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0,05$) confrontati per le stesse classi di acidi grassi. I valori sono presentati come media \pm deviazione standard.

In sintesi, l'analisi del contenuto e della composizione lipidica delle diete ha rilevato un incremento degli acidi grassi saturi e una diminuzione degli acidi

grassi polinsaturi nelle diete includenti il 25% e 50% di farina di BSF. Tuttavia, nelle femmine adulte di zebrafish e nelle uova ovulate, la stessa analisi ha riscontrato una riduzione dello sbilanciamento tra le due categorie di lipidi, in particolare nelle uova.

4.5 Istologia e analisi degli ovari

L'esame istologico degli ovari dei tre gruppi sperimentali ha evidenziato un numero significativamente più alto ($p < 0,05$) degli ovociti previtellogeni nel gruppo BSF 50%, rispetto al gruppo di controllo e al gruppo BSF 25%, tra i quali non vi è differenza (Fig. 10). Al contrario il numero di ovociti in stadio III è significativamente più basso ($p < 0,05$) nel gruppo BSF 50% rispetto al gruppo di controllo e al gruppo BSF 25%, tra i quali non vi è differenza. Infine, non si sono registrate differenze significative ($p > 0,05$) nei tre gruppi per quanto riguarda gli ovociti in stadio IV (Fig. 10). Le immagini delle sezioni istologiche degli ovari sono riportate nella fig.11.

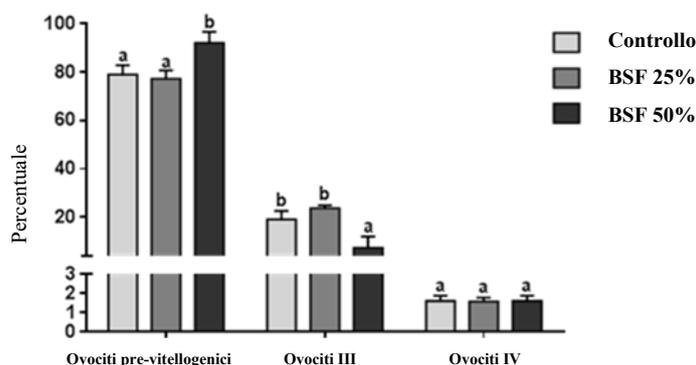


Fig. 10: Conta degli ovociti pre-vitellogeni, in stadio III e IV nei tre gruppi sperimentali. Le lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0,05$). I valori sono presentati come media + deviazione standard.

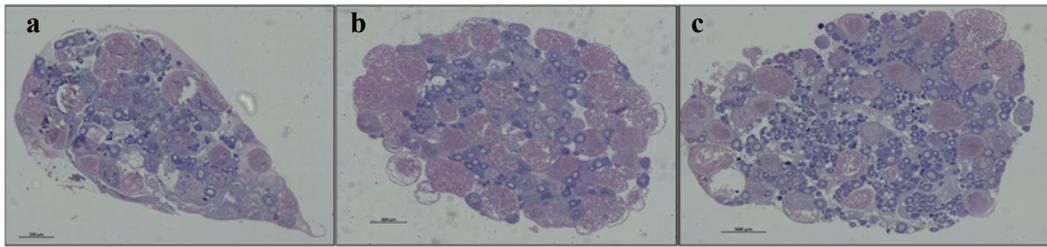


Fig. 11: Immagini in ematossilina-eosina di sezioni di ovari dei tre gruppi sperimentali: (a) gruppo di controllo; (b): gruppo BSF 25%, includente 25% di farina di BSF; (c): gruppo BSF 50%, includente 50% di farina di BSF).

4.6 Spettroscopia infrarossa in trasformata di Fourier

Per quanto riguarda la composizione biochimica dei campioni di ovari di zebrafish appartenenti ai tre gruppi sperimentali, possono essere fatte le seguenti considerazioni:

Negli ovociti in stadio III è stata rilevata una quantità significativamente maggiore ($p < 0,05$) dei lipidi totali (LIP) nel gruppo BSF 50% in confronto al gruppo di controllo e al gruppo BSF 25% (Fig. 12a). Per quanto riguarda gli acidi grassi (FA), i valori riscontrati nei gruppi BSF 25% e BSF 50% sono significativamente più alti ($p < 0,05$) rispetto al controllo. Riguardo alle proteine (PRT), il gruppo BSF 50% ha valori significativamente più bassi ($p < 0,05$) dei gruppi controllo e BSF 25% (Fig. 12a). L'analisi dei gruppi COO- (rappresentativi degli amminoacidi) ha mostrato valori significativamente più bassi ($p < 0,05$) nel gruppo BSF 50% rispetto agli altri due gruppi, di controllo e BSF 25%. I gruppi CH₂ (rappresentativi del grado di saturazione delle catene

alchiliche degli acidi grassi) sono risultati significativamente più alti ($p < 0,05$) nel gruppo BSF 25%, rispetto ai gruppi di controllo e BSF 50%. I gruppi PH_2 (rappresentativi dei fosfati e dei carboidrati) hanno presentato valori significativamente più alti ($p < 0,05$) nel gruppo BSF 50%, rispetto agli altri due gruppi.

Negli ovociti in stadio IV è stata riscontrata una quantità significativamente maggiore ($p < 0,05$) dei lipidi totali e degli acidi grassi nel gruppo BSF 50%, rispetto ai gruppi di controllo e BSF 50% (Fig.12b). Le proteine sono risultate significativamente più alte ($p < 0,05$) nei gruppi di controllo e BSF 25%, rispetto al gruppo BSF 50% (Fig. 12b). L'analisi dei gruppi COO^- (rappresentativi degli amminoacidi) ha mostrato valori significativamente maggiori ($p < 0,05$) nel gruppo di controllo rispetto ai gruppi BSF 25 e BSF 50%. Nei gruppi CH_2 , PH_2 e COH (acidi grassi saturi o insaturi con almeno 4 atomi di carbonio) non vi sono state differenze tra i tre gruppi sperimentali ($p > 0,05$) (Fig. 12b).

