



**UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA**

**E DELL'AMBIENTE**

**Corso di Laurea Magistrale in Biologia Marina**

**Risposta fisiologica del granchio blu (*Callinectes sapidus*)  
allevato in cattività con differenti diete**

**Physiological responses of the blue crab (*Callinectes sapidus*) to  
different dietary treatments in captivity**

Tesi di Laurea Magistrale di:

Mattia Resente

Relatore:

Chiar.mo Prof. Ike Olivotto

Correlatori:

Dott. Matteo Zarantoniello

Dott. Federico Conti

Sessione autunnale di ottobre

Anno Accademico 2023/2024

## RIASSUNTO

Il granchio blu (*Callinectes sapidus*), originario delle coste occidentali dell'Atlantico, si è diffuso nel Mar Mediterraneo a seguito dell'introduzione tramite le acque di zavorra delle navi provenienti dagli Stati Uniti, adattandosi rapidamente alle nuove condizioni ambientali. Grazie alla sua tolleranza ad ampi range di temperatura e salinità e alla sua capacità di alimentarsi a diversi livelli della rete trofica, la specie ha invaso ampi territori, compreso l'alto Adriatico, dove ha causato gravi danni all'ecosistema locale e alle attività economiche, in particolar modo all'allevamento di vongole. La forte pressione esercitata dal granchio blu sull'ecosistema bentonico del Mar Mediterraneo sta riducendo sia la disponibilità che la variabilità delle prede comuni per questa specie. Nonostante la sua natura onnivora generalista, il conseguente spostamento trofico verso fonti di cibo subottimali e la carenza a lungo termine di nutrienti cruciali possono alterare la dinamica di popolazione di questa specie. In particolare, i lipidi sono fondamentali per fornire fonti di energia e regolare molti processi fisiologici e di sviluppo nei crostacei marini. In questo contesto, lo scopo del presente studio è stato di: (i) testare, in condizioni controllate, su maschi e femmine di granchio blu una fonte alimentare caratterizzata da un profilo subottimale di acidi grassi polinsaturi (PUFAs) della serie n-3, a causa della sua origine terrestre; (ii) indagare le risposte fisiologiche

in termini di crescita, benessere, caratterizzazione lipidica in tessuti target (muscolo e ovario), qualità e stato riproduttivo. Dopo il periodo di acclimatazione, i granchi blu sono stati divisi casualmente in tre gruppi sperimentali come segue: (i) gruppo Ctrl: granchi blu alimentati con filetto di alaccia (*Sardinella aurita*) per l'intero periodo di prova (60 giorni); (ii) gruppo Mix: granchi blu alimentati con cuore bovino per i primi 40 giorni e filetto di alaccia (*Sardinella aurita*) per i successivi 20 giorni; (iii) gruppo Bh: granchi blu alimentati con cuore bovino per l'intero periodo di prova (60 giorni).

Le diete fornite non hanno modificato lo stato di salute e l'accumulo di nutrienti nell'epatopancreas. Infatti, i granchi di tutti i gruppi sperimentali erano caratterizzati da una struttura adeguata della ghiandola digestiva, con livelli comparabili di riserve lipidiche. Ciò ha supportato adeguatamente la maturazione gonadica sia nei maschi che nelle femmine di tutti i gruppi sperimentali. Tuttavia, la somministrazione di cuore bovino per l'intero periodo di alimentazione (ricco di PUFA n-6 e scarso in PUFA n-3) ha portato a prestazioni di crescita inferiori sia nei maschi che nelle femmine di granchio, senza però alterare lo sviluppo e le dimensioni delle gonadi. Questo risultato ha probabilmente rivelato che i granchi blu danno priorità all'investimento riproduttivo piuttosto che alla crescita, indirizzando le risorse vitali verso i loro organi riproduttivi. Questa interessante scoperta ha implicazioni per la

sopravvivenza della specie: quando l'approvvigionamento o la qualità del cibo diminuiscono, il granchio blu utilizza le sue riserve biologiche per supportare la riproduzione.

## **Indice**

<b>1. Introduzione.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1 Le specie aliene.....</b>	<b>6</b>
<b>1.2 Biologia ed ecologia di <i>Callinectes sapidus</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>1.3 Anatomia del tratto digerente dei Decapodi.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.1 Struttura e funzioni dell'epatopancreas.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.2 Ruolo dell'epatopancreas nella regolazione della muta e nella riproduzione.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.3 Ruolo dell'epatopancreas nella regolazione della risposta allo stress.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Apparato riproduttore.....</b>	<b>21</b>
<b>1.4.1 Ovario.....</b>	<b>21</b>
<b>1.4.2 Testicolo.....</b>	<b>23</b>
<b>2. Scopo della tesi.....</b>	<b>25</b>
<b>3. Materiali e metodi.....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Etica.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Diete sperimentali.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Disegno sperimentale.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4 Analisi chimiche.....</b>	<b>31</b>

<b>3.5</b>	<b>Analisi istologiche.....</b>	<b>33</b>
<b>3.6</b>	<b>Analisi molecolari.....</b>	<b>34</b>
<b>3.7</b>	<b>Analisi statistiche.....</b>	<b>36</b>
<b>4.</b>	<b>Risultati.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>Tasso di sopravvivenza e misure biometriche.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>Contenuto lipidico e profilo degli acidi grassi del muscolo e dell'ovario.....</b>	<b>38</b>
<b>4.3</b>	<b>Analisi istologiche.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>Analisi molecolari.....</b>	<b>43</b>
<b>5.</b>	<b>Discussione.....</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusioni.....</b>	<b>54</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>55</b>

# **1 Introduzione**

## ***1.1 Le specie aliene***

Le invasioni biologiche sono una componente chiave della crisi della biodiversità indotta dall'uomo (Sala et al. 2000) e, tra gli effetti principali causati dalle specie introdotte, vi sono l'alterazione della struttura della comunità invasa e una modificazione delle funzioni ecologiche (Chapin et al. 1996), oltre ad un possibile danno alle attività economiche presenti sul territorio.

Per affrontare la tematica delle specie aliene occorre soffermarsi sulle definizioni di specie indigena, specie aliena e specie aliena invasiva.

Una specie indigena, o autoctona, è una specie naturalmente presente in un determinato areale nel quale si è generata o vi è arrivata senza l'intervento diretto dell'uomo.

Per contro, una specie aliena, o alloctona, è una specie che non appartiene alla flora o alla fauna originaria di una determinata area, ma che vi è giunta per l'intervento diretto o indiretto dell'uomo.

Importante è la definizione di specie aliena invasiva: si tratta di piante, animali, patogeni e altri organismi non originari di un dato ecosistema che, una volta introdotti, ne pregiudicano l'equilibrio ecologico e possono causare danni ambientali, danneggiare la salute degli esseri umani o l'economia. Le specie

aliene invasive hanno un impatto negativo sulla biodiversità e possono causare l'estinzione delle specie native, attraverso competizione, predazione o trasmissione di patogeni, con conseguente perdita di servizi ecosistemici forniti dalle specie scomparse.

Negli scorsi millenni, la colonizzazione umana ha portato, intenzionalmente o meno, all'introduzione di specie animali o vegetali fuori dal proprio range naturale. Tuttavia, le introduzioni comprendevano pochi taxa e inoltre, avvenivano in tempi molto lunghi e in luoghi prossimi al range nativo (Hui e Richardson, 2016).

Tuttavia, nell'ultimo secolo a causa dell'incremento della globalizzazione, e allo sviluppo tecnologico, le specie possono essere traslocate anche in scala globale, andando a vanificare quei confini e quelle barriere naturali che impedivano le invasioni. Il numero di taxa trasportati è aumentato, così come l'abbondanza degli individui che compongono le comunità (Keane e Crawley, 2002; Seebens et al., 2021).

Attualmente in Europa si contano circa 14,000 taxa alieni (<https://easin.jrc.ec.europa.eu/easin/Catalogue>, giugno 2024). Di questi, sono state riscontrate circa 840 specie non indigene (NIS) nei mari dell'Europa, delle quali 87 sono considerate invasive (<https://www.eea.europa.eu/en/analysis/indicators/marine-non-indigenous->

[species-in](#) , giugno 2024). Tuttavia, questo fenomeno è destinato ad aumentare (Bellard et al., 2012; Roy et al., 2018), anche a causa di un insieme di effetti come l'aumento della concentrazione di CO<sub>2</sub> nell'atmosfera, l'innalzamento delle temperature, i maggiori depositi di azoto, l'aumento di fattori di disturbo e l'aumento della frammentazione degli habitat (Vilà et al., 2010). Inoltre, anche l'impatto antropico dovuto a inquinamento, overfishing, acquacoltura, cambiamenti climatici, e presenza di contaminanti può favorire questi processi, portando ad una diminuzione della biodiversità e favorendo quelle specie con un ampio e maggiore margine di tolleranza verso questi disturbi (McKenzie et al., 2012; Johnston e Robert, 2009). Le specie introdotte, infatti, hanno solitamente una tolleranza maggiore a stress abiotici e biotici, permettendo un adattamento più veloce a queste condizioni.

Per fronteggiare questo fenomeno, l'Europa si è mossa sia sul piano politico sia su quello legislativo. Il regolamento (Eu) No 1143/2014 stabilisce regole per prevenire, minimizzare e mitigare l'impatto negativo sulla biodiversità dovuto all'introduzione e alla diffusione delle NIS. Inoltre, la direttiva quadro sulla strategia per l'ambiente marino (MSFD) mira a raggiungere un buono stato ambientale (GES) per tutte le acque marine dell'UE, ad esempio garantendo che le NIS non alterino negativamente gli ecosistemi. La direttiva prevede che il numero di nuove NIS introdotte nell'ambiente naturale attraverso

l'attività umana sia ridotto al minimo o a zero e che gli Stati membri stabiliscano delle soglie per la loro introduzione (<https://www.eea.europa.eu/en/analysis/indicators/marine-non-indigenous-species-in> , giugno 2024). Degno di nota è sicuramente il descrittore numero 2 (D2), che si riferisce proprio alle specie aliene.

Un mare colpito particolarmente da questo fenomeno è il Mar Mediterraneo, anche a causa delle sue caratteristiche. Esso è infatti un bacino semi chiuso, con regime idrico negativo. La quantità di acqua che evapora durante l'anno è maggiore rispetto a quella introdotta da fiumi e fenomeni atmosferici. Inoltre, è un mare particolarmente caldo (con un range di temperatura che va da 10 °C a 30 °C) ed è soggetto ad eutrofizzazione, in quanto le coste sono particolarmente abitate e vi sono molti scarichi fluviali. Inoltre, è un importante crocevia per il trasporto marittimo, in quanto grazie alla costruzione del canale di Suez, il trasporto via mare tra Atlantico e Pacifico è più rapido. Tutte queste caratteristiche lo rendono un luogo adatto all'insediamento di nuove specie, più resistenti o performanti delle specie indigene, che quindi possono soccombere. Tra queste specie rientra il granchio blu (*Callinectes sapidus*, Rathbun, 1896), originario delle coste occidentali dell'Atlantico dove funge da *key-stone species*, avendo un ruolo chiave nella struttura e nelle funzioni della rete trofica negli ambienti costieri. Viene, inoltre, utilizzato come specie adatta

all'acquacoltura, in particolare nella Chesapeake Bay, ossia un'insenatura lungo la costa orientale degli Stati Uniti, suddivisa tra Maryland e Virginia. Qui l'allevamento del granchio blu è alla base di un mercato di milioni di dollari all'anno (<https://www.cbf.org/about-the-bay/chesapeake-wildlife/blue-crabs/index.html> , giugno 2024).

In Europa è stato introdotto, probabilmente tramite le acque di zavorra, durante i viaggi delle imbarcazioni che partivano dalle coste occidentali dell'Oceano Atlantico, fino ad arrivare alle coste atlantiche della Francia (Nehring, 2011), per poi espandersi nel mar Mediterraneo dal 1947. In particolare, si è espanso nel Mediterraneo occidentale, nell'Atlantico portoghese, nell'area Adriatico-Ionica, nel bacino Levantino e nel Mar Nero, diventando ubiquitario.

Questo ampio e veloce adattamento è favorito dalle sue caratteristiche e, in particolare, da tre motivi principali: (i) tolleranza a diversi valori di salinità e temperatura, essendo una specie eurialina ed euriterma, capace cioè di sopravvivere e riprodursi anche in ambienti con una differente salinità ed una differente temperatura rispetto a quelle riscontrabili nel suo range nativo (Mancinelli et al. 2021); (ii) regime alimentare da onnivoro generalista, capace di attingere da più livelli della catena trofica (si nutre principalmente di pesci, molluschi, altri crostacei, ma anche di piante acquatiche e detrito (Gruner, 1993); (iii) elevato tasso di riproduzione, con una femmina che può produrre

più di due milioni di uova alla prima covata (un numero che andrà poi a diminuire negli eventi riproduttivi successivi, ma che rimane comunque alto) (Prager et al., 1990; Hines, 2003).

L'introduzione e la diffusione di questa specie stanno causando diverse problematiche sia a livello della struttura degli ecosistemi invasi sia alle attività economiche legate agli ambienti costieri come, ad esempio, l'allevamento di vongole in mare in alto Adriatico (Nehring, 2011).

### ***1.2 Biologia ed ecologia di Callinectes sapidus***

Il granchio blu è un decapode della famiglia Portunidae, facilmente distinguibile dal suo colore blu acceso soprattutto nella zona frontale in corrispondenza delle appendici che portano le chele (chelipedi; primo paio di arti), mentre il resto del corpo è di colore marrone. Il secondo, terzo e quarto paio di arti è adibito alla locomozione, mentre il quinto paio presenta una forma a pagaia, per favorire il nuoto. Le femmine presentano una sacca ovigera ampia e si possono distinguere dai maschi anche dalla colorazione delle chele rossa o arancione, mentre i maschi presentano una sacca addominale a forma di "T" rovesciata (Williams et al., 1974). Il granchio blu può raggiungere i 25 cm di lunghezza del carapace (CL), mentre la larghezza è il doppio della CL. Lo sviluppo in dimensioni è molto rapido durante la prima estate, arrivando a

crescere dai 70 ai 100 mm in CL; al secondo anno, invece, la maturità viene raggiunta a 120-170mm.