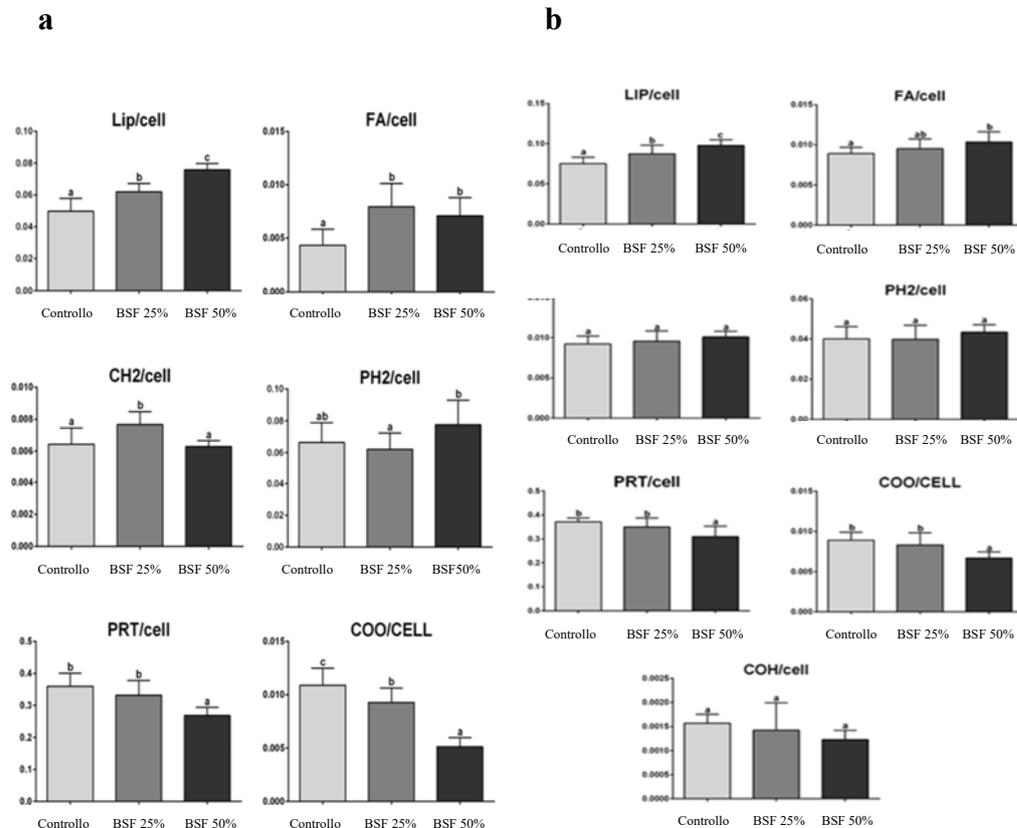


Fig. 12: Analisi semiquantitativa della composizione biochimica degli ovociti di stadio III (a) e IV (b) dei gruppi di controllo, BSF 25% e BSF 50%. Le lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0,05$). I valori sono presentati come media \pm deviazione standard.

4.7 Real-Time PCR

L'indagine, eseguita su campioni di fegato prelevati dai tre gruppi sperimentali, ha evidenziato un significativo incremento ($p < 0,05$) dell'espressione dei geni *elovl2*, *elovl5* e *fads2* nei campioni del gruppo BSF 50% rispetto al gruppo di controllo e al gruppo BSF 25%, tra i quali non vi è differenza (Fig.13). Questo dato concorda con i dati emersi dall'analisi del contenuto e della composizione degli acidi grassi che ha mostrato una riduzione della differenza tra SFA e

PUFA nelle femmine di zebrafish e nelle uova ovulate. Ciò è in accordo con la maggiore espressione genica dei geni coinvolti nella elongazione e desaturazione degli acidi grassi essenziali.

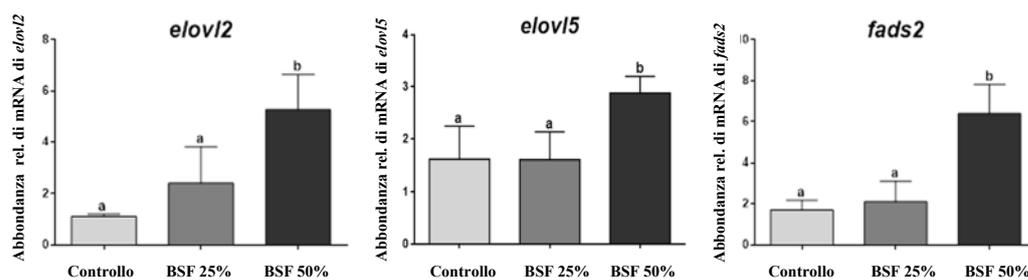


Fig. 13: Livelli relativi di mRNA dei geni *elovl2*, *elovl5* e *fads2*. Le lettere differenti indicano differenze significative tra i gruppi sperimentali ($p < 0,05$). I valori sono presentati come media \pm deviazione standard.

5. DISCUSSIONE

L'acquacoltura è uno dei settori zootecnici che negli ultimi decenni ha fatto registrare il maggiore sviluppo a livello mondiale (FAO, 2016). In tale settore si usano farine e oli di pesce perché essi, da una parte, garantiscono il corretto apporto proteico e, dall'altra, forniscono gli acidi grassi n3 necessari allo sviluppo e al benessere animale (Gomez, 2019). La qualità dell'alimentazione è determinante per la capacità riproduttiva dei pesci allevati e ciò ha una grande importanza in acquacoltura ai fini della produzione continua di uova e quindi di giovanili. Per quanto riguarda le proteine, un apporto proteico di almeno 400 g. kg⁻¹ consente migliori tassi di fecondità, peso degli ovari, numero di uova, produzione media di avannotti, rispetto a pesci alimentati con diete contenenti meno proteine (Chong et al., 2004; Kithsiri et al., 2010). Tuttavia, il profilo lipidico presente nella dieta è il fattore che più incide sull'efficienza della riproduzione delle specie allevate. In particolare il profilo lipidico è determinante sul tasso di fecondazione, come riportato nel pesce coniglio (*Siganus guttatus*) e nell' orata (*Sparus aurata*), sulla qualità dello sperma della trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) e sull'incorporazione degli HUFA n3 nelle uova della spigola (*Dicentrarchus labrax*) (Duray et al., 1994; Fernandez-Palacios et al., 1995; Navas et al., 1996; Fernandez-Palacios et al., 1997). Newman et al. (2016) hanno riscontrato che il successo riproduttivo dello

zebrafish (*Danio rerio*) si correla con la qualità e la quantità dell'alimentazione, indicando che la dieta non solo deve essere corretta in termini di profilo proteico e lipidico, ma anche che la razione quotidiana non dovrebbe essere inferiore a 300 g. kg⁻¹. Al di sotto di tale soglia, infatti, vi è una minor produzione di uova da parte delle femmine malnutrite.

Nel presente studio sono stati valutati, per la prima volta, gli effetti dell'alimentazione con diete includenti quantità del 25% e 50% di prepupe di *Hermetia illucens*, sulla crescita e sulla riproduzione degli zebrafish allevati con tali diete per 12 mesi.

I risultati biometrici del presente studio hanno evidenziato un ritardo di crescita delle femmine adulte di zebrafish alimentate con la dieta includente farina di *Hermetia illucens* (BSF) al 50%, rispetto agli esemplari alimentati con la dieta di controllo e con la dieta includente BSF al 25%. Ciò può essere interpretato, verosimilmente, come una conseguenza della differente composizione lipidica delle tre diete sperimentali e dell'importante dispendio energetico richiesto dai processi biochimici di conversione lipidica, di cui si parlerà in dettaglio più avanti, che hanno interessato maggiormente gli zebrafish del gruppo sperimentale BSF 50%.

Tuttavia, l'indice gonadosomatico non ha mostrato differenze sostanziali nei tre gruppi sperimentali, evidenziando la possibilità di un corretto sviluppo dell'ovario, indipendentemente dal tipo di dieta.

Il dispendio energetico legato alle conversioni lipidiche ha comportato anche una minore produzione di uova da parte del gruppo di femmine adulte di zebrafish alimentate con la dieta a più alto contenuto di farina di BSF.

In questo gruppo, le indagini istologiche eseguite sugli ovari hanno riscontrato un aumento significativo degli ovociti pre-vitellogenici e un parallelo decremento degli ovociti in stadio III. Tuttavia, non si sono riscontrate differenze nei tre gruppi sperimentali riguardo al numero di ovociti in stadio IV.

Questo risultato potrebbe riflettere, da un lato, un ritardo legato al consumo energetico correlato alle attività di bio-conversione lipidica, dall'altro la difficoltà materna nell'ottenere dall'alimentazione ricevuta macromolecole adeguate da inserire negli ovociti durante la vitellogenesi.

Nel presente studio il profilo lipidico delle diete includenti farina di BSF ha mostrato differenze significative rispetto a quello del mangime della dieta di controllo, con incremento degli acidi grassi saturi e diminuzione dei PUFA all'aumentare dell'inclusione di BSF (Zarantoniello, 2018).

In effetti, l'aspetto che maggiormente differenzia il profilo nutrizionale del mangime tradizionale contenente farine e oli di pesce è proprio il profilo lipidico. I lipidi sono la principale fonte energetica per il metabolismo cellulare nonché fonte di acidi grassi insaturi. Di conseguenza, un aspetto cruciale della dieta è rappresentato dalla presenza di livelli adeguati di acidi grassi insaturi (HUFA), inclusi l'EPA e il DHA (Sargent, 1997; Halver, 2002).

In una certa misura, il profilo lipidico delle femmine adulte di zebrafish riflette il profilo lipidico dei mangimi con cui sono state nutrite. Tuttavia, si è osservata una riduzione delle differenze tra i gruppi considerando le femmine adulte di zebrafish, in particolare per quanto riguarda i PUFA e gli acidi grassi n3.

Nei pesci d'acqua dolce, il deficit di HUFA e/o PUFA può stimolare meccanismi adattativi inducenti l'azione di enzimi quali le elongasi e le desaturasi, che possono modificare la lunghezza e il grado di insaturazione delle catene degli acidi grassi. Le elongasi (elovl) sono enzimi necessari per la biosintesi degli acidi grassi polinsaturi a catena molto lunga (VLCFA) (Nugteren, 1965). Elov15 di zebrafish è in grado di allungare efficientemente i PUFA C18 tra cui l'acido α -linolenico (ALA), l'acido γ -linolenico (GLA), l'acido eicosapentaenoico (EPA) e l'acido arachidonico (ARA) (Agaba et al., 2005). Elov12 ha grande importanza in quanto, sebbene l'EPA e l'acido eicosatetraenoico (ETA) siano anche substrati di Elov15, l'acido

docosapentaenoico (DPA) e l'acido adrenico (22: 4n-6) vengono convertiti in modo efficiente solo da *elovl2*. Le desaturasi (*fads*) dei pesci mostrano funzionalità molteplici. In dettaglio, l'azione della desaturasi $\Delta 6$ comporta le desaturazioni dell'acido linoleico (18: 2 n6) in acido γ -linolenico (18: 3 n6) e dell'acido α -linolenico (18: 3 n3) in acido stearidonico (18: 4 n3). La desaturasi $\Delta 5$ desatura l'acido diomo- γ -linolenico (20: 3 n6) in acido arachidonico (20: 4 n6) e l'acido eicosatetraenoico (20: 4 n3) in acido eicosapentaenoico (20: 5 n3). Nello zebrafish è stata descritta la prima desaturasi bifunzionale $\Delta 6/\Delta 5$, in grado di desaturare substrati di acidi grassi C18 e C24, suggerendo che lo stesso enzima possa intervenire in più passaggi metabolici (Tocher et al., 2003).

Nel presente studio tutto ciò è supportato dall'incremento significativo dell'espressione dei geni *elovl2*, *elovl5* e *fads2* osservato nel gruppo alimentato con dieta BSF 50%. In particolare l'incremento di *elovl2* e *elovl5* ha comportato una riduzione delle differenze del contenuto in PUFA tra gli zebrafish alimentati con BSF 50% e quelli alimentati con la dieta di controllo. Il permanere di una differenza potrebbe essere attribuito al contenuto globale di PUFA C18, che è stato significativamente inferiore nella dieta BSF 50%, rispetto alla dieta di controllo. Anche l'incremento di *fads2*, negli zebrafish alimentati con la dieta BSF 50%, si può spiegare, almeno in parte, con i contenuti significativamente differenti in substrati delle desaturasi $\Delta 6/\Delta 5$ quali

l'acido linoleico, l'acido γ -linolenico e il diomo- γ -linolenico tra la dieta di controllo e la dieta BSF 50%. Questi risultati suggeriscono che nelle femmine adulte di zebrafish si siano attivati processi di neo-sintesi di HUFA tesi a favorire il processo maturativo degli ovociti.

L'analisi del contenuto e della composizione lipidica delle uova ovulate ha evidenziato una ulteriore riduzione dello sbilanciamento delle classi lipidiche tra i gruppi alimentati con diete BSF e il gruppo della dieta di controllo, soprattutto dei PUFA, in particolare degli acidi grassi $n3$ e del rapporto $n6/n3$. Questo riscontro avvalora ulteriormente l'avvenuta attivazione dei meccanismi di conversione lipidica e anche l'accumulo negli ovociti dei PUFA neo-sintetizzati, a conferma dell'orientamento selettivo verso l'ovogenesi (Labbe et al., 1993; Salze et al., 2005; Lazzarotto et al., 2015). In accordo a questo dato vi sono i risultati dell'analisi spettroscopica FT-IR che ha mostrato che le differenze delle varie macromolecole analizzate si fanno meno evidenti passando dagli ovociti in stadio III a quelli in stadio IV.