Il granchio blu tollera ampi range di temperatura e salinità, trovando nel Mar Mediterraneo condizioni adatte, visto l'innalzamento della temperatura dovuta anche al riscaldamento globale. Solitamente a temperature inferiori ai 10 °C, il granchio blu diventa inattivo (Turner et al., 2003). Tuttavia, l'innalzamento della temperatura, soprattutto in Adriatico e nello Ionio, può favorire la sopravvivenza e la conseguente riproduzione della specie anche nei mesi invernali (Ulbrich et al., 2013).

Inoltre, *C. sapidus* necessita di ambienti a diversa salinità per completare il ciclo vitale (Hines, 2007). In particolare, le femmine di granchio blu raggiungono la maturità sessuale dopo 17-19 mute post-larvali, (Williams 1974). La copula avviene quando la femmina presenta ancora il carapace molle, rendendo impossibili altri accoppiamenti futuri, mentre il maschio presenta un carapace completamente calcificato e ha la possibilità di accoppiarsi più volte (Milliken & Williams, 1980; Kendall et al., 2001).

La copula avviene nel tardo autunno in prossimità della zona costiera, con un basso valore di salinità, con il maschio che trasferisce le spermatofore e il liquido seminale all'interno della femmina, che presenta oociti non differenziati e delle strutture chiamate spermateche dove vengono conservate le

spermatofore in attesa della fertilizzazione. A questo punto, le femmine migrano verso il largo. Tale migrazione si arresta nei mesi invernali, quando la temperatura dell'acqua va al di sotto dei 10 °C, poiché le femmine diventano inattive. Questo è il periodo in cui si osserva la maggior mortalità. La migrazione riprende in primavera, quando le femmine si dirigono in zone a maggiore salinità dove le uova verranno fertilizzate utilizzando lo sperma precedentemente immagazzinato. Alla schiusa, si origina una forma planctonica larvale detta zoea (Kennedy, 2007; Epifanio, 2007; Jivoff et al., 2007).

Lo sviluppo larvale conta sette fasi di zoea ed una sola fase di megalopa. Lo sviluppo di zoea dura dalle tre alle quattro settimane in condizioni favorevoli e avviene in mare aperto poiché le larve in questa fase sono abili nuotatrici. Lo sviluppo della megalopa ha un periodo variabile e, in Mediterraneo, va dai dieci ai quindici giorni. Successivamente, le megalope tornano in prossimità della costa dove vanno incontro a metamorfosi, innescata da segnali ormonali in associazione con un appropriato habitat (Epifanio, 1995; Epifanio e Cohen, 2016).

La crescita e le performance riproduttive del granchio blu sono funzione delle riserve nutritive accumulate nell'epatopancreas (Chu, 1999; Castiglioni et al., 2016). *C. sapidus* è onnivoro generalista e, in base alla disponibilità preda

bivalvi, pesci, crostacei e, in alcuni casi, anche materiale di origine vegetale (Hill e Weissburg, 2013; Laughlin, 1982). La dieta cambia a seconda del sesso. I maschi, infatti, non dovendo compiere migrazioni, mantengono sempre la stessa dieta, a differenza delle femmine che hanno una dieta più varia dovendo cambiare zona in base allo stato riproduttivo (Laughlin, 1982; Bauer e Miller, 2010). In generale, le condizioni di accumulo di nutrienti nell'epatopancreas, il più importante organo digestivo e di storage nei decapodi, sono il principale indicatore dello status nutrizionale nei crostacei che determina, di conseguenza, le possibilità di sostenere fenomeni energeticamente dispendiosi come crescita, muta e riproduzione.

### ***1.3 Anatomia del tratto digerente dei Decapodi***

Il tratto digerente dei Decapodi consiste in una parte esterna, ossia la bocca, ed una parte interna, comprendente tutti gli organi.

La bocca è formata da sei paia di appendici: la mandibola, mascella 1 e 2, massillipedi 1-3, che possono variare sia in forma sia in funzione. Queste parti sono ricche in strutture utili a ridurre le dimensioni del cibo, prima che l'alimento venga ingerito (Wirhkner e Richter, 2015).

Nel tratto iniziale dell'esofago, il cibo viene lubrificato con un muco prodotto dalle ghiandole mucipare (Erri Babu, Shyamasundari, e Hanumanthu Rao,

1979); l'esofago è un corto tubo estensibile che termina nello stomaco (Barker e Gibson, 1977).

Lo stomaco è diviso in stomaco cardiaco anteriore, utilizzato per la digestione meccanica, e lo stomaco pilorico posteriore, con una funzione filtrante del chimo e utile a compattare i prodotti di scarto solidi (Gruner, 1993). All'interno dello stomaco, si trovano delle strutture cuticolari calcificate, necessarie per la formazione del filtro pilorico e i siti di attacco per la muscolatura. Nello stomaco cardiaco, il cibo si mescola ai fluidi gastrici e viene tritato dalle strutture cuticolari masticatorie (Brösing, 2010).

Il chimo viene poi filtrato in filtri primari, posti ventralmente allo stomaco cardiaco per poi essere trasportato alla camera ventrale dello stomaco pilorico attraverso i canali filtratori cardiopilorici (Storch et al., 2001); i solidi invece, attraverso la valvola cardiopilorica, sono trasportati nella regione media dello stomaco pilorico.

Il filtro pilorico attua una seconda filtrazione e filtra i fluidi ottenuti dalla pressione del residuo solido nella camera media; questo secondo filtrato viene trasportato attraverso l'atrio nei tubuli dell'epatopancreas, dove avviene l'assorbimento dei nutrienti (Vogt, 2019).

Infine, l'intestino medio e distale compattano le feci e le trasportano all'esterno.

Inoltre l'intestino distale sembra anche essere coinvolto in un rapido assorbimento dell'acqua, contribuendo alla regolazione ionica ed osmotica.

### ***1.3.1 Struttura e funzioni dell'epatopancreas***

L'epatopancreas è l'organo digestivo più grande nei decapodi ed è coinvolto nell'assorbimento e nello storage dei nutrienti, così come nella risposta allo stress. Infatti, può essere considerato in modo analogo ad intestino, fegato e pancreas esocrino dei vertebrati. È situato principalmente nel cefalotorace e costituito da due sistemi bilaterali di tubuli simmetrici collegati, attraverso l'atrio, allo stomaco pilorico. L'atrio prende contatto con lo stomaco, attraverso il filtro della ghiandola pilorica e con l'intestino medio, tramite la valvola epatopancreatica-intestinale (Vogt, 2019).

Morfologicamente, ogni metà dell'epatopancreas è formata da innumerevoli tubuli a fondo cieco che presentano un rivestimento composto da epitelio monostratificato, circondato da seni emolinfatici (Castejón et al., 2019). Ogni tubulo è circondato da una rete muscolare per garantire il riempimento e lo svuotamento dei tubuli. La muscolatura comprende fibre longitudinali e circolari, con i corpi delle cellule muscolari riscontrabili all'interno dei seni emolinfatici (Leavitt e Bayer, 1982; Loizzi, 1971; Vogt, 1985).

Sono presenti anche delle arterie epatopancreatiche, provenienti direttamente dal cuore, che si ramificano in arteriole più piccole, e che scaricano l'emolinfa direttamente nel seno ematico (Factor e Naar, 1985, 1990).

A livello epiteliale, tutti i tubuli presentano diversi tipi di cellule: cellule E, Cellule R, cellule F, cellule B e cellule M.

Delle giunzioni cellulari connettono ogni singola cellula epiteliale con quelle adiacenti: all'apice della cellula si possono trovare giunzioni strette, mentre nella zona centrale sono presenti giunzioni gap.

Ogni tubulo può essere diviso in tre zone: la zona distale, la zona delle cellule B e la zona prossimale. Nella zona distale si possono trovare cellule E alle estremità chiuse dei tubuli e cellule R, F e B in differenziamento più a valle. Le cellule E fungono da cellule staminali progenitrici che danno origine ai diversi tipi di cellule. Nella zona B invece, si trovano le cellule R, F e B mature. Infine, nella zona prossimale, si trovano solo cellule R e F, ma non cellule B, poiché si disgregano tramite secrezione olocrina a fini digestivi (Vogt, 1993, 1994).

Le cellule R sono responsabili dell'assorbimento e sono le cellule più abbondanti dell'epatopaneas.

Presentano una struttura polarizzata, mostrando all'apice un bordo con microvilli, mitocondri e corte cisterne del reticolo endoplasmico liscio. L'area centrale e quella più esterna contengono invece il nucleo, gocce lipidiche, il

reticolo endoplasmico rugoso, i mitocondri, i corpi del Golgi, perossisomi, lisosomi e autofagosomi. La parte basale, contigua al seno emolinfatico, presenta un sistema esteso di tubuli, reticolo endoplasmico rugoso e mitocondri. Il Golgi produce vescicole probabilmente destinate ad un uso intracellulare di storage di nutrienti, in quanto non vengono secrete nel lume del tubulo (Vogt, 2019).

Durante l'alimentazione, le cellule R si attivano, riscontrando un alto livello di fosfatasi acida ed esterasi non specifiche, indice dell'assimilazione e del processamento dei nutrienti (Vogt, 2019).

La funzione principale delle cellule R è quella di garantire una riserva di sostanze nutritive, soprattutto in termini di lipidi e glicogeno, fondamentali per garantire processi come muta e vitellogenesi (Al-Mohanna e Nott, 1989; Vogt et al., 1985). Il catabolismo dei globuli lipidici, ad esempio, avviene in stretta associazione con il reticolo endoplasmico rugoso, i perossisomi ed i mitocondri, siti della beta ossidazione degli acidi grassi (Vogt, 2019).

Le cellule R possono anche accumulare, in strati concentrici, granuli di calcio fosfato durante la fase di pre-muta. Queste riserve vengono utilizzate per l'indurimento del nuovo carapace dopo la muta (Shechter et al., 2008).

### ***1.3.2 Ruolo dell'epatopancreas nella regolazione della muta e nella riproduzione***

I processi di muta e riproduzione, strettamente correlati alla disponibilità di riserve energetiche nell'epatopancreas, sono governati da una serie di segnali molecolari prodotti proprio da tale organo. In particolare, il 20-idrossiecdisone, ossia la forma attiva del principale ecdisteroide, ha un ruolo centrale in questi poiché, legandosi al recettore a livello dell'epatopancreas, innesca una cascata che regola tutti i processi legati alla muta come ad esempio rilascio della cuticola, flussi osmotici, biosintesi e degradazione della chitina (Song et al. 2017), così come la sintesi di vitellogenina (Girish et al., 2015). Il 20-idrossiecdisone viene, infatti, sintetizzato nell'organo Y dei crostacei a partire dal colesterolo, utilizzando una serie di enzimi appartenenti alla famiglia "Halloween". Questi geni sono responsabili della conversione di chetodiolo in ecdisone, tramite una serie di reazioni di idrolizzazione. Il 20-idrossiecdisone verrà poi trasferito dall'organo Y all'emolinfa (Swall et al., 2021). A livello dell'epatopancreas, questo ormone si legherà al suo recettore (*ecr*) il quale, dopo aver formato un eterodimero con la proteina *rxr*, innescherà una cascata di segnali a livello intracellulare che porteranno a regolare positivamente i processi di muta (e quindi di crescita) e, nelle femmine, alla sintesi di vitellogenina.

La vitellogenina viene trasportata successivamente, tramite l'emolinfa, all'ovario, dove verrà internalizzata negli oociti in sviluppo (Li et al., 2006; Zmora et al., 2007) grazie a particolari recettori (VtGR) (Subramoniam, 2011). I VtGR sono riscontrabili solo nell'ovario, e la loro presenza è contemporanea all'espressione di vitellogenina nell'epatopancreas.

### ***1.3.3 Ruolo dell'epatopancreas nella regolazione della risposta allo stress***

Tra le altre funzioni, l'epatopancreas è implicato nella risposta allo stress. In particolare, è coinvolto nella sintesi di Heat shock proteins (*hsps*), necessarie per contrastare situazioni di stress come shock termici, presenza di metalli pesanti che possono danneggiare la struttura delle proteine, o altre situazioni dove vi sono cambiamenti improvvisi che possono portare a danni strutturali a livello proteico (Welch, 1992; Hendrick e Hartl, 1993; Sanders, 1993; Craig et al., 1994). Questa famiglia di proteine, che prende il nome dalla massa molecolare della membrana delle stesse, è costituita da chaperoni molecolari molto conservati che contribuiscono al ripiegamento e al mantenimento della struttura proteica (Welch and Feramisco, 1982; Bose et al., 1996; Rutherford and Lindquist, 1998; Queitsch et al 2002; Picard, 2002; Chen et al., 2006). In particolare, le *hsp90* sono coinvolte, oltre che nel differenziamento, nella proliferazione e nell'apoptosi cellulare, nella protezione delle cellule a fattori

di stress generici, rendendole un marker indicatore dello stato di salute generale dell'animale (Li, Peng et al., 2012).

L'epatopancreas è coinvolto nella risposta allo stress anche come bersaglio di un particolare ormone, il "crustacean hyperglycemic hormone" (*chh*), sintetizzato in diversi tessuti, tra cui l'organo pericardico. Il *chh* è tra i neuropeptidi più abbondanti nei decapodi e viene prodotto in risposta a diversi tipi di stress come ipossia, ipo- o ipertermia, alterazioni nella salinità, infezioni o uno spostamento prolungato (Chang e Lai, 2018; Chung et al., 2010; Montagné et al., 2010; Webster et al., 2012). In risposta al fattore di stress, il *chh* innesca, nell'epatopancreas e nel tessuto muscolare, la mobilitazione delle riserve energetiche come glucosio e lipidi al fine di ottenere una condizione di iperglicemia per supportare le aumentate richieste fisiologiche dell'animale.