Questi risultati suggeriscono che l'alimentazione includente farina di BSF in quantità superiori al 25% possa penalizzare lo sviluppo ovocitario sotto l'aspetto quantitativo ma non qualitativo. Questo risultato probabilmente lascia intendere che le femmine adulte di zebrafish, nutrite con la dieta includente farina di BSF al 50%, sono in grado di produrre un numero inferiore di uova,

ma la loro qualità in termini di profilo lipidico è comunque garantita. Tuttavia, per poter confermare questo presupposto sono necessarie ulteriori analisi riguardo ai tassi di schiusa e al corretto sviluppo delle larve.

6. CONCLUSIONI

I risultati a lungo termine del presente studio sono incoraggianti e inducono a proseguire le ricerche sull'alimentazione con mangimi includenti farine d'insetto.

L'inclusione di farina di BSF in quantità del 25% appare adeguata per una corretta crescita e una buona attività riproduttiva. Tuttavia, la possibilità di incrementare le percentuali di inclusione di farina di BSF richiede ulteriori sforzi tesi al miglioramento del profilo lipidico delle farine dell'insetto, al fine di poter ottimizzare le richieste nutrizionali dei pesci allevati.

7. **BIBLIOGRAFIA**

Agaba MK., Tocher DR, Zheng X, Dickson CA., Dick J R. and Alan J. Teale. (2005). Cloning and functional characterisation of polyunsaturated fatty acid elongases of marine and freshwater teleost fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 142, 342-52

Akiyama D.M. (1988). Soybean meal utilization in fish feeds. Paper presented at the Korean Feed Association Conference, Seoul, Korea, August, pp 12.

Asturiano J.F., Sorbera L.A., Zanuy S., Carrillo M. (2000). Effects of polyunsaturated fatty acids and gonadotropin on prostaglandin series e production in a primary testis cell culture system for the European sea bass. *J. Fish Biol.* 57, 1563–1574.

Badwy T. M., Ibrahim E. M., Zeinhom M. M. (2008). Partial replacement of fish meal with dried microalga (*Chlorella* spp. and *Scenedesmus* spp.) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) diets. Editors : Elghobashy, H.; Fitzsimmons, K.; Diab, A. S. Conference paper : From the pharaohs to the future. Eighth International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Proceedings pp.801-811.

Barroso F.G., De Haro C., Sánchez-Muros M.-J., Venegas E., et al., (2014). The potential of various insect species for use as food for fish. *Aquaculture* 422–423, 193–201.

Belghit I, Liland NS, Waagbø R, Biancarosa I, Pelusioc N, Lid Y, Krogdahld Å, Lock EJ. (2018). Potential of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* 491, 72-81.

Borgogno M., Dinnella C., Laconisi V., Fusi R., et al., (2017). Inclusion of *Hermetia illucens* larvae meal on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) feed: effect on sensory profile according to static and dynamic evaluations. *J. Sci. Food Agric.* <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8191>.

Borowitzka MA.(1997). Microalgae for aquaculture: Opportunities and constraints. *Journal of Applied* 9, 393.

Bradley SW, Sheppard DC (1984). House fly oviposition inhibition by larvae of *Hermetia illucens*, the black soldier fly. *J Chem Ecol.* 10, 853-9.

Brown M R. (2002). Nutritional Value and Use of Microalgae in Aquaculture. <https://www.uanl.mx/utilerias/nutricion acuicola/VI/archivos/A19.pdf>

Carnevali O, Cionna C, Tosti L, Lubzens E, Maradonna F. (2006). Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *Gen Comp Endocrinol.* 146,195-203.

Castranova C, Lawton A, Lawrence C, Baumann D, Best J, Coscolla J, et al. (2011). The effect of stocking densities on reproductive performance in laboratory zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish*;3:141–146.

Čičková H., Newton G.L., Lacy R.C., Kozánek, M., (2015). The use of fly larvae for organic waste treatment. *Waste Manag.* 35, 68–80.

Chong A.S.C., Ishak S.D., Osman Z. & Hashim R. (2004). Effect of dietary protein level on the reproductive performance of female swordtails *Xiphophorus helleri* (Poeciliidae). *Aquaculture*, 234, 381–392.

Connolly MH, Dutkosky RM, Heah TP, Saylor GS, Henry TB. (2014). Temporal dynamics of oocyte growth and vitellogenin gene expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish.* 2,107-14.

Cruz-Suárez LE, León A, Peña-Rodríguez A et al. (2010.) Shrimp/*Ulva* co-culture: A sustainable alternative to diminish the need for artificial feed and improve shrimp quality. *Aquaculture* 301, 64–68.

Daniel NA. (2018). Review on replacing fish meal in aqua feeds using plant protein sources. *Int. J. Fish. Aquat. Stud.* 6, 164–179.