#### ***1.4 Apparato riproduttore***

##### ***1.4.1 Ovario***

L'ovario si trova in posizione dorsale rispetto all'epatopancreas e si estende da entrambe le parti del margine anteriore della cavità del corpo fino al cefalotorace, per poi continuare fino allo stomaco cardiaco. È presente poi una connessione mediale che collega i due lobi dell'ovario a livello dello stomaco medio (Brown, 2009). Inoltre, nelle regioni distali degli ovidotti sono presenti dei recettori spermatici, contenuti in pareti chitinose. Sono posizionati

lateralmente rispetto alla linea di mezzeria, tra lo stomaco e il cuore. Anche loro cambiano morfologia in base al grado di maturazione, passando da piccoli, fini e bianchi dischi membranosi quando immaturi, fino a sfere larghe, dure e rosa (Brown, 2009)

L'ovario presenta diverse colorazioni in base alla maturità; quando è immaturo, si presenta come un filamento piccolo e rosato, mentre alla maturazione presenta una colorazione arancione ed è più spesso (Brown, 2009).

Nel 1942, Hard descrive la morfologia dell'ovario durante la riproduzione annuale, dividendo l'intero ciclo in 5 fasi. Nella prima fase, dopo l'ultima muta, l'ovario è piccolo e bianco; nella seconda fase, in un periodo compreso tra agosto e maggio, l'ovario aumenta le dimensioni e presenta un colorito arancione; nella terza fase è presente un ovario maturo che precede la prima ovulazione, è di colore arancione brillante ed esteso; nella quarta fase, ossia il periodo tra la prima e la seconda ovulazione, l'ovario rimane arancione; infine, nell'ultima fase, l'ovario collassa e presenta un colorito grigio o marrone.

Per quanto riguarda l'oogenesi, Minagawa et al. nel 1993, suddivide il processo in cinque fasi principali in base allo stato di maturazione degli oociti: proliferazione, pre-vitellogenesi, vitellogenesi primaria, vitellogenesi secondaria e maturazione.

Nella prima fase le femmine sono immature, gli ovociti sono pre-vitellogenicici, presentano un diametro compreso tra i 16 ed i 24  $\mu\text{m}$ . Gli oociti sono racchiusi da uno strato di cellule prefollicolari; nella seconda fase le femmine hanno completato la muta puberale, i recettori seminali sono gonfi, gli oociti presentano un diametro dai 30 ai 60  $\mu\text{m}$  e l'ooplasma presenta un complesso perinucleare del tuorlo. Le cellule prefollicolari migrano per circondare l'oocita; nella terza fase, ossia vitellogenesi iniziale, gli oociti presentano un diametro dai 66 ai 100  $\mu\text{m}$ . Il complesso perinucleare del tuorlo sparisce, per far posto a corpi del tuorlo eosinofili. Al centro dei lobi ovarici si possono trovare oociti previtellogenicici in fase due; la fase quattro, ossia la vitellogenesi intermedia, è caratterizzata da oociti con un diametro dai 103 ai 160  $\mu\text{m}$  e i corpi del tuorlo eosinofili riempiono completamente l'ooplasma; nella fase cinque detta anche tarda vitellogenesi, gli oociti hanno un diametro di 168-288  $\mu\text{m}$ , uno strato di cellule piatte follicolari ricopre l'oocita e l'ooplasma è completamente costituito dal tuorlo.

#### ***1.4.2 Testicolo***

L'apparato riproduttore maschile può essere suddiviso in due parti: i testicoli e i vasi deferenti (Johnson, 1980).

I testicoli hanno una forma lobulare, con un numero di tubuli elevati e molto compatti, necessari per la maturazione spermatica e il trasporto degli

spermatozoi ai vasi deferenti. Per *Callinectes sapidus*, sono stati osservati quattro stadi di sviluppo della gonade: immaturo, in maturazione, maturo e in riproduzione (Castilho et al., 2008).

I testicoli trovano continuità con i vasi deferenti, che possono essere suddivisi in tre zone: anteriore o prossimale, mediano o mediale e posteriore o distale (Johnson, 1980). La funzione dei vasi deferenti consiste nel racchiudere gli spermatozoi nelle spermatofore, per proteggerli dall'essiccazione e dalle infezioni microbiche. Il vaso anteriore è suddiviso in due parti, una prossimale ed una distale. Le secrezioni di queste due zone permettono la formazione delle spermatofore. Infatti, le cellule del vaso anteriore prossimale secernono la sostanza I, che separa la massa di spermatozoi proveniente dal testicolo in piccoli grumi. Successivamente, le cellule del vaso anteriore distale secernono invece la sostanza II, che consolida i grumi e forma le spermatofore (Ali et al., 2021).

Il vaso mediale è la frazione più grande tra i tubuli deferenti e ha la funzione di immagazzinamento delle spermatofore mature, prima che vengano trasferite al vaso posteriore. La muscolatura di questa zona è simile a quella della zona precedente, probabilmente per favorire la formazione ed il movimento delle spermatofore (Ali et al., 2021).

## **2 Scopo della tesi**

Le specie aliene rappresentano una seria minaccia per la biodiversità, alterando in modo spesso irreversibile gli equilibri di un ecosistema. Questo fenomeno è particolarmente grave nel Mar Mediterraneo, dove globalizzazione e riscaldamento globale creano condizioni favorevoli per la loro proliferazione. Queste specie, spesso senza predatori naturali, riescono a sostituire rapidamente le specie native. Un esempio è il granchio blu *Callinectes sapidus*, introdotto attraverso le acque di zavorra delle navi provenienti dagli Stati Uniti. Grazie a condizioni favorevoli come temperatura e salinità, ha rapidamente invaso il Mediterraneo in assenza di predatori. Questa problematica è riscontrabile in particolar modo nel Mar Adriatico, lungo le sponde venete ed emiliano-romagnole, dove le colture di vongole sono ormai state distrutte dal granchio blu, arrecando anche un ingente danno economico per il settore.

La forte pressione esercitata dal granchio blu sull'ecosistema bentonico del Mar Mediterraneo sta riducendo sia la disponibilità che la variabilità delle prede comuni per questa specie. Nonostante il granchio blu abbia una dieta onnivora generalista, il cambiamento delle abitudini alimentari e la mancanza a lungo termine di macronutrienti essenziali alla sua sopravvivenza, possono portare ad un'alterazione delle dinamiche di popolazione di questa specie

(Belgrad e Griffen, 2016). In particolare, nei crostacei marini, i lipidi sono nutrienti fondamentali per fornire una fonte di energia e regolare molti processi fisiologici e di sviluppo (Huang et al., 2015). Infatti, il colesterolo proveniente dalla dieta è il precursore degli ecdisteroidi che, dopo aver legato il recettore composto, nei crostacei, dal recettore dell'ecdisione (*ecr*) e dal recettore X del retinoide (*rxr*), avvia una cascata trascrizionale di geni responsivi nei tessuti bersaglio, regolando crescita, muta e riproduzione (Abdullah-Zawawi et al., 2021; Benrabaa et al., 2024). Inoltre, per i crostacei marini, gli acidi grassi polinsaturi (PUFAs) a lunga catena della serie n-3, forniscono energia e regolano la crescita, la muta e la riproduzione (Huang et al., 2015). In queste specie, sono considerati nutrienti essenziali indispensabili nella dieta (Esmaeili et al., 2024) poiché la sintesi di PUFAs a lunga catena come l'acido eicosapentaenoico (20:5n-3; EPA) e l'acido docosaesaenoico (22:6n-3; DHA) a partire dall'acido  $\alpha$ -linoleico (18:2n-6) è molto scarsa. La carenza o gli squilibri di questi acidi grassi possono quindi portare ad una ridotta sopravvivenza, una scarsa crescita, a periodi prolungati nella fase di inter-muta e ad alterazioni nelle prestazioni riproduttive (Wang et al., 2020; Zeng et al., 2024; Wen et al., 2002).

Per questo motivo, lo scopo di questo studio è stato quello di: (i) testare su maschi e femmine di granchio blu delle fonti alimentare di origine sia terrestre

che marina con differenti profili di acidi grassi, in condizioni controllate per un periodo di 60 giorni; (ii) studiare la risposta fisiologica in termini di crescita, benessere, accumulo di lipidi in tessuti target e lo stato riproduttivo.

Pertanto, le analisi si sono focalizzate su: (i) l'epatopancreas, essendo l'organo del sistema digerente più grande nei Decapodi, coinvolto nell'assorbimento dei nutrienti, nonché nella risposta allo stress (Vogt, 2019); (ii) le gonadi, poiché il loro stato dipende dai nutrienti ricevuti dalle riserve nutritive accumulate nell'epatopancreas e, di conseguenza, dall'alimentazione (Chu, 1999; Castiglioni et al., 2006); (iii) contenuto lipidico e il profilo degli acidi grassi dei muscoli e dell'ovario, poiché lo stato di questi tessuti dipende dalla composizione nutrizionale della dieta (Çelik et al., 2004).

### 3 Materiali e metodi

#### 3.1 Etica

Tutte le procedure sperimentali condotte con animali nel presente studio sono state eseguite in conformità alla normativa italiana sulla sperimentazione animale che non prevede specifica autorizzazione per l'impiego di invertebrati. I granchi sono stati anestetizzati in ghiaccio (-20 °C per 15 minuti; Bento et al., 2020).

#### 3.2 Diete sperimentali

In questo studio sono state testate due diete sperimentali. La dieta di controllo consisteva in filetti di alaccia (*Sardinella aurita*). La dieta da testare consisteva in cuore di bovino, acquistato in un negozio locale (Ancona, Italia). Il contenuto lipidico e degli acidi grassi di ogni dieta è riportato nella Tabella 1.

**Tabella 1.** Profilo degli acidi grassi (g acido grasso/100 g di esteri metilici degli acidi grassi totali) del filetto di alaccia e del cuore di bovino usato in questo studio.

	Filetto di alaccia	Cuore di bovino
<b>Lipidi totali</b>	2.83 ± 1.56	3.52 ± 0.58
<b>Acidi grassi</b>		
14:0	3.16 ± 0.25	2.74 ± 0.90
16:0	24.62 ± 0.77	18.51 ± 2.34
16:1n-7	8.16 ± 0.06	1.12 ± 0.02
18:0	8.65 ± 0.15	16.04 ± 0.62
18:1n-9(cis+trans)	21.91 ± 3.61	21.78 ± 1.87
18:1n-7	3.90 ± 0.22	3.12 ± 0.07
18:2n-6 cis	0.89 ± 0.38	24.13 ± 3.26
C18:3n-3	0.21 ± 0.01	0.43 ± 0.01
20:4n-6, ARA	2.63 ± 0.50	7.48 ± 1.93
20:5n-3, EPA	5.10 ± 0.33	N.D.
22:5n-3	1.72 ± 0.13	0.36 ± 0.12
24:0	0.12 ± 0.06	0.16 ± 0.05
C22:6n-3, DHA	11.27 ± 2.86	0.27 ± 0.08

C24:1n-9	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.00
Σ SFA	39.33 ± 0.57	39.33 ± 4.15
Σ MUFA	35.97 ± 3.94	26.85 ± 1.68
Σ n-3 PUFA	18.85 ± 3.28	1.19 ± 0.21
Σ n-6 PUFA	5.19 ± 1.23	32.55 ± 5.59

I dati sono espressi come media ± DS (n = 3). Abbreviazioni: SFA, acidi grassi saturi; MUFA, acidi grassi monoinsaturi; PUFA, acidi grassi polinsaturi; N.D., non rilevato.

### 3.3 Disegno sperimentale

Novanta granchi blu (peso iniziale  $80.7 \pm 1.6$  g) nella fase intra-muta (verificabile dalla rigidità del carapace e dall'assenza delle caratteristiche tipiche del periodo di muta) sono stati acclimati per due settimane in una singola vasca da 2000 L equipaggiata con filtri meccanici, biologici e UV (Panaque s.r.l., Viterbo, Italia) e con i seguenti parametri dell'acqua: temperatura, 21 °C; salinità 35 ‰; ammoniaca e nitriti < 0.05 mg/L; nitrati < 10 mg/L (Hardy et al., 2009). Dopo il periodo di acclimatazione, gli esemplari sono stati divisi randomicamente in tre gruppi sperimentali, in base al trattamento alimentare, come segue: (i) gruppo di controllo (Ctrl): granchi blu alimentati con filetti di alaccia (*Sardinella aurita*) per l'intera durata della prova (60 giorni); (ii) gruppo Mix: granchi blu alimentati con carne di cuore di bue per i primi 40 giorni e filetti di alaccia (*Sardinella aurita*) per i seguenti 20 giorni; (iii) gruppo Bh: granchi blu alimentati con carne di cuore di bue per l'intera prova (60 giorni).

Ogni gruppo sperimentale (30 granchi blu per gruppo; 10 granchi blu per vasca, 5 maschi e 5 femmine) era costituito da tre vasche da 500 L, ciascuna

equipaggiata con filtro meccanico e biologico. Durante l'intera durata della prova gli esemplari sono stati soggetti ad un fotoperiodo naturale (12 ore di luce e 12 ore di buio) e alle condizioni dell'acqua utilizzate durante il periodo di acclimatazione (mantenute costanti per l'intera prova). Ogni gruppo alimentare è stato alimentato con una delle diete proposte dallo studio, fornita in cubetti di circa 0.5 cm al 2% (W/W) rispetto alla biomassa suddivisa in due alimentazioni (una al mattino e una al pomeriggio). La razione giornaliera di alimento veniva regolata settimanalmente pesando gli individui di ogni vasca. Inoltre, per ogni vasca, è stata eseguita giornalmente un'ispezione visiva per verificare la presenza di eventuali esemplari morti.

Alla fine della prova (60 giorni), tutti gli esemplari sono stati raccolti e individualmente misurati con un calibro (per determinare lunghezza e larghezza del carapace; precisione 1 mm) e pesati (bilancia digitale, sensibilità 1 g). I granchi sono stati anestetizzati in ghiaccio (-20 °C per 15 minuti; Bento et al., 2020). Successivamente, è stato rimosso il carapace dorsale per il campionamento degli organi interni. Gonadi ed epatopancreas interi sono stati rimossi e pesati per calcolare l'indice gonadosomatico (GSI) ed epatosomatico (HSI), come segue: (i)  $GSI = (\text{peso della gonade} / \text{peso corporeo totale}) \times 100$ ; (ii)  $HSI = (\text{peso dell'epatopancreas} / \text{peso corporeo totale}) \times 100$ .

Infine, sono stati prelevati campioni di epatopancreas, gonadi, organo pericardico e muscolo opportunamente conservati, come riportato nelle sezioni apposite.