- Danulat E.** (1986). The effects of various diets on chitinase and β -glucosidase activities and the condition of cod, *Gadus morhua* (L.) *Journal of Fish Biology*. 28, 191-197.
- da Silva F F.G.,** Støttrup J G, Kjørsvikb E, Tveitenc H, Tomkiewicz J (2016). Interactive effects of dietary composition and hormonal treatment on reproductive development of cultured female European eel, *Anguilla Anguilla*. *Animal Reproduction Science* 171, 17–26.
- Diener S,** Nandayure M, Solano NMS , Gutierrez F R, Zurbrugg C , Tockner K (2011). Biological Treatment of Municipal Organic Waste using Black Soldier Fly Larvae. *Waste Biomass Valor* 2,357–363.
- Dockser A.** (2012). "Birds Do It, Bees Do It, Even Zebrafish Do It—Just Too Little". *Wall Street Journal*. February 11, 2012.
- Duan C,** Plisetskaya EM. (1993). Nutritional regulation of insulin-like growth factor-1mRNA expression in salmon tissues. *Journal of Endocrinology* 139, 243-252.
- Duray M.,** Kohno H., Pascual F. (1994). The effect of lipid enriched broodstock diets on spawning and on egg and larval quality of hatchery-bred rabbitfish *Siganus guttatus*. *Philipp. Sci.* 31, 42–57.
- EFSA** (2016):The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015 *EFSA Journal*;14, 4634.
- Esteban MA,** Cuesta A, Ortuno J, Meseguer J. (2001). Immunomodulatory effects of dietary intake of chitin on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system- *Fish & shellfish immunology* 11, 303 -315.
- FAO** (2009). Ecosystem approach to fisheries and aquaculture: Implementing the FAO Code of Conduct for Responsible Fisheries. <http://www.fao.org/docrep/012/i0964e/i0964e00.htm>
- FAO** (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture 2018 - Meeting the sustainable development goals. Rome 2018.
- FAO Booklet** (2016): The state of food and agriculture climate change, agriculture and food security. <http://www.fao.org/3/a-i6030e.pdf>
- Fernandez-Palacios H.,** Izquierdo M.S., Robaina L., Valencia A., Salhi M., Vergara J. (1995). Effect of n3 HUFA level in broodstock diets on egg quality of gilthead seabream (*Sparus aurata* L) *Aquaculture* 132, 325–337.
- Fernandez-Palacios, H.,** Izquierdo M., Robaina L., Valencia A., Salhi M., Montero D., 1997. The effect of dietary protein and lipid from squid and fish meals on egg quality of broodstock for Gilthead seabream *Sparus aurata*. *Aquaculture* 148, 233–246.
- Fernandez-Palacios H.,** Izquierdo M.S., Gonzalez M., Robaina L., Valencia, A. (1998). Combined effect of dietary α -tocopherol and n3 HUFA on egg quality of gilthead seabream broodstock *Sparus aurata*. *Aquaculture* 161, 475–476.
- Ferrarezi R,** Cannella L et al. (2016). UVI/AES Annual Report 2016 - Alternative Sources of Food for Aquaponics in the U.S. Virgin Islands: A Case Study with Black Soldier Flies. *UVI/AES Annual Report 2016*.
- Fleurence J.,** Morancais M., Dumay J., Decottignies P., Turpin V., Munier M., Garcia-Bueno N. and Jaouen P. (2012). What Are the Prospects for Using Seaweed in Human Nutrition and for Marine Animals Raised through Aquaculture? *Trends in Food Science and Technology* 27, 57-61.
- Gatlin III, D.M.,** Barrows F.T., Brown P., Dabrowski K., Gaylord T.G., Hardy R.W., Herman E., Hu G., Krogdahl., Nelson R., Overturf K., Rust M., Sealey W., Skonberg D., Souza E., Stone D., Wilson R. and

- Wurtele E. (2007). Expanding the utilization of sustainable plant products in aquafeeds—A review. *Aquaculture Research*, 38, 551-579.
- Gerlach G**, Lysiak N. (2006). Kin recognition and inbreeding avoidance in zebrafish, *Danio rerio*, is based on phenotype matching. *Anim Behav* 6,1371–1377.
- Glencross B. D.** (2009). Exploring the nutritional demand for essential fatty acids by aquaculture species. *Rev. Aquacult.* 1, 71–124.
- Gómez B**, Munekata P. E.S., Zhuc Z., Barbad FJ, Toldráe F, Putnikf P, Bursa D, Kovacevic DB., Lorenzo J M. (2019). Challenges and opportunities regarding the use of alternative protein sources: Aquaculture and insects. *Advances in Food and Nutrition Research*. ISSN 1043-4526.
- Gomez-Requeni P.**, Mingarro M., Calduch-Giner J. A, Medale F., Martin SAM, Houlihan D FJKaushik, S. J., Perez-Sanchez J (2004). Protein growth performance, amino acid utilisation and somatotropic axis responsiveness to fish meal replacement by plant protein sources in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 232, 493-510.
- Gutowska MA**, Drazen JC, Robison BH. (2004). Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 139, 351-358.
- Halver J.E.** and Hardy, R.W. (2002). Fish Nutrition. In: Sargent, J.R., Tocher, D.R. and Bell, G., Eds., *The Lipids*, 3rd Edition, Academic Press, California, 182-246.
- Hara A.** and Hirai H. (1978). Comparative studies on immunochemical properties of female-specific serum protein and egg yolk proteins in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol*. 48B: 389–399.
- Hart N.H.**, Yu S.-F., and Greenhut V.A. (1977). Observations on the cortical reaction in eggs of *Brachydanio rerio* as seen with the scanning electron microscope. *J.Exp. Zool.* 201, 325-331.
- Hart N.H.** (1990). Fertilization in teleost fishes: mechanisms of sperm-egg interactions. *Int. Rev. Cytol.* 121, 1-66.
- Hart N.H.**, Becker K.A., and Wolenski J.S. (1992). The sperm entry site during fertilization of the zebrafish egg: localization of actin. *Mol. Reprod. Dev.* 32, 217-228.
- Henry M.**, Gasco L., Piccolo G., Fountoulaki E. (2015). Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. *Anim. Feed Sci. Technol.* 203, 1–22.
- Hisaoka K.K.**, and C.F. Firlit (1962). The localization of nucleic acids during oogenesis in the zebrafish. *Am. J. Anat.* 110, 203-216.
- Iaconisi V.**, Marono S., Parisi G., Gasco L., et al. (2017). Dietary inclusion of *Tenebrio molitor* larvae meal: effects on growth performance and final quality traits of blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Aquaculture* 476, 49–58.
- Ikeda M**, Kakizaki H, Matsumiya M. (2017). Biochemistry of fish stomach chitinase. *Int J Biol Macromol.* 104, 1672-168.
- Izquierdo M.**, Fernandez-Palacios, H. (1997). Nutritional requirements of marine fish larvae and broodstock. *Cah. Options Mediterr.* 22, 243–264.
- Izquierdo M.**, Fernandez-Palacios H., Tacon A.G.J. (2001). Effect of broodstock nutrition on reproductive performance of fish. *Aquaculture* 197, 25–42.