### ***3.4 Analisi chimiche***

Per le analisi chimiche, sono stati prelevati i seguenti campioni: (i) muscolo di 4 femmine di granchio blu per vasca (12 femmine per gruppo sperimentale) e di 4 maschi di granchio blu per vasca (12 maschi per gruppo sperimentale); (ii) ovario di 4 femmine di granchio blu per vasca (12 femmine per gruppo sperimentale).

Il contenuto totale di lipidi delle diete, del muscolo e dell'ovario è stato ricavato secondo il metodo descritto in Folch et al. (1957). Gli acidi grassi nell'estratto lipidico sono stati trans-esterificati in esteri metilici degli acidi grassi (FAME) (Christie et al., 1982). La composizione degli acidi grassi è stata determinata tramite gascromatografia utilizzando un gascromatografo Varian GC 430 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), dotato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma e di una colonna capillare Supelco Omegawax™ 320 m (Supelco, Bellefonte, PA, USA). I cromatogrammi sono stati registrati con il Galaxie Chromatography Data System 1.9.302.952 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA). Gli acidi grassi sono stati identificati confrontando il tempo di ritenzione dei FAME con quello dello standard Supelco 37 component FAME mix (Supelco,

Bellefonte, PA, USA) e quantificati attraverso curve di calibrazione, utilizzando acido tricosanoico (C23:0) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) come standard.

Il contenuto di colesterolo del muscolo e dell'ovario è stato determinato utilizzando la gascromatografia. In breve, sono stati aggiunti 0.2 ml di estratto lipidico a 0.5 ml di 5 $\alpha$ -colestano (0.2 mg/ml in cloroformio; Supelco, Bellefonte, PA, USA) come standard. Dopo l'evaporazione del solvente, sono stati aggiunti 5 ml di KOH 0.5 M in metanolo e la miscela è stata riscaldata in un bagno d'acqua a 95 °C per 40 minuti per promuovere la saponificazione dei lipidi. Una volta raffreddata, sono stati aggiunti 4 ml di acqua distillata e 2 ml di n-esano. La fase organica in superficie è stata poi trasferita con cura in una provetta per la gascromatografia. L'analisi è stata eseguita utilizzando un gascromatografo Varian GC 430 (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA), dotato di un rivelatore a ionizzazione di fiamma (FID) e di una colonna capillare in silice fusa Supelco SACTM (30 m  $\times$  0.25 mm i.d., film da 0.25  $\mu$ m; Supelco, Bellefonte, PA, USA). È stato iniettato un campione di 1  $\mu$ l con un rapporto di split 1:100 a 300 °C. La temperatura del forno è stata programmata per aumentare da 130 a 290 °C a una velocità di 20 °C/min per 8 minuti, seguita da un mantenimento a 290 °C per 11 minuti. Il rivelatore è stato mantenuto a 300

°C e l'elio è stato utilizzato come gas di trasporto con una portata costante di 1.3 ml/min.

### ***3.5 Analisi istologiche***

Sono stati prelevati campioni di epatopaneas e ovario provenienti da 5 femmine di granchio blu per vasca (15 femmine per gruppo sperimentale) e campioni di epatopaneas e vasi deferenti medi del testicolo provenienti da 5 maschi di granchio blu per vasca (15 maschi per gruppo sperimentale). I campioni sono stati fissati immergendoli per 24 ore a 4 °C nella soluzione di Bouin (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e successivamente mantenuti in una soluzione di etanolo 70%. I campioni, dopo disidratazione in soluzioni di etanolo con concentrazioni ascendenti (80, 95, 100%) e lavaggi in xilene (Bio-Optica, Milano, Italia), sono stati inclusi in paraffina (Bio-Optica) e tagliati con un microtomo (Leica RM2125 RTS, Nussloch, Germania) per ottenere sezioni di 5 µm. Per ogni campione, sono state ottenute tre sezioni (a 200 µm di intervallo tra una e l'altra), colorate poi con ematossilina di Mayer ed eosina Y (Merck KGaA).

Per l'epatopaneas, le analisi istologiche si sono concentrate nella parte centrale dei tubuli pancreatici, vista la presenza di cellule R mature, essendo un indicatore chiave per le condizioni di nutrizione dei crostacei (Vogt, 2019; Johnston et al., 2003).

Il grado di vacuolizzazione (gocce lipidiche) nelle cellule R è stato valutato in 20 tubuli di forma circolare (selezionati in maniera randomica ma con un diametro medio che va da 350 e 450  $\mu\text{m}$  in modo da poterli paragonare) per sezione (tre sezioni per granchio, 15 femmine e 15 maschi per gruppo sperimentale) in accordo con Zarantoniello et al., (2023).

Per le gonadi, tre sezioni per granchio (15 femmine e 15 maschi per trattamento alimentare) sono state ottenute per determinare: (i) lo stato di sviluppo degli oociti nell'ovario; (ii) l'immagazzinamento delle spermatofore mature nel lume dei vasi deferenti medi del testicolo (Soundarapandian et al., 2014).

Le immagini sono state acquisite usando una camera digitale a colori (Axiocam 105, Zeiss) e analizzate con il software ZEN 2.3 (Zeiss).

### ***3.6 Analisi molecolari***

L'RNA totale è stato estratto da campioni di epatopancreas e organo pericardico prelevati da 3 maschi e 3 femmine di granchio blu per vasca (9 maschi e 9 nove femmine per gruppo sperimentale) utilizzando il reagente RNazol<sup>®</sup> RT (Merck KGaA, Darmstadt, Germania) seguendo le istruzioni del produttore. Successivamente, è stata misurata la concentrazione dell'RNA utilizzando lo spettrofotometro NanoPhotometer<sup>®</sup> P-Class (Implen, Monaco di Baviera, Germania), mentre la colorazione con Gel Red<sup>™</sup> (Merck KGaA) delle bande di RNA ribosomale 28S e 18S su gel di agarosio all'1% è stata utilizzata per

verificare l'integrità dell'RNA totale estratto. A partire da 1 µg di RNA totale, è stato sintetizzato il DNA complementare (cDNA) con il kit di sintesi cDNA iScript™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Le qPCR sono state condotte utilizzando un termociclatore iQ5 iCycler (Bio-Rad) con iQ™ Sybr Green concentrato 2x (Bio-Rad) come agente intercalante fluorescente.

Nei campioni di epatopancreas è stata eseguita la quantificazione dell'espressione genica del recettore dell'ecdisione (*ecr*), del recettore X del retinoide (*rxr*), della vitellogenina (*vtg*, solamente negli esemplari femminili di granchio blu) e dell'heat shock protein (*hsp90*). Nei campioni di organi pericardici è stata misurata l'espressione relativa al "crustacean hyperglycemic hormone" (*chh*). Le sequenze dei primer sono riassunte nella Tabella 2. I livelli dell'mRNA dei geni target analizzati, sono stati calcolati tramite i software iQ5 optical system version 2.0 (Bio-Rad), GeneEx Macro iQ5 Conversion e GeneEx Macro iQ5 files, usando l'espressione di due geni di riferimento (proteina ribosomica 18S, 18s; beta-actina, β-actina) presenti in entrambi i tessuti.

**Tabella 2.** Sequenze e NCBI IDs dei primer utilizzati in questo studio

Geni	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	NCBI ID
<i>ecr</i>	GCATTGTGTTTGGAAATACCTTGCC	GCCCTCAATGCATCGAGGTATATTT	HQ630857
<i>rxr</i>	CACCATCGACAAGAGACAGAGGAA	AGATAGCGCCACAGGAGGACTCT	HQ630860
<i>vtg</i>	TGTACAGCTGAAAGGCGTGG	CATGGGCCGAGAACAGTCA	DQ314748
<i>hsp90</i>	CACCGACAACATCAAGCTGTAC	ACACCACGCACAAAGTTGAG	DQ667139
<i>chh</i>	CTGTATGATGGCCACGCTCTCA	CAGCTCGTTGAAGATGGCTCTGT	AY536012
<i>18s</i> (hk)	TCAAGTGCTGCCTTATCAGCT	TCGGATGAGTCTCGCATCGT	AY743951.1

### ***3.7 Analisi statistiche***

Le vasche sono state utilizzate come unità sperimentale per il tasso di sopravvivenza e per le misure biometriche, mentre i granchi sono stati considerati come unità sperimentale per le restanti analisi. Tutte i dati sono stati verificati per la normalità (Shapiro-Wilk test) e per l'omoschedasticità (Levene's test). I dati relativi alle misure biometriche e alle analisi istologiche, chimiche e molecolari sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza a una via (ANOVA) seguito da test per le comparazioni multiple di Tukey. La significatività è stata impostata a  $p < 0.05$ . Il software statistico Prism-8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) è stato usato per l'analisi dei dati.

## 4 Risultati

### 4.1 Tasso di sopravvivenza e misure biometriche

Il tasso di sopravvivenza è stato pari a  $92.7 \pm 3.4$ ,  $90.1 \pm 2.5$ , and  $89.8 \pm 5.6$  % nei gruppi Ctrl, Mix, e Bh, rispettivamente. Le misure biometriche sono riportate nella Tabella 3. La lunghezza e la larghezza del carapace non hanno evidenziato differenze significative tra i vari gruppi sperimentali, sia nei maschi che nelle femmine.

Considerando i maschi, gli esemplari del gruppo Bh erano caratterizzati da un peso significativamente ( $p < 0.05$ ) minore rispetto agli altri gruppi sperimentali, mentre non sono state riscontrate differenze significative in termini di HSI e GSI.

Per quanto riguarda le femmine, i granchi del gruppo Bh hanno mostrato, rispetto agli altri gruppi sperimentali, un peso finale significativamente ( $p < 0.05$ ) inferiore e valori di HSI e GSI significativamente ( $p < 0.05$ ) più alti rispetto agli altri gruppi sperimentali.

**Tabella 3.** Misure biometriche dei granchi blu alimentati con le diete sperimentali

	Maschi			
	Ctrl	Mix	Bh	<i>p</i> - value
CL (cm)	$6.2 \pm 0.6$	$5.8 \pm 0.3$	$5.9 \pm 0.3$	0.362
CW (cm)	$13.3 \pm 0.6$	$13.2 \pm 0.7$	$12.8 \pm 1.3$	0.764
FBW (g)	$176.8 \pm 20.7^a$	$164.7 \pm 6.5^a$	$107.0 \pm 14.7^b$	0.002
HSI (%)	$8.1 \pm 0.3$	$8.1 \pm 0.5$	$7.8 \pm 2.5$	0.959
GSI (%)	$1.6 \pm 0.5$	$1.6 \pm 0.7$	$2.3 \pm 1.0$	0.462
	Femmine			
	Ctrl	Mix	Bh	<i>p</i> - value
CL (cm)	$5.8 \pm 0.3$	$5.5 \pm 0.3$	$5.4 \pm 0.1$	0.720

CW (cm)	12.4 ± 0.9	11.6 ± 0.7	11.4 ± 1.2	0.472
FBW (g)	156.0 ± 14.1 <sup>a</sup>	145.7 ± 18.8 <sup>a</sup>	87.7 ± 8.0 <sup>b</sup>	0.002
HSI (%)	8.9 ± 1.3 <sup>b</sup>	8.5 ± 1.0 <sup>b</sup>	14.1 ± 1.1 <sup>a</sup>	0.001
GSI (%)	4.8 ± 0.8 <sup>b</sup>	5.3 ± 1.0 <sup>b</sup>	7.9 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.009

I dati sono espressi come media ± SD (n = 3). <sup>a,b</sup> All'interno di ciascuna riga, lettere diverse indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali. Abbreviazioni: CL, lunghezza del carapace; CW, larghezza del carapace; FBW, peso finale; HSI, indice epatosomatico; GSI, indice gonadosomatico.

#### ***4.2 Contenuto lipidico e profilo degli acidi grassi del muscolo e dell'ovario***

I lipidi totali e il profilo di acidi grassi nei muscoli di granchio blu sia maschi che femmine sono mostrati, rispettivamente, nella Tabella 4 e nella Tabella 5. Per quanto riguarda il contenuto lipidico e di colesterolo nei muscoli sia dei maschi che delle femmine, non sono state riscontrate differenze significative tra i gruppi sperimentali.

Considerando il profilo degli acidi grassi nei muscoli dei maschi, gli acidi grassi saturi 16:0 e 18:0 erano quelli maggiormente presenti, e mostravano un andamento opposto. In particolare, 16:0 e 18:0, rispettivamente, diminuivano ed aumentavano significativamente dal gruppo Ctrl al gruppo Bh. Tuttavia, il contenuto totale di SFA non ha mostrato differenze significative tra i gruppi sperimentali. Considerando gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA), l'acido grasso maggiormente presente è il 18:1n-9, con concentrazioni significativamente più alte nel gruppo Bh rispetto agli altri, i quali non presentavano differenze significative tra di loro. La quantità totale di MUFA è risultata significativamente inferiore nel gruppo Mix rispetto agli altri. Infine, per quanto riguarda i PUFA, il gruppo Bh era caratterizzato da un contenuto

significativamente inferiore di EPA e DHA e, di conseguenza, da una quantità totale di PUFA n-3 significativamente inferiore rispetto agli altri gruppi sperimentali. Al contrario, è stato evidenziato un aumento significativo dal gruppo Ctrl al gruppo Bh del contenuto di LNA e ARA e, di conseguenza, della quantità totale di PUFA n-6.

**Tabella 4.** Lipidi totali (g/100 g di tessuto), colesterolo (mg/100 g di tessuto) e profili degli acidi grassi (% del FAME totale) dei campioni di muscolo di granchi blu maschi alimentati con le diete sperimentali.

	Ctrl	Mix	Bh	RMSE	<i>p</i> - value
<b>Lipidi totali</b>	1.25	1.04	1.60	0.477	ns
<b>Colesterolo</b>	39.54	35.90	50.20	10.472	ns
<b>Acidi grassi</b>					
14:0	2.16 <sup>a</sup>	0.96 <sup>b</sup>	1.28 <sup>b</sup>	0.342	0.0007
16:0	20.18 <sup>a</sup>	18.03 <sup>b</sup>	17.63 <sup>b</sup>	1.123	0.01
16:1n-7	4.80 <sup>a</sup>	4.33 <sup>ab</sup>	3.60 <sup>b</sup>	0.057	0.04
18:0	7.59 <sup>c</sup>	10.07 <sup>b</sup>	11.80 <sup>a</sup>	0.917	0.0002
18:1n-9	18.39 <sup>b</sup>	16.55 <sup>b</sup>	20.80 <sup>a</sup>	1.369	0.0002
18:1n-7	2.80	2.79	2.86	0.269	ns
18:2n-6, LNA	2.36 <sup>c</sup>	6.26 <sup>b</sup>	14.24 <sup>a</sup>	1.629	< 0.0001
20:1n-9	1.04 <sup>a</sup>	0.37 <sup>b</sup>	0.36 <sup>b</sup>	0.113	< 0.0001
20:4n-6, ARA	3.42 <sup>c</sup>	5.96 <sup>b</sup>	7.77 <sup>a</sup>	0.462	< 0.0001
20:5n-3, EPA	10.19 <sup>a</sup>	12.70 <sup>a</sup>	6.68 <sup>b</sup>	1.932	0.007
22:6n-3, DHA	18.51 <sup>a</sup>	15.15 <sup>b</sup>	5.83 <sup>c</sup>	1.890	< 0.0001
∑ SFA	32.71	31.78	34.09	1.364	ns
∑ MUFA	29.08 <sup>a</sup>	24.53 <sup>b</sup>	28.16 <sup>a</sup>	1.836	0.01
∑ n-3 PUFA	30.65 <sup>a</sup>	29.68 <sup>a</sup>	13.66 <sup>b</sup>	3.346	< 0.0001
∑ n-6 PUFA	6.85 <sup>c</sup>	13.38 <sup>b</sup>	23.52 <sup>a</sup>	1.715	< 0.0001

I dati sono espressi come media ed errore quadratico medio (RMSE; n = 12). Per il calcolo delle ∑ sono stati utilizzati 44 acidi grassi, ma quelli con una quantità inferiore all'1% degli esteri metilici degli acidi grassi totali (FAME) non sono elencati nella tabella. Le lettere (a-c) indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali all'interno della stessa riga. Abbreviazioni: SFA, acidi grassi saturi; MUFA, acidi grassi monoinsaturi; PUFA, acidi grassi polinsaturi; ns, nessuna differenza significativa (*p* > 0,05).

Per quanto riguarda il profilo di acidi grassi del muscolo delle femmine (Tabella 5), gli SFA più rappresentati erano il 16:0, che non differiva significativamente tra i gruppi, e il 18:0 che era significativamente più alto nel gruppo Bh rispetto al Ctrl. Non sono state rilevate differenze significative tra i gruppi sperimentali

in termini di contenuto totale di SFA. Considerando i MUFA, non sono state evidenziate differenze significative in termini di 18:1n-9 (il più rappresentato) e di quantità totale di MUFA tra i gruppi sperimentali. Per quanto riguarda i PUFA, il gruppo Bh era caratterizzato da un contenuto di DHA e, di conseguenza, da una quantità totale di PUFA n-3 significativamente inferiori rispetto agli altri gruppi sperimentali. Non sono emerse differenze significative in termini di contenuto di EPA. Diversamente, si è evidenziato un aumento significativo dal gruppo Ctrl al gruppo Bh del contenuto di LNA e, di conseguenza, della quantità totale di PUFA n-6, anche se più lieve rispetto a quella osservata per i maschi (Tabella 4). Il contenuto di ARA è risultato significativamente più elevato nei gruppi Mix e Bh rispetto a Ctrl.

**Tabella 5.** Lipidi totali (g/100 g di tessuto), colesterolo (mg/100 g di tessuto) e profili degli acidi grassi (% del FAME totale) dei campioni di muscolo di femmine di granchio blu alimentate con le diete sperimentali.

	Ctrl	Mix	Bh	RMSE	<i>p</i> - value
<b>Lipidi totali</b>	1.17	1.15	1.06	0.13	ns
<b>Colesterolo</b>	35.56	37.03	33.12	4.60	ns
<b>Acidi grassi</b>					
14:0	1.68	1.22	1.09	0.36	ns
16:0	19.90	18.13	17.55	1.13	ns
16:1n-7	4.71	5.03	5.21	1.35	ns
18:0	7.86 <sup>b</sup>	9.35 <sup>ab</sup>	10.64 <sup>a</sup>	0.95	0.02
18:1n-9	20.04	19.36	19.95	1.43	ns
18:1n-7	2.93	2.95	2.66	0.26	ns
18:2n-6, LNA	2.39 <sup>c</sup>	6.08 <sup>b</sup>	10.67 <sup>a</sup>	0.51	< 0.0001
20:1n-9	1.02 <sup>a</sup>	0.54 <sup>b</sup>	0.30 <sup>b</sup>	0.21	0.01
20:4n-6, ARA	2.98 <sup>b</sup>	5.74 <sup>a</sup>	6.33 <sup>a</sup>	0.59	0.0003
20:5n-3, EPA	10.34	10.72	10.28	1.68	ns
22:6n-3, DHA	18.83 <sup>a</sup>	13.90 <sup>b</sup>	8.22 <sup>c</sup>	2.32	0.002
∑ SFA	31.88	31.53	32.28	1.27	ns
∑ MUFA	30.51	28.50	28.64	2.60	ns
∑ n-3 PUFA	30.71 <sup>a</sup>	26.17 <sup>a</sup>	20.12 <sup>b</sup>	3.30	0.01
∑ n-6 PUFA	6.43 <sup>c</sup>	13.33 <sup>b</sup>	18.37 <sup>a</sup>	1.13	< 0.0001

I dati sono espressi come media ed errore quadratico medio (RMSE; n = 12). Per il calcolo delle  $\Sigma$  sono stati utilizzati 44 acidi grassi, ma quelli con una quantità inferiore all'1% degli esteri metilici degli acidi grassi totali (FAME) non sono elencati nella tabella. Le lettere (a-c) indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali all'interno della stessa riga. Abbreviazioni: SFA, acidi grassi saturi; MUFA, acidi grassi monoinsaturi; PUFA, acidi grassi polinsaturi; ns, nessuna differenza significativa ( $p > 0,05$ ).

Considerando il contenuto lipidico e il profilo degli acidi grassi dell'ovario (Tabella 6), sono stati ottenuti trend simili a quelli descritti per i muscoli delle femmine, tranne che per: (i) una quantità totale di SFA significativamente inferiore nel gruppo Mix rispetto agli altri gruppi sperimentali; (ii) un contenuto di EPA significativamente inferiore nel gruppo Bh rispetto ai gruppi Ctrl e Mix.

**Tabella 6.** Lipidi totali (g/100 g di tessuto) e profili degli acidi grassi (% del FAME totale) dei campioni di ovario di femmine di granchio blu alimentate con le diete sperimentali.

	Ctrl	Mix	Bh	RMSE	<i>p</i> - value
<b>Lipidi totali</b>	9.21	9.72	5.27	2.68	ns
<b>Acidi grassi</b>					
14:0	3.29 <sup>a</sup>	2.43 <sup>b</sup>	1.61 <sup>c</sup>	0.22	0.01
16:0	23.45	21.61	20.58	0.70	ns
16:1n-7	8.48	6.22	6.95	2.74	ns
18:0	6.67 <sup>c</sup>	7.17 <sup>b</sup>	10.96 <sup>a</sup>	0.21	0.001
18:1n-9	18.86	20.38	19.71	1.94	ns
18:1n-7	2.94 <sup>a</sup>	3.45 <sup>a</sup>	2.49 <sup>b</sup>	0.19	0.04
18:2n-6; LNA	2.10 <sup>c</sup>	5.45 <sup>b</sup>	11.58 <sup>a</sup>	1.02	0.01
20:4n-6; ARA	2.38 <sup>c</sup>	3.71 <sup>b</sup>	7.88 <sup>a</sup>	0.19	0.0002
20:5n-3; EPA	7.47 <sup>a</sup>	6.58 <sup>a</sup>	3.91 <sup>b</sup>	0.69	0.03
22:6n-3; DHA	15.28 <sup>a</sup>	15.04 <sup>a</sup>	5.20 <sup>b</sup>	1.64	0.01
$\Sigma$ SFA	36.51 <sup>a</sup>	33.93 <sup>b</sup>	36.99 <sup>a</sup>	0.47	0.01
$\Sigma$ MUFA	32.91	31.70	30.82	1.62	ns
$\Sigma$ n-3 PUFA	24.72 <sup>a</sup>	23.51 <sup>a</sup>	10.75 <sup>b</sup>	1.15	0.002
$\Sigma$ n-6 PUFA	5.55 <sup>c</sup>	10.60 <sup>b</sup>	21.18 <sup>a</sup>	0.71	0.001

I dati sono espressi come media ed errore quadratico medio (RMSE; n = 12). Per il calcolo delle  $\Sigma$  sono stati utilizzati 45 acidi grassi, ma quelli con una quantità inferiore all'1% degli esteri metilici degli acidi grassi totali (FAME) non sono elencati nella tabella. Le lettere (a-c) indicano differenze statisticamente significative tra i gruppi sperimentali all'interno della stessa riga. Abbreviazioni: SFA, acidi grassi saturi; MUFA, acidi grassi monoinsaturi; PUFA, acidi grassi polinsaturi; ns, nessuna differenza significativa ( $p > 0,05$ ).

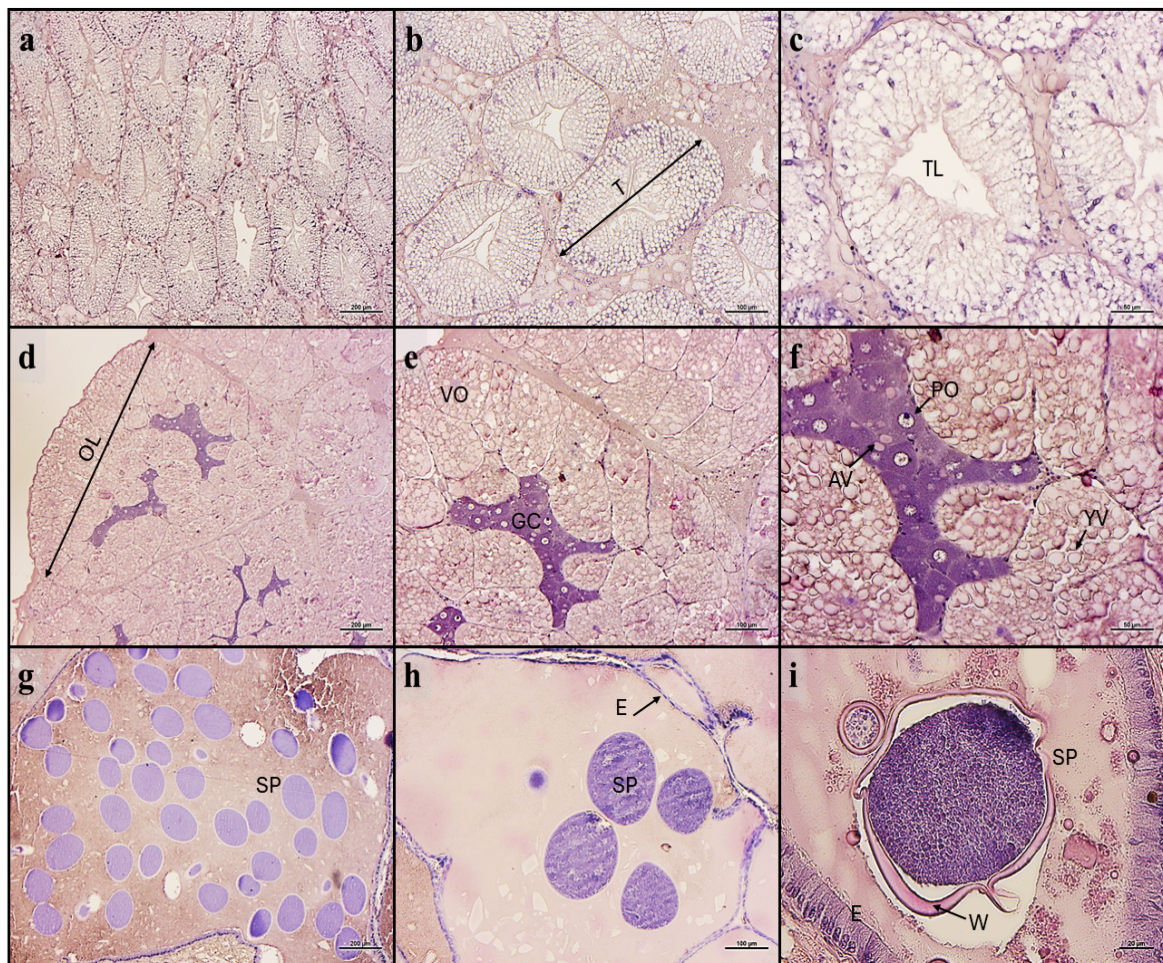
### 4.3 Analisi istologiche

Sia i maschi che le femmine di ogni gruppo sperimentale hanno mostrato, una struttura priva di alterazioni in tutti i tessuti analizzati.

Considerando l'epatopancreas (Fig. 1 a-c), non sono state riscontrate differenze nella struttura del tessuto tra i gruppi sperimentali sia nei maschi sia nelle femmine. Tutti gli esemplari analizzati hanno evidenziato una struttura dei tubuli caratterizzata da cellule R diffuse e con abbondanti gocce lipidiche.

Per quanto riguarda l'ovario (Fig. 1 d-f), le femmine di tutti i gruppi sperimentali erano mature e alla stessa fase di sviluppo della gonade. In particolare, tutti gli ovari erano organizzati in lobi che presentavano, nella regione centrale, il centro germinativo, occupato da oociti primari (stadio II) con un citoplasma fortemente basofilo e larghe vescicole acidofile. La regione esterna di ogni lobo era occupata da oociti vitellogenici (stadio IV), contenenti numerose vescicole di tuorlo che occupavano la maggior parte del citoplasma (ostacolando l'osservazione del nucleo). La forma irregolare degli oociti vitellogenici era dovuta alla pressione contro la capsula connettiva del lobo ovarico.