- Ji K**, Liu X, Lee S, Kanga S, Kho Y, Giesy J P., Choi K. (2013). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on hormones and genes of the hypothalamic-pituitary-gonad axis, and reproduction of zebrafish. *Journal of Hazardous Materials* 254–255, 242–251.
- Kalueff A**, Gebhardt M, Stewart A, Cachat J, Brimmer M, Chawla J, et al. (2013). Toward a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. *Zebrafish Neuroscience Research Consortium (ZNRC). Zebrafish*;10:70–86.
- Karga J**, Mandal SC. (2017). Effect of different feeds on the growth, survival and reproductive performance of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822). *Aquaculture nutrition* 23, 406-413.
- Khan F R** and Alhewairini SS. (2018). Zebrafish (*Danio rerio*) as a Model Organism Current Trends in Cancer Management. DOI: 10.5772/intechopen.81517
- Kessel R.G.**, Tung H.N., Roberts R., and Beams H.W. (1985b). The presence and distribution of gap junctions in the oocyte-follicle cell complex of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Submicrosc. Cytol.* 17, 239-253.
- Kessel R.G.**, Roberts R.L., and Tung H.N. (1988). Intercellular junctions in the follicular envelope of the teleost, *Brachydanio rerio*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 20,415-424.
- Kithsiri H.M.P.**, Sharma P., Zaidi S.G.S., Pal A.K. & Venkateshwarlu G. (2010) Growth and reproductive performance of female guppy, *Poecilia reticulata* fed diets with different nutrient levels. *Indian J. Fish.* 57, 65–71.
- Koch B E.V.**, Stougaard J, Spaink HP. (2014). Spatial and temporal expression patterns of chitinase genes in developing zebrafish embryos. *Gene Expression patterns* 14, 69-77.
- Kroeckel S.**, Harjes A.G.E., Roth I., Katz H. et al. (2012). When a turbot catches a fly: evaluation of a prepupae meal of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) as fish meal substitute — growth performance and chitin degradation in juvenile turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 364, 345–352.
- Kroghal Å.**, Hemre G. I., Mommsen T.P. (2005). Carbohydrates in fish nutrition: digestion and absorption in postlarval stages. *Aquaculture Nutrition* 11, 103-122.
- Labbe C.**, Loir, M., Kaushik S., Maisse G. (1993). The influence of both rearing and dietary lipid origin on fatty acid composition of spermatozoan polar lipids in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Effect on sperm cryopreservation tolerance. *Fish Nutrition in Practice, Biarritz France.*, June 24–27, 1991. Ed. INRA, Paris Les Colloques, 61, 49–59.
- Lambert J.G.D.** (1978) Steroidogenesis in the ovary of *Brachydanio rerio* (Teleostei). In P.J. Gaillard and H.H. Boer (eds): *Comparative Endocrinology*. Amsterdam Elsevier North-Holland Biomedical Press, pp. 65-68.
- Lawrence C.** (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): a review. *Aquaculture* 1, 1–20.
- Lawrence C.**, Best J, James A, Maloney K. (2012). The effects of feeding frequency on growth and reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquaculture* 368, 103–108.
- Lazzarotto V**, Corraze G, Leprevost A, Quillet E, Dupont-Nivet M, Médale F (2015). Three-Year Breeding Cycle of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fed a Plant-Based Diet, Totally Free of Marine Resources: Consequences for Reproduction, Fatty Acid Composition and Progeny Survival. *PLoS ONE* 10 (2).
- Lee SM**, Lee JH, Kim KD. (2003). Effect of dietary essential fatty acids on growth, body composition and blood chemistry of juvenile starry flounder (*Platichthys stellatus*) *Aquaculture* 225, 269-281.

- Le Menn F.**, Davail, B., Pelisero C., Ndiaye P., Bon E., Perazzolo L. and Nunez Rodriguez J. (1999). A new approach to fish oocyte vitellogenesis. In: Proceedings of the Sixth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. pp. 281–282. Edited by B. Norberg, O.S. Kjesbu, G.L. Taranger, E. Andersson and S.O. Stefansson. Institute of Marine Research and University of Bergen, Bergen, Norway.
- Li S.**, Ji H., Zhang B., Zhou J. et al. (2017). Defatted black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae meal in diets for juvenile Jian carp (*Cyprinus carpio* var. Jian): growth performance, antioxidant enzyme activities, digestive enzyme activities, intestine and hepatopancreas histological structure. *Aquaculture* 477, 62–70.
- Liener I.E.** (1980). Factors affecting the nutritional quality of soya products. *Journal of the American Oil Chemists Society* 58, 406 – 415.
- Lim C.** and Akiyama D.M. (1989). Full-fat soybean meal utilization by fish. in: Proceedings of the People's Republic of China Aquaculture and Feed Workshop, D.M. Akiyama, Ed., American Soybean Association publication, pp. 164 - 188.
- Lock E.**, Arsiwalla T., Waagbø R. (2016). Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) post smolt. *Aquac. Nutr.* 22, 1202–1213.
- Lubzens E.**, Young G, Bobe J, Cerdà J. (2010). Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *General and Comparative Endocrinology* 165, 367–389.
- Lubzens E.**, Bobe J, Young G. Sullivan CV. (2016). Maternal investment in fish oocytes and eggs: The molecular cargo and its contributions to fertility and early development. *Aquaculture* xxx (2016),1-37.
- Magalhães R.**, Sánchez-López A., Leal R.S., Martínez-Llorens S. et al., 2017. Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 476, 79–85.
- McBride RS.**, Somarakis S, Fitzhugh GR, Albert A, Yaragina NA, Wuenschel MJ, Alonso Fernández A, Basilone G. (2015). Energy acquisition and allocation to egg production in relation to fish reproductive strategies. *Fish and Fisheries*. 16, 23-57
- Mehrad B.**, Jafaryan H and Mehdi Taati M. (2012). Assessment of the effects of dietary vitamin E on growth performance and reproduction of zebrafish, *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae *Journal of Oceanography and Marine Science* 3, 1-7.
- Meneguz M.**, Schiavone A, Gai F, Dama A, Lussiana C, Renna M, Gasco L. (2018). Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *J. Sci. Food Agric.* 98, 5776–5784.
- Merrifield DL.** Olsen R, Myklebust R, Ringo E. (2011). Dietary Effect of Soybean (*Glycine max*) Products on Gut Histology and Microbiota of Fish, *Soybean and Nutrition*, Prof. Hany El-Shemy (Ed.), ISBN: 978-953-307-536-5, In Tech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/soybean-and-nutrition/dietary-effect-of-soybean-glycine-max-products-on-gut-histology-and-microbiota-of-fish>.
- Merzendorfer H.**, Zimoch L. (2003). Chitin metabolism in insects: structure, function and regulation of chitin synthases and chitinases. *J Exp Biol.* 206, 4393-4412.
- Moretz J.**, Martins E, Robison B. (2007). Behavioral syndromes and the evolution of correlated behavior in zebrafish. *Behav Ecol* 3,556–562.
- Moriyama S.**, Ayson F. G., & Kawauchi H. (2000). Growth regulation by insulin-like growth factor-I in fish. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 64, 1553-1562.
- Moore P.K.** (1995). Prostanoids: Pharmacological, Physiological and Clinical Relevance. Cambridge Univ. Press, Cambridge.