Anche i maschi di tutti i gruppi sperimentali erano maturi e mostravano lo stesso grado di immagazzinamento delle spermatofores mature nei vasi deferenti medi. In particolare, le cellule epiteliali dei vasi deferenti risultavano appiattite a causa dell'intensa secrezione nel lume, che risultava pieno di spermatofores mature e secrezioni granulari immerse in una matrice omogenea costituita da liquido seminale. (Fig. 1 g-i).

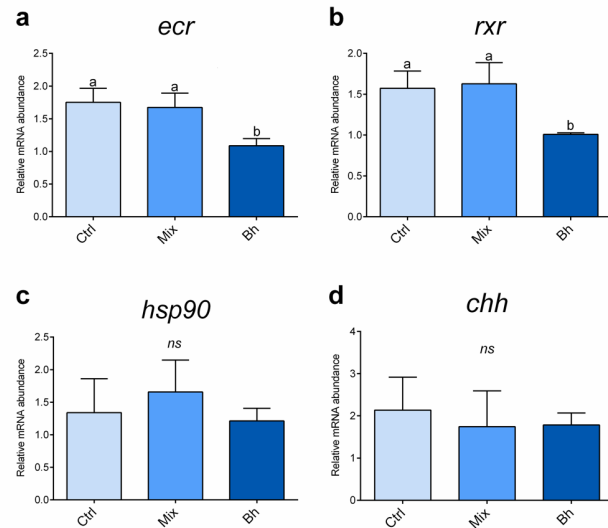


**Figura 1.** Esempi di istomorfologia di (a-c) epatopancreas, (d-f) ovario, e (g-i) vasi deferenti medi del testicolo nei granchi blu alimentati con diete sperimentali. Scala: (a, d, g) 200  $\mu\text{m}$ ; (b, e, h) 100  $\mu\text{m}$ ; (c, f) 50  $\mu\text{m}$ ; (i) 20  $\mu\text{m}$ . Abbreviazioni: T, diametro del tubulo; TL, lume del tubulo; OL, lobo ovarico; VO, oocita vitellogenico; GC, centro germinale; PO, oocita primario; AV, vescicole acidofile; YV, vescicole del tuorlo; SP, spermatofores; E, epitelio; W, parete glicoproteica.

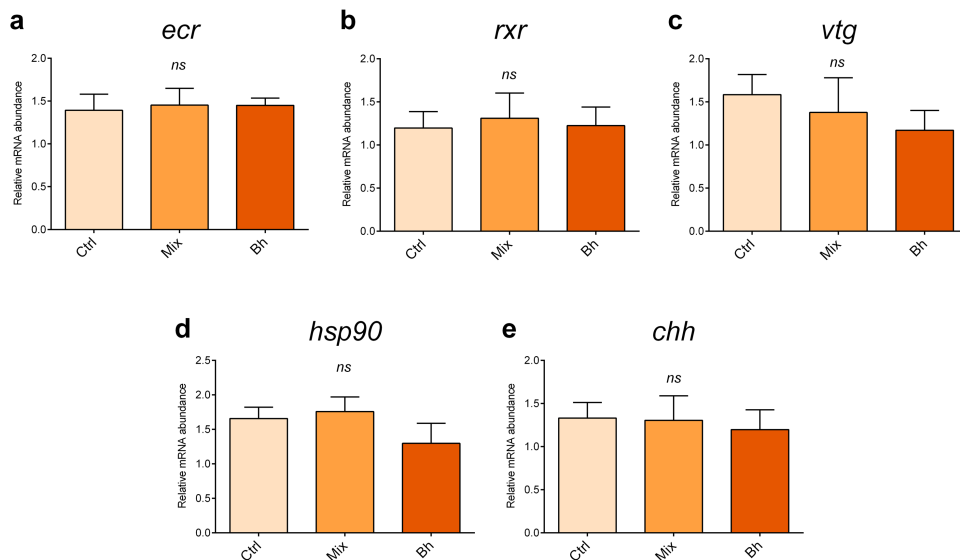
#### 4.4 Analisi molecolari

Per quanto riguarda i maschi, è stata osservata un'espressione di *rxr* ed *ecr* significativamente ( $p < 0.05$ ) più bassa nel gruppo Bh rispetto ai gruppi Ctrl e Mix, che non hanno evidenziato differenze significative tra loro (Fig. 2 a,b). Non sono state osservate differenze significative nei gruppi sperimentali per quanto riguarda l'espressione di *hsp90* e *chh*.

Considerando le femmine, non è stata riscontrata nessuna differenza significativa tra i gruppi sperimentali nell'espressione di tutti i geni analizzati (Fig. 3).



**Figura 2.** Abbondanza relativa di mRNA di (a) *ecr*, (b) *rxr*, e (c) *hsp90* analizzati nell'epatopancreas e di (d) *chh* analizzato nell'organo pericardico di esemplari maschili di granchio blu dai diversi gruppi sperimentali. I valori sono presentati come media  $\pm$  SD (n = 5). <sup>a,b</sup> lettere diverse indicano una differenza statistica significativa tra i gruppi sperimentali. ns, no differenze significative ( $p > 0.05$ ).



**Figura 3.** Abbondanza relativa di mRNA di (a) *ecr*, (b) *rxr*, (c) *vtg*, e (d) *hsp90* analizzati nell'epatopancreas e di (e) *chh* analizzato nell'organo pericardico di esemplari femminili di granchio blu dai diversi gruppi sperimentali. I valori sono presentati come media  $\pm$  SD (n = 5). ns, no differenze significative ( $p > 0.05$ ).

## 5 Discussione

Nei crostacei Decapodi, la disponibilità di fonti alimentari adeguate può influenzare profondamente la sopravvivenza, i tratti qualitativi, la fecondità e il benessere generale, sia in specie selvatiche che in condizioni controllate (Belgrad e Griffen, 2016; Drolet et al., 2022). Ad esempio, è stato dimostrato che la somministrazione di alghe (*Ulva lactuca*) ai granchi blu in un trattamento alimentare di 12 settimane ha portato ad una maggiore mortalità, alla riduzione delle riserve energetiche (con conseguenze sulle prestazioni riproduttive) e alla comparsa di comportamenti aggressivi (Griffen e Riley, 2015). Inoltre, è stato dimostrato che i lipidi presenti nelle diete e, in particolare, i PUFA a catena lunga sono fondamentali per molte funzioni dei granchi, tra cui la crescita, la riproduzione e il mantenimento dell'integrità strutturale dei tessuti (Esmaeili et al., 2024; Wang et al., 2021; Sun et al., 2020).

I diversi trattamenti alimentari testati nel presente studio non hanno influenzato significativamente la sopravvivenza (superiore al 90%) e lo stato di salute generale dei granchi blu sia maschi che femmine, come confermato dall'assenza di alterazioni patologiche nella struttura di tutti i tessuti analizzati e dall'espressione dei marcatori di stress analizzati (*hsp90* e *chh*). Inoltre, poiché i crostacei sono solitamente sensibili alla qualità dell'acqua in condizioni controllate, l'assenza di differenze significative sia nella sopravvivenza che

nella risposta allo stress ha confermato un corretto mantenimento dei granchi blu durante l'intera sperimentazione (Sarower et al., 2021). Nei Decapodi, la risposta allo stress ai fattori ambientali è regolata principalmente dai “crustacean hyperglycemic hormones” (*chh*) (Morris et al., 2010; Turner et al., 2013; Vinagre et al., 2020), identificati per la prima volta nei tessuti del peduncolo oculare (Chung et al., 2010; Webster et al., 2012) e, più recentemente, ritrovati anche in diversi tessuti, tra cui l'organo pericardico (Chung e Zmora, 2008; Toullec et al., 2006; Dircksen et al., 2001). Il meccanismo fisiologico governato dal *chh* è strettamente legato alla disponibilità di nutrienti. Infatti, la corretta risposta allo stress è rappresentata dalla possibilità di raggiungere uno stato iperglicemico attraverso la mobilitazione di carboidrati e lipidi dalle riserve dell'epatopancreas (Vinagre et al., 2020; Li et al., 2017). Nel presente studio, tutti i granchi analizzati erano caratterizzati da un'adeguata riserva di lipidi nell'epatopancreas, evidenziando uno stato di benessere, potenzialmente in grado di sostenere energeticamente eventuali condizioni di stress.

Oltre alla risposta allo stress, la disponibilità di nutrienti e il metabolismo lipidico sono fondamentali per sostenere altri processi che richiedono energia, tra cui la crescita, la muta e la riproduzione (Sacristán et al., 2017; Vinagre e Da Silva, 2002; Sacristán et al., 2016). In particolare, l'accumulo di lipidi nel

muscolo e nell'epatopancreas è considerato un fattore cruciale per valutare l'apporto nutrizionale nei granchi (Zhang et al., 2024).

Nel presente studio, sia nei granchi maschi che nelle femmine, il contenuto lipidico e il profilo degli acidi grassi del muscolo riflettevano il profilo della dieta. Questo risultato è in accordo con precedenti studi sui crostacei che hanno evidenziato una forte correlazione tra la dieta e la composizione nutrizionale dei muscoli (Zhang et al., 2019; Wang et al., 2021). L'assenza di differenze tra i gruppi sperimentali in termini di SFA (rappresentati principalmente dal palmitico e dallo stearico) e MUFA (ad eccezione di un valore leggermente inferiore nel gruppo Mix) ha fornito importanti informazioni sullo stato nutrizionale di questo tessuto (Zhang et al., 2024). Infatti, la  $\beta$ -ossidazione degli SFA, in particolare degli acidi palmitico e stearico, costituisce la principale fonte di energia per il mantenimento delle funzioni neuromuscolari nei granchi (Mei et al., 2023). Inoltre, studi precedenti condotti sul granchio del fango (*Scylla serrata*) e sul granchio cinese (*Eriocheir sinensis*) hanno evidenziato un aumento del contenuto di MUFA nel muscolo in risposta ad una dieta carente di acidi grassi essenziali (Suprayudi et al., 2004). Nel presente studio, sia i maschi che le femmine del gruppo Bh hanno mostrato valori di MUFA nel muscolo comparabili a quelli osservati nei gruppi Ctrl e Mix. Questo risultato può essere interpretato come un apporto di acidi grassi essenziali (PUFA a

catena lunga sia n-3 che n-6) (Esmaeili et al., 2024) sufficiente per soddisfare i requisiti minimi per sostenere il benessere generale e lo stato riproduttivo dei granchi, probabilmente a spese della crescita. Infatti, mentre i risultati ottenuti dalle analisi biometriche, istologiche e molecolari per maschi e femmine del gruppo Mix evidenziavano come i granchi blu possano recuperare rapidamente (20 giorni nel presente studio) da un periodo di alimentazione subottimale in termini di PUFA n-3, un diverso scenario è emerso dal gruppo Bh. Infatti, sia i maschi che le femmine di questo gruppo erano caratterizzati da un peso corporeo finale inferiore rispetto a quello osservato per i gruppi Ctrl e Mix. I PUFA a catena lunga sono coinvolti nella crescita dei crostacei, regolando la muta e fungendo da precursori degli eicosanoidi necessari per questo processo (Romano et al., 2012). Nonostante sia gli n-3 che gli n-6 PUFA risultino egualmente importanti per la corretta fisiologia di questa specie, il processo di crescita ottimale è sostenuto maggiormente dalla frazione n-3 dei PUFA e, in particolare, da alti livelli di EPA e DHA nella dieta, come precedentemente dimostrato anche nel granchio indopacifico (*Portunus trituberculatus*) (Yuan et al., 2022). Per questo motivo, nel presente studio, la somministrazione per 60 giorni di una dieta particolarmente ricca di PUFA n-6 e povera di PUFA n-3 non ha probabilmente fornito livelli sufficienti di EPA e DHA per sostenere contemporaneamente la crescita e lo stato riproduttivo, sia nei maschi che nelle

femmine. Infatti, tutti i granchi utilizzati nel presente studio erano in fase intermuta e sessualmente maturi, come evidenziato, in fase di campionamento, dalla colorazione arancione brillante dell'ovario e rosa pallido (per la presenza di liquido seminale) dei vasi deferenti dei testicoli (Zara et al., 2012; 2013), e come successivamente confermato dalle analisi istologiche. La riproduzione nei granchi è un processo energeticamente costoso in cui i lipidi sono la principale fonte di energia (Wu et al., 2020). Negli esemplari adulti, alti livelli di EPA, DHA e ARA sono necessari per la maturazione delle gonadi (Alava et al., 2007).

Nei granchi, l'epatopancreas rappresenta il principale sito di stoccaggio dei lipidi necessari per sostenere la riproduzione (Huang et al., 2015; Wang et al., 2014). Quest'organo è coinvolto nel trasferimento graduale dei nutrienti alle gonadi, favorendone lo sviluppo (Wu et al., 2020; Zheng et al., 2020). Nel presente studio, tutti gli esemplari erano caratterizzati dallo stesso grado di storage lipidico nell'epatopancreas che, di conseguenza, ha sostenuto il corretto sviluppo del sistema riproduttivo in tutti i gruppi, come supportato dai valori di HSI e GSI. In particolare, nelle femmine, il gruppo Bh era caratterizzato da livelli più alti di HSI e GSI rispetto agli altri gruppi sperimentali dovuti ad un ridotto peso corporeo dell'animale, e contemporaneamente, ad una maggiore incidenza dell'aumento di dimensione degli organi durante la stagione

riproduttiva. Questo risultato conferma uno sviluppo e un successivo mantenimento dell'epatopancreas e delle gonadi a sostegno della riproduzione, ma a spese della crescita. Infatti, nei crostacei, le dimensioni dell'epatopancreas sono un importante indicatore dell'accumulo di nutrienti (Wang et al., 2021), mentre la massa delle gonadi riflette lo stadio di maturazione sia nelle femmine che nei maschi (Zara et al., 2012; 2013).

Nelle femmine di granchio, l'oogenesi è generalmente costituita da una fase proliferativa (moltiplicazione degli oogoni) e da una fase di crescita (stadi previtellogenic e vitellogenic) caratterizzata dalla differenziazione e dalla maturazione degli ovociti attraverso l'accumulo di tuorlo. Nel presente studio, l'ovario di tutti gli esemplari dei diversi gruppi sperimentali era occupato principalmente da oociti vitellogenic (stadio IV), contenenti numerose vescicole di tuorlo che rappresentano la principale forma di immagazzinamento dei nutrienti all'interno della cellula (Bento et al., 2020). Per questo motivo, si può affermare che la somministrazione di tutte le diete ha permesso un adeguato storage di nutrienti nell'epatopancreas che, a sua volta, ha sostenuto un sufficiente trasferimento di nutrienti agli ovociti in via di sviluppo, garantendo un corretto sviluppo gonadico nelle femmine di granchio blu. Questo risultato è stato supportato anche dall'espressione di *ecr*, *rxr* e *vgt*, che non ha mostrato differenze significative tra i gruppi sperimentali. Nei crostacei,

*ecr* e *rxr* sono coinvolti, tra le altre funzioni, nella regolazione positiva della sintesi di vitellogenina nell'epatopancreas, formando un eterodimero e avviando una cascata trascrizionale di geni responsivi agli ecdisteroidi nei tessuti bersaglio (Abdullah-Zawawi et al., 2021; Benrabaa et al., 2024). La vitellogenina è sintetizzata esclusivamente nell'epatopancreas e traslocata, come lipoproteina ad alta densità, nell'ovario, dove viene internalizzata negli ovociti attraverso l'endocitosi mediata dai recettori della vitellogenina (Girish et al., 2014; Aaquillah-Amr et al., 2018). La vitellogenina rappresenta la principale proteina che si accumula nell'ovario durante questo processo (Chen et al., 2004). Tuttavia, durante la fase vitellogena, anche i lipidi sono fondamentali per il processo di maturazione e rappresentano componenti importanti per la formazione del tuorlo (Bento et al., 2020; Aaquillah-Amr et al., 2018). Infatti, i MUFA e i PUFA a catena lunga n-3 e n-6 si accumulano progressivamente durante la maturazione ovarica, fungendo da riserve energetiche e da componenti essenziali per garantire il successo riproduttivo dei granchi (Alava et al., 2007; Aaquillah-Amr et al., 2018; Feng et al., 2023). Nel presente studio, il profilo degli acidi grassi dei campioni di ovario rifletteva quello delle diete sperimentali. Mentre i gruppi Ctrl e Mix erano caratterizzati da livelli più elevati di PUFA n-3 rispetto a quelli n-6, il gruppo Bh ha mostrato un trend opposto. Tuttavia, il fabbisogno di PUFA a catena lunga, sia n-3 che

n-6, necessario a sostenere un corretto sviluppo ovarico è stato potenzialmente soddisfatto in tutti i gruppi sperimentali, come confermato dalle analisi istologiche. Infatti, è stato dimostrato da uno studio precedente che, indipendentemente dal profilo di acidi grassi della dieta, il DHA e l'EPA si accumulano preferenzialmente nell'ovario nella fase riproduttiva, a causa del loro ruolo cruciale per l'embriogenesi del granchio (Wen et al., 2002). Nel presente studio, le femmine del gruppo Bh, sottoposte per 60 giorni a una dieta ricca di PUFA n-6 e povera di PUFA n-3, hanno probabilmente investito, in maniera preferenziale, buona parte della ridotta quota alimentare di DHA ed EPA nello sviluppo ovarico. Questo investimento ha permesso di sostenere delle performance riproduttive paragonabili a quelle ottenute per gli altri gruppi sperimentali, a discapito, però, di una crescita ridotta.

Nei granchi maschi, nonostante il minore investimento energetico per lo sviluppo delle gonadi e la maturazione dei gameti rispetto alle femmine, è stato evidenziato uno scenario simile. Lo sviluppo del sistema riproduttivo maschile è caratterizzato da un aumento del volume dei vasi deferenti e può essere associato alla produzione di liquido seminale, che agisce nel trasferimento dello sperma e nella formazione del tappo spermatico nei ricettacoli seminali delle femmine (Zara et al., 2012). Nel presente studio, i maschi di granchio blu di tutti i gruppi sperimentali erano caratterizzati dall'immagazzinamento di

spermatofore mature nel vaso deferente medio, incluse nel liquido seminale e, di conseguenza, da valori GSI comparabili. Infatti, i testicoli e i vasi deferenti non aumentano drasticamente le loro dimensioni con la maturazione (si osserva solo un aumento del diametro dei tubuli dei vasi deferenti a fronte dell'accumulo di liquido seminale). Pertanto, sia GSI che HSI risultano comparabili tra i gruppi anche a fronte di un ridotto peso finale del gruppo Bh che conferma, anche nei maschi, il mantenimento della maturazione gonadica a fronte della somministrazione a lungo termine di una dieta povera di PUFA n-3, compromettendo la crescita. In accordo con questo risultato, l'espressione di *ecr* e *rxr* è risultata più bassa nei granchi maschi del gruppo Bh dal momento che questi segnali sono coinvolti (oltre che nella riproduzione) nella muta, nella metamorfosi e nella crescita (Benrabaa et al., 2024; Mykles et al., 2020). Infatti, nei crostacei, *ecr* forma un eterodimero funzionale con *rxr* che si lega all'ecdisone, formando un trimero attivo. Questo complesso regola le funzioni di crescita e muta attivando geni bersaglio collegati ai processi di crescita (Abdullah-Zawawi et al., 2021; Zhang et al., 2024). Questo risultato è in accordo con uno studio precedente che ha dimostrato la correlazione positiva tra la performance di crescita e l'espressione di *ecr* e *rxr* nel granchio cinese (*Eriocheir sinensis*) (Chen et al., 2023).

## **6 Conclusioni**

I granchi blu danno priorità agli investimenti riproduttivi piuttosto che alla crescita, indirizzando le risorse verso gli organi riproduttivi. Questa interessante scoperta ha implicazioni per la sopravvivenza della specie: quando la presenza o la qualità del cibo diminuisce (specialmente in termini di profilo lipidico), il granchio blu utilizza le sue riserve nutrizionali per sostenere la riproduzione. Generando un gran numero di larve, aumentano le possibilità di stabilire nuove popolazioni in aree con nutrienti più abbondanti, garantendo così la sopravvivenza della popolazione. In conclusione, questo studio preliminare fornisce importanti indicazioni su come la composizione della dieta, soprattutto in termini di PUFA a catena lunga, possa influenzare la crescita e la riproduzione del granchio blu, evidenziando l'investimento preferenziale nella generazione di prole in caso di alimentazione non ottimale.

## 7 Bibliografia

AAQILLAH-AMR, Mohd Amran, et al. Morphological, biochemical and histological analysis of mud crab ovary and hepatopancreas at different stages of development. *Animal reproduction science*, 2018, 195: 274-283.

ABDU, U. R. I.; YEHEZKEL, Galit; SAGI, Amir. Oocyte development and polypeptide dynamics during ovarian maturation in the red-claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 2000, 37.1: 75-83.

ABDULLAH-ZAWAWI, Muhammad-Redha, et al. Recent development in ecdysone receptor of crustaceans: current knowledge and future applications in crustacean aquaculture. *Reviews in Aquaculture*, 2021, 13.4: 1938-1957.

AL-MOHANNA, S. Y.; NOTT, J. A. Functional cytology of the hepatopancreas of *Penaeus semisulcatus* (Crustacea: Decapoda) during the moult cycle. *Marine Biology*, 1989, 101: 535-544.

ALAVA, Veronica R., et al. Lipids and fatty acids in wild and pond-reared mud crab *Scylla serrata* (Forsskål) during ovarian maturation and spawning. *Aquaculture Research*, 2007, 38.14: 1468-1477.

ALI, Awatef, et al. Morphometric, histochemical, and ultrastructural analysis of the reproductive system and spermatogenic stages of male blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896). *Journal of Marine Science and Engineering*, 2021, 9.10: 1105.

BARDELLI, R., et al. The spread of the Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun 1896 in the Mediterranean Sea: analysis of environmental and trophic niche and metal levels at different spatial scales. 2023.

BARKER, P. L.; GIBSON, Ray. Observations on the feeding mechanism, structure of the gut, and digestive physiology of the European lobster *Homarus gammarus* (L.)(Decapoda: Nephropidae). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1977, 26.3: 297-324.

BAUER, Laurie J.; MILLER, Thomas J. Spatial and interannual variability in winter mortality of the blue crab (*Callinectes sapidus*) in the Chesapeake Bay. *Estuaries and Coasts*, 2010, 33: 678-687.

BELGRAD, Benjamin A.; GRIFFEN, Blaine D. The influence of diet composition on fitness of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *PloS one*, 2016, 11.1: e0145481.

BELL, Thomas A.; LIGHTNER, Donald V. *A handbook of normal penaeid shrimp histology*. 1988.

BELLARD, Céline, et al. Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology letters*, 2012, 15.4: 365-377.

BENRABAA, Samiha AM, et al. Effects of molting on the expression of ecdysteroid responsive genes in the crustacean molting gland (Y-organ). *General and Comparative Endocrinology*, 2024, 355: 114548.

BENTO, MA Garcia, et al. Ovarian development in swimming crabs: Comparative histochemistry and ultrastructure of *Callinectes ornatus* and *Arenaeus cribrarius* (Brachyura, Portunidae). *Tissue and Cell*, 2020, 66: 101395.

BOSE, Suchira, et al. Chaperone function of Hsp90-associated proteins. *Science*, 1996, 274.5293: 1715-1717.

- BROESING, Andreas. Recent developments on the morphology of the brachyuran foregut ossicles and gastric teeth. *Zootaxa*, 2010, 2510.1: 1-44.
- BROWN, Catalina E. Ovarian morphology, oogenesis, and changes through the annual reproductive cycle of the female blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, in Tampa Bay. 2009.
- CASTEJÓN, Diego, et al. Morphology and ultrastructure of the midgut gland ("hepatopancreas") during ontogeny in the common spider crab *Maja brachydactyla* Balss, 1922 (Brachyura, Majidae). *Arthropod structure & development*, 2019, 49: 137-151.
- CASTILHO, G. G., et al. Morphology and histology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.)(Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica*, 2008, 89.2: 157-161.
- CATTANEO, Nico, et al. Dietary microplastic administration during zebrafish (*Danio rerio*) development: a comprehensive and comparative study between larval and juvenile stages. *Animals*, 2023, 13.14: 2256.
- CECCALDI, H. Anatomy and physiology of digestive tract of Crustaceans Decapods reared in aquaculture. In: *Advances in Tropical Aquaculture, Workshop at Tahiti, French Polynesia, 20 Feb-4 Mar 1989*. 1989.
- ÇELİK, Mehmet, et al. Fatty acid composition of the blue crab (*Callinectes sapidus* Rathbun, 1896) in the north eastern Mediterranean. *Food chemistry*, 2004, 88.2: 271-273.
- CHANG, Wai Hoong; LAI, Alvina G. Comparative genomic analysis of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptide genes across diverse crustacean species. *F1000Research*, 2018, 7.
- CHAPIN III, F. S.; REYNOLDS, H. L.; D'ANTONIO, C. M. 21 The functional role of species in terrestrial ecosystems. *Global change and terrestrial ecosystems*, 1996, 2: 403.

CHEN, Bin; ZHONG, Daibin; MONTEIRO, Antónia. Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC genomics*, 2006, 7: 1-19.

CHEN, Liqiao, et al. Purification of vitellin from the ovary of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) and development of an antivitelin ELISA. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2004, 138.3: 305-311.

CHEN, Xiaowen, et al. Molecular interplay between ecdysone receptor and retinoid X receptor in regulating the molting of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Frontiers in Endocrinology*, 2023, 14: 1251723.

CHRISTIE, William W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *Journal of lipid research*, 1982, 23.7: 1072-1075.

CHUNG, J. Sook, et al. Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: functions, titer, and binding to target tissues. *General and comparative endocrinology*, 2010, 166.3: 447-454.

CHUNG, J. Sook; ZMORA, N. Functional studies of crustacean hyperglycemic hormones (CHHs) of the blue crab, *Callinectes sapidus*—the expression and release of CHH in eyestalk and pericardial organ in response to environmental stress. *The FEBS Journal*, 2008, 275.4: 693-704.

CRAIG, Elizabeth A.; WEISSMAN, Jonathan S.; HORWICH, Arthur L. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell*, 1994, 78.3: 365-372.

DIRCKSEN, Heinrich, et al. Crustacean hyperglycaemic hormone (CHH)-like peptides and CHH-precursor-related peptides from pericardial organ neurosecretory cells in the

shore crab, *Carcinus maenas*, are putatively spliced and modified products of multiple genes. *Biochemical Journal*, 2001, 356.1: 159-170.

DROLET, David, et al. Effect of aquaculture-related diets on the long-term performance and condition of the rock crab, *Cancer irroratus*. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 865390.

EPIFANIO, C. E. Larval biology. *The blue crab Callinectes sapidus*, 2007, 513-533.

EPIFANIO, Charles E. Early life history of the blue crab *Callinectes sapidus*: a review. *Journal of Shellfish Research*, 2019, 38.1: 1-22.

ERRI BABU, D.; SHYAMASUNDARI, K.; HANUMANTHA RAO, K. The structure and histochemistry of the oesophageal glands in the crab *Menippe rumphii* (Fabricius)(Crustacea: Brachyura). *Proceedings: Animal Sciences*, 1979, 88: 277-285.

ESMAEILI, Noah, et al. Protein and lipid nutrition in crabs. *Reviews in Aquaculture*, 2024.

FACTOR, Jan Robert (ed.). *Biology of the Lobster: Homarus americanus*. Academic Press, 1995.

FACTOR, Jan Robert; NAAR, Michele. The digestive system of the lobster, *Homarus americanus*: I. Connective tissue of the digestive gland. *Journal of morphology*, 1985, 184.3: 311-321.

FELGENHAUER, B. E. External anatomy and integumentary structures. *Microscopic anatomy of invertebrates*, 1992, 10: 7-43.

FENG, Wenping, et al. Nutrient Composition of Ovary, Hepatopancreas and Muscle Tissues in Relation to Ovarian Development Stage of Female Swimming Crab, *Portunus trituberculatus*. *Animals*, 2023, 13.20: 3220.

FOLCH, Jordi; LEES, Mark; STANLEY, GH Sloane. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *Journal of biological chemistry*, 1957, 226.1: 497-509.