- Mulligan B.**, Trushenski J. (2013). Use of standard or modified plant-derived lipids as alternatives to fish oil in feeds for juvenile Nile tilapia. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 22, 47-57.
- Nagahama Y.** (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *Int. J. Dev. Biol.* 38,217 – 229.
- Nasiadka A**, Clark M. (2012). Zebrafish breeding in the laboratory environment. *Inst Lab Anim Res* 2,161–168.
- Navas J.M.**, Trush M., Ramos J., Bruce M., Carrillo M., Zanuy S., Bromage N., (1996) . The effect of seasonal alteration in the lipid composition of broodstock diets on egg quality in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*.. *Proc. V Int. Symp. Rep. Physiol. Fish. Austin, TX, 2–8 July 1995*, pp. 108–110.
- Newman T.**, Jhin, N., Meier M., Horsfield J.(2016). Dietary Intake Influences Adult Fertility and Offspring Fitness in Zebrafish. *PLoS One* 11: e0166394
- Newton GL**, Sheppard DC et al. (2005). Using the Black Soldier, *Hermetia illucens*, as a value- added tool for the management of swine manure. *Animal and poultry Waste Management Centre, North Carolina state University, Raleigh, NC; USA*
- Ng W. K.**, Liew FL, Ang LP, Wong KW. (2002). Potential of mealworm (*Tenebrio molitor*) as an alternative protein source in practical diets for African catfish, *Clarias gariepinus*. *Aquaculture Research* 32, 273-280.
- Nguyen T.T.X.**, Tomberlin J.K., Vanlaerhoven S. (2015). Ability of black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) larvae to recycle food waste. *Environ. Entomol.* 44, 406–410.
- Nugteren DH.** (1965). The enzymic chain elongation of fatty acids by rat-liver microsomes. *Biochim Biophys Acta.* 106:280-90.
- O' Keefe T.** (2003). *Plant Protein Ingredients for Aquaculture Feeds: Use Considerations & Quality Standards.* soyaqua.org.
- Oliveira F**, Doelle K, List R, O'Reilly JR (2015). Assessment of Diptera: Stratiomyidae, genus *Hermetia illucens* (L., 1758) using electron microscopy. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 3, 147-152.
- Parker M**, Millington M, Combe F, Brennan C.E. (2012). Housing conditions differentially affect physiological and behavioral stress responses of zebrafish, as well as the response to anxiolytics. *PLoS One*;4:e34992.
- Patiño R.** and Takashima F. (1995). The gonads. In: *An Atlas of Fish Histology: Normal and Pathological Features*, Chapter 9, 2ndEdition. Edited by F. Takashima and T. Hibiya. Kodansha/Gustav Fischer Verlag; Tokyo/New York.
- Patiño R.** & Sullivan CV. (2002). Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry* 26, 57–70.
- Piccolo G**, Marono S, Gasco L. et al (2014).Use of *Tenebrio molitor* larvae meal in diets for Gilthead seabream *Sparus aurata* juveniles. *Insect to feed the World, The Netherlands*, 14-17.
- Premalatha M**, Abbasi T, Abbasi T, Abbasi SA. (2011). Energy efficient food production to reduce global warming and eco degradation: The use of edible insects. *Renew Sustain Energy Rev.*15,4357–4360.
- Ramsay J**, Feist G, Varga Z, Westerfield M, Kent M, Schreck C. (2006). Whole-body cortisol is an indicator of crowding stress in adult Zebrafish, *Danio rerio*. *Aquaculture* 1– 4:565–574.
- Ramezani-Fard E.** , Kamarudin M. S. and Harmin S A. (2013). Endocrine Control of Oogenesis in Teleosts. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances.* 8, 205-21.

- Reed B.**, Jennings M. (2010). Guidance on the housing and care of Zebrafish (*Danio rerio*). RSPCA Southwather, West Sussex, UK.
- Refsstie S.**, B. Svihus, K.D. Shearer, and T. Storebakken. (1999). Nutrient digestibility in Atlantic salmon and broiler chickens related to viscosity and non-starch polysaccharide content in different soybean products. *Animal Feed Science Technology*, 79: 331 - 345.
- Reinecke M.**, Björnsson BT, Dickhoff WW, McCormick SD, Navarro I, Power DM, Gutiérrez J. (2005). Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: where we are and where to go. *Gen Comp Endocrinol.*142, 20-24.
- Rimoldi S.**, Terova G, Ascione C, Giannico R, Brambilla F. (2018). Next generation sequencing for gut microbiome characterization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed animal by-product meals as an alternative to fishmeal protein sources. *PLoS One*. Mar 6;13(3).
- Rizwan M.**, Mujtab G, Memon SA, Leed K, Rashid N. (2018). Exploring the potential of microalgae for new biotechnology applications and beyond: A review *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 92, 394–404.
- Robin JH.**, Skalli A. (2007). Incorporation of dietary fatty acid in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) - A methodological approach evidencing losses of highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture* 263,227–237.
- Rosenfeld H.**, Meiri I, Elizur A. (2007). Gonadotropic regulation of oocyte development. In: *The Fish Oocyte*, 175-202.
- Rust M.B.** (2002). Nutritional physiology. In: Halver J.E., Hardy R.W.(Eds.), *Fish Nutrition*. The Academic Press, New York, USA, 368–446.
- Salze G.**, Tocher DR, Roy WJ, Robertson DA. (2005). Egg quality determinants in cod (*Gadus morhua* L.): egg performance and lipids in eggs from farmed and wild broodstock. *Aquaculture Research* 36, 1488–1499.
- Sargent JR.**, McEvoy LA, Bell JG. (1997). Requirements, presentation and sources of polyunsaturated fatty acids in marine fish larval feeds. *Aquaculture*155, 117–127.
- Sasayama Y.**, Takahashi H. (1972). Effect of starvation and unilateral castration in male goldfish, *Carassius auratus*, and a design of bioassay for fish gonadotropin using starved goldfish. *Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ.* 22, 267–283.
- Seilliez I.**, Panserat S, Corraze G, Kaushik S, Bergot P. (2003). Cloning and nutritional regulation of a D6-desaturase-like enzyme in the marine teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol.* 135,449–460.
- Selman K.**, Wallace RA, Sarka A, Xiaoping Q (1993). Stages of Oocyte Development in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Journal of morphology* 218:203-224.
- St-Hilaire S.**, Cranfill K, McGuire M. (2007). Fish offal recycling by the black soldier fly produces a feedstuff high in omega-3 fatty acids. *J World* 38, 309–313.
- St-Hilaire S.**, Sheppard C., Tomberlin J.K., Irving S. et al., (2007). Fly prepupae as a feedstuff for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. World Aquac. Soc.* 38, 59–67.
- Sánchez-Muros M.J.**, Barroso F.G., Manzano-Agugliaro F. (2014). Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *J. Cleaner Production* 65, 16–27.
- Selman K.**, and Wallace R.A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zool. Sci.* 6, 211-231.

- Sheppard C.** (1983). House fly and lesser fly control utilizing the black soldier fly in manure management systems for caged laying hens. *Environmental entomology* 12, 1439-1442.
- Shields R J.** and Lupatsch I. (2012). Algae for Aquaculture and Animal Feeds. *Technikfolgenabschätzung – Theorie und Praxis* 21, 1.
- Smith R.R.** (1977). Recent research involving full-fat soybean meal in salmonid diets. *Salmonid* 1, 8 - 11.
- Sorbera L.A.,** Asturiano J.F., Carrillo M., Zanuy S. (2001). Effects of polyunsaturated fatty acids and prostaglandins on oocyte maturation in a marine teleost, the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol. Reprod.* 64, 382–389.
- Spence R,** Smith C. (2006). Mating preference of female Zebrafish, *Danio rerio*, in relation to male dominance. *Behav Ecol.* 5, 779–783.
- Spence R.,** Gerlach G., Lawrence C., Smith C. (2008). "The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*". *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society.* 83, 13–34.
- Sullivan CV,** Yilmaz O. (2018). Vitellogenesis and Yolk Proteins, *Fish. Encyclopedia of Reproduction, Second Edition* doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.20567-0
- Suriyampola P,** Shelton D, Shukla R, Roy T, Bhat A, Martins E. (2016). Zebrafish social behavior in the wild. *Zebrafish* 1, 1–8.
- Tacon A.G.J.,** Jauncey K, Falaye A., Pantha M., Mac Gowan A. and Stafford E.A. (1983). The use of meat and bone meal, hydrolyzed feather meal and soybean meal in practical fry and fingerling diets for *Oreochromis niloticus*. *Proceedings of the International Symposium on Tilapia in Aquaculture, Nazareth, Israel,* 356 – 365.
- Tacon AGJ,** Metian M. (2015). Feed matters: satisfying the feed demand of aquaculture. *Rev Fish Sci Aquac.* 23,1–10.
- Tocher DR.,** Agaba M., Hastings N., Teale A.J. (2003). Biochemical and molecular studies of the fatty acid desaturation pathway in fish. In: Browman, H.L., Skiftesvik, A.B. (Eds.), *The Big Fish Bang – Proceedings of the 26th Annual Larval Fish Conference,* pp. 211-227. Institute of Marine Nutrition, Bergen.
- Tocher DR.** (2010). Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. *Aquaculture Research* 41, 717-732.
- Tran G.,** Heuzé V., Makkar H.P.S. (2015). Insects in fish diets. *Anim. Front.* 5, 37–44.
- Tsang B,** Zahid H, Ansari R, Lee RC, Partap A, Gerlai R. (2017). Breeding Zebrafish: A Review of Different Methods and a Discussion on Standardization. *Zebrafish.* 14, 561-573.
- Truzzi C,** Illuminati S, Annibaldi A, Antonucci M, Scarponi G. (2017). Quantification of fatty acids in the muscle of Antarctic fish *Trematomus bernacchii* by gas chromatography mass spectrometry: optimization of the analytical methodology. *Chemosphere* 173,116–123.
- Truzzi C,** Annibaldi A, Illuminati S, Finale C, Scarponi G. (2014). Determination of proline in honey: comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food Chem* 150, 477–481.
- Turchini GM.** (2013). Fish oils, misconceptions and the environment. *Am. J. Public Health* 103, e4.
- Ulrich E.** (1969). Etude des ultrastructures au cours de l'ovogenese d'un poisson teleostben, le danio, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *J. Microsc.* 8, 447-478.
- United Nations,** Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2019). *World Population*

Prospects 2019: Data Booklet (ST/ESA/SER.A/424).

van Huis A. (2013). Potential of insects as food and feed in assuring food security. *Annual Rev Entomol.* 58, 563-83.

Vargas A, Randazzo B, Riolo P, Truzzi C, Gioacchini G, Giorgini E, Loreto N, Ruschioni S, Zarantoniello M, Antonucci M, Polverini S, Cardinaletti G, Sabbatini S, Tulli F, and Olivotto I. (2018). Rearing Zebrafish on Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*): Biometric, Histological, Spectroscopic, Biochemical, and Molecular Implications. *Zebrafish* 0, 1-16.

Vargas A, Randazzo B, Foddai M, Sanchini L, Truzzi C, Giorgini E, Gasco L, Olivotto I. (2019) Insect meal based diets for clownfish: Biometric, histological, spectroscopic, biochemical and molecular implications. *Aquaculture* 498, 1-11.

Veldkamp T., Duinkerken G.V., Huis A.V., Lakemond C.M.M. et al. (2012). Insects as a Sustainable Feed Ingredient in Pig and Poultry Diets: A Feasibility Study. Wageningen UR Livestock Production, Wageningen, The Netherlands, Report 638. pp. 1–48.

Wallace R.A. (1985). Vitellogenesis and oocyte growth in non-mammalian vertebrates. In: *Developmental Biology*. pp. 127– 177. Edited by L.W. Browder. Plenum Press, New York.

Wang H, Tan J T.T, Emelyanov A., Korzh V., Gong Z. (2005). Hepatic and extrahepatic expression of vitellogenin genes in the zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* 356, 91-100.

Wang YS and Shelomi M. (2017). Review of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) as Animal Feed and Human Food Foods 6, 91; doi:10.3390/foods6100091.

Wilson R.P., Robinson E.H. and Poe W.E. (1981). Apparent and true availability of amino acids from common feed ingredients for channel catfish. *Journal of Nutrition.* 111, 923 – 929.

Xu C, Wu G, Zohar Y and Du SJ. (2003). Analysis of myostatin gene structure, expression and function in zebrafish. *The Journal of Experimental Biology* 206, 4067-4079.

Zarantoniello M., Bruni, L., Randazzo B, Vargas A., Gioacchini G., Truzzi, C., Annibaldi A., Riolo P., Parisi G., Cardinaletti G. Tulli F., Olivotto I. (2018). Partial Dietary Inclusion of *Hermetia illucens* (Black Soldier Fly) Full-Fat Prepupae in Zebrafish Feed: Biometric, Histological, Biochemical, and Molecular Implications. *Zebrafish.* 15, 519-532.