FORWARD, Richard B.; TANKERSLEY, Richard A.; WELCH, James M. Selective tidal-stream transport of the blue crab *Callinectes sapidus*: an overview. *Bulletin of Marine Science*, 2003, 72.2: 347-365.

GIRISH, B. P.; SWETHA, C. H.; REDDY, P. Sreenivasula. Expression of RXR, EcR, E75 and VtG mRNA levels in the hepatopancreas and ovary of the freshwater edible crab, *Oziothelphusa senex senex* (Fabricius, 1798) during different vitellogenic stages. *The science of nature*, 2015, 102: 1-10.

GIRISH, B. P.; SWETHA, C. H.; REDDY, P. Sreenivasula. Hepatopancreas but not ovary is the site of vitellogenin synthesis in female fresh water crab, *Oziothelphusa senex senex*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 447.2: 323-327.

GRIFFEN, Blaine D.; RILEY, Megan E. Potential impacts of invasive crabs on one life history strategy of native rock crabs in the Gulf of Maine. *Biological Invasions*, 2015, 17: 2533-2544.

GRUNER, H.-E. Lehrbuch der speziellen Zoologie. *Arthropoda (ohne Insecta)*, 1993.

HARD, Walter Leon. Ovarian growth and ovulation in the mature blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun. 1942.

HARDY, Kristin M., et al. A skeletal muscle model of extreme hypertrophic growth reveals the influence of diffusion on cellular design. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 2009, 296.6: R1855-R1867.

HENDRICK, Joseph P.; HARTL, Franz-Ulrich. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annual review of biochemistry*, 1993, 62.1: 349-384.

HILL, Jennifer M.; WEISSBURG, Marc J. Habitat complexity and predator size mediate interactions between intraguild blue crab predators and mud crab prey in oyster reefs. *Marine Ecology Progress Series*, 2013, 488: 209-219.

HINES, Anson H. Ecology of juvenile and adult blue crabs. *Biology of the blue crab*, 2007.

HINES, Anson H. Ecology of juvenile and adult blue crabs. *Biology of the blue crab*, 2007.

HINES, Anson H., et al. Evidence for sperm limitation in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bulletin of Marine Science*, 2003, 72.2: 287-310.

HUANG, Shu, et al. Transcriptomic variation of hepatopancreas reveals the energy metabolism and biological processes associated with molting in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Scientific reports*, 2015, 5.1: 14015.

HUI, Cang, et al. Defining invasiveness and invasibility in ecological networks. *Biological Invasions*, 2016, 18: 971-983.

ICELY, J. D. Digestion and Absorbtion: Digestive system and associated organs. *Decapod Crustacea*, 1992.

JASZKOWIAK, Katja, et al. The mouth apparatus of *Libinia lithodes maja* (Crustacea: Decapoda)—form, function and biological role. *Acta Zoologica*, 2015, 96.4: 401-417.

JIVOFF, Paul R.; HINES, Anson H.; QUACKENBUSH, S. Reproduction and embryonic development. *Blue crab: Callinectes sapidus*, 2007.

JIVOFF, Paul R.; HINES, Anson H.; QUACKENBUSH, S. Reproduction and embryonic development. *Blue crab: Callinectes sapidus*, 2007.

JOHNSON, Phyllis Truth. Histology of the blue crab, *Callinectes sapidus*: a model for the Decapoda. (*No Title*), 1980.

- JOHNSTON, Emma L.; ROBERTS, David A. Contaminants reduce the richness and evenness of marine communities: a review and meta-analysis. *Environmental pollution*, 2009, 157.6: 1745-1752.
- KEANE, Ryan M.; CRAWLEY, Michael J. Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. *Trends in ecology & evolution*, 2002, 17.4: 164-170.
- KENDALL, Matthew S., et al. Reproductive potential of individual male blue crabs, *Callinectes sapidus*, in a fished population: depletion and recovery of sperm number and seminal fluid. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2001, 58.6: 1168-1177.
- LAUGHLIN, Roger A. Feeding habits of the blue crab, *Callinectes sapidus* Rathbun, in the Apalachicola estuary, Florida. *Bulletin of Marine Science*, 1982, 32.4: 807-822.
- LEAVITT, Dale F.; BAYER, Robert C. A description of the muscle net surrounding the digestive epithelium in the midgut gland of the lobster *Homarus americanus*. *Journal of Crustacean Biology*, 1982, 2.1: 40-44.
- LEE, Chi-Ying; UMPHREY, Heidi R.; DOUGLAS WATSON, R. Developmental changes in the level of vitellin-immunoreactive proteins in hemolymph and tissues of the blue crab *Callinectes sapidus*: Relation to vitellogenesis. *Journal of Crustacean Biology*, 1996, 16.1: 1-9.
- LI, Peng, et al. Molecular cloning, mRNA expression, and characterization of HSP90 gene from Chinese mitten crab *Eriocheir japonica sinensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, 153.3: 229-235.
- LI, Wenfeng, et al. Differential effects of silencing crustacean hyperglycemic hormone gene expression on the metabolic profiles of the muscle and hepatopancreas in the crayfish *Procambarus clarkii*. *PLoS One*, 2017, 12.2: e0172557.

- LOIZZZI, Robert F. Interpretation of crayfish hepatopancreatic function based on fine structural analysis of epithelial cell lines and muscle network. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie*, 1971, 113: 420-440.
- MANCINELLI, Giorgio, et al. The Atlantic blue crab *Callinectes sapidus* in southern European coastal waters: Distribution, impact and prospective invasion management strategies. *Marine pollution bulletin*, 2017, 119.1: 5-11.
- MANCINELLI, Giorgio; BARDELLI, Roberta; ZENETOS, Argyro. A global occurrence database of the Atlantic blue crab *Callinectes sapidus*. *Scientific data*, 2021, 8.1: 111.
- MCKENZIE, Louise A.; BROOKS, Robert C.; JOHNSTON, Emma L. A widespread contaminant enhances invasion success of a marine invader. *Journal of Applied Ecology*, 2012, 49.4: 767-773.
- MEI, Jie, et al. The comparison and analysis of nutritional qualities of Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) in rice field and pond culture modes. *Food Chemistry: X*, 2023, 20: 100937.
- MILLIKIN, Mark R. *Synopsis of biological data on the blue crab, Callinectes sapidus Rathbun*. National Oceanic and Atmospheric Administration, National Marine Fisheries Service, 1984.
- MINAGAWA, M., et al. Female reproductive biology and oocyte development of the red frog crab, *Ranina ranina*, off Hachijojima, Izu Islands, Japan. *Marine Biology*, 1993, 115: 613-623.
- MONTAGNÉ, Nicolas, et al. Molecular evolution of the crustacean hyperglycemic hormone family in ecdysozoans. *BMC Evolutionary Biology*, 2010, 10: 1-15.

MORRIS, Stephen, et al. The adaptive significance of crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) in daily and seasonal migratory activities of the Christmas Island red crab *Gecarcoidea natalis*. *Journal of Experimental Biology*, 2010, 213.17: 3062-3073.

MYKLES, Donald L.; CHANG, Ernest S. Hormonal control of the crustacean molting gland: Insights from transcriptomics and proteomics. *General and Comparative Endocrinology*, 2020, 294: 113493.

NAGAI, Chiaki; NAGATA, Shinji; NAGASAWA, Hiromichi. Effects of crustacean hyperglycemic hormone (CHH) on the transcript expression of carbohydrate metabolism-related enzyme genes in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *General and Comparative Endocrinology*, 2011, 172.2: 293-304.

NEHRING, Stefan. Invasion history and success of the American blue crab *Callinectes sapidus* in European and adjacent waters. In: *In the wrong place-alien marine crustaceans: distribution, biology and impacts*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p. 607-624.

PICARD, Didier. Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2002, 59: 1640-1648.

PRAGER, Michael H., et al. Fecundity of blue crab, *Callinectes sapidus*, in Chesapeake Bay: biological, statistical and management considerations. *Bulletin of marine science*, 1990, 46.1: 170-179.

PRAGER, Michael H., et al. Fecundity of blue crab, *Callinectes sapidus*, in Chesapeake Bay: biological, statistical and management considerations. *Bulletin of marine science*, 1990, 46.1: 170-179.

QUEITSCH, Christine; SANGSTER, Todd A.; LINDQUIST, Susan. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature*, 2002, 417.6889: 618-624.

ROER, Robert; DILLAMAN, Richard. The structure and calcification of the crustacean cuticle. *American Zoologist*, 1984, 24.4: 893-909.

ROMANO, Nicholas, et al. Improving the survival, growth and hemolymph ion maintenance of early juvenile blue swimmer crabs, *Portunus pelagicus*, at hypo-and hyper-osmotic conditions through dietary long chain PUFA supplementation. *Aquaculture*, 2012, 342: 24-30.

ROY, Helen E., et al. Developing a framework of minimum standards for the risk assessment of alien species. *Journal of applied ecology*, 2018, 55.2: 526-538.

RUTHERFORD, Suzanne L.; LINDQUIST, Susan. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 1998, 396.6709: 336-342.

SACRISTÁN, Hernán Javier, et al. Energy reserves mobilization: Strategies of three decapod species. *PloS one*, 2017, 12.9: e0184060.

SACRISTÁN, Hernán Javier, et al. Long-term starvation and posterior feeding effects on biochemical and physiological responses of midgut gland of *Cherax quadricarinatus* juveniles (Parastacidae). *PloS one*, 2016, 11.3: e0150854.

SANDERS, Brenda M. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Critical reviews in Toxicology*, 1993, 23.1: 49-75.

SAROWER, Md Golam, et al. Comparative growth and morphometric assessment between cultures of wild and hatchery-produced mud crabs. *Heliyon*, 2021, 7.9.

SEDLMEIER, Dietrich. The role of hepatopancreatic glycogen in the action of the crustacean hyperglycemic hormone (CHH). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1987, 87.2: 423-425.

SEEBENS, Hanno, et al. Projecting the continental accumulation of alien species through to 2050. *Global Change Biology*, 2021, 27.5: 970-982.

SHECHTER, Assaf, et al. Reciprocal changes in calcification of the gastrolith and cuticle during the molt cycle of the red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*. *The Biological Bulletin*, 2008, 214.2: 122-134.

SONG, You, et al. Release of chitobiase as an indicator of potential molting disruption in juvenile *Daphnia magna* exposed to the ecdysone receptor agonist 20-hydroxyecdysone. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2017, 80.16-18: 954-962.

SOROKA, Yoram; MILNER, Yoram; SAGI, Amir. The hepatopancreas as a site of yolk protein synthesis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 2000, 37.1: 61-68.

SOUNDARAPANDIAN, P.; VARADHARAJAN, D.; ANAND, T. Male reproductive system of blue swimming crab, *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 1758). *Journal of Cytology & Histology*, 2014, 5.1: 1.

STORCH, Volker; BLUHM, Bodil A.; ARNTZ, Wolf E. Microscopic anatomy and ultrastructure of the digestive system of three Antarctic shrimps (Crustacea: Decapoda: Caridea). *Polar Biology*, 2001, 24: 604-614.

ŠTRUS, Jasna, et al. Structure, function and development of the digestive system in malacostracan crustaceans and adaptation to different lifestyles. *Cell and Tissue Research*, 2019, 377: 415-443.

SUN, Peng, et al. Effects of dietary lipid level on growth, fatty acid profiles, antioxidant capacity and expression of genes involved in lipid metabolism in juvenile swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *British Journal of Nutrition*, 2020, 123.2: 149-160.

SUPRAYUDI, M. Agus; TAKEUCHI, Toshio; HAMASAKI, Katsuyuki. Essential fatty acids for larval mud crab *Scylla serrata*: implications of lack of the ability to bioconvert C18

unsaturated fatty acids to highly unsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 2004, 231.1-4: 403-416.

TOULLEC, Jean-Yves, et al. The crustacean hyperglycemic hormones from an euryhaline crab *Pachygrapsus marmoratus* and a fresh water crab *Potamon ibericum*: eyestalk and pericardial isoforms. *Peptides*, 2006, 27.6: 1269-1280.

TURNER, Heather V., et al. Post-mating behavior, intramolt growth, and onset of migration to Chesapeake Bay spawning grounds by adult female blue crabs, *Callinectes sapidus* Rathbun. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2003, 295.1: 107-130.

TURNER, Lucy M.; WEBSTER, Simon G.; MORRIS, Stephen. Roles of crustacean hyperglycaemic hormone in ionic and metabolic homeostasis in the Christmas Island blue crab, *Discoplax celeste*. *Journal of Experimental Biology*, 2013, 216.7: 1191-1201.

VAN WORMHOUDT, A., et al. Chymotrypsin gene expression during the intermolt cycle in the shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea; Decapoda). *Experientia*, 1995, 51: 159-163.

VILÀ, Montserrat, et al. How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services? A pan-European, crosstaxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2010, 8.3: 135-144.

VINAGRE, Anapaula S.; DA SILVA, Roselis SM. Effects of fasting and refeeding on metabolic processes in the crab *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Canadian Journal of Zoology*, 2002, 80.8: 1413-1421.

VINAGRE, Anapaula Sommer, et al. Diet composition and long-term starvation do not affect crustacean hyperglycemic hormone (CHH) transcription in the burrowing crab *Neohelice granulata* (Dana, 1851). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2020, 247: 110738.

- VOGT, G. Histologie und cytologie der mitteldarmdrüse von *Penaeus monodon* (Decapoda). *Zoologischer Anzeiger*, 1985, 215.1-2: 61-80.
- VOGT, G. Life-cycle and functional cytology of the hepatopancreatic cells of *Astacus astacus* (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphology*, 1994, 114: 83-101.
- VOGT, G.; QUINITIO, Emilia T.; PASCUAL, Felicitas P. Interaction of the midgut gland and the ovary in vitellogenesis and consequences for the breeding success: a comparison of unablated and ablated spawners of *Penaeus monodon*. 1989.
- VOGT, Günter. Functional cytology of the hepatopancreas of decapod crustaceans. *Journal of morphology*, 2019, 280.9: 1405-1444.
- WANG, Wei, et al. Insights into hepatopancreatic functions for nutrition metabolism and ovarian development in the crab *Portunus trituberculatus*: gene discovery in the comparative transcriptome of different hepatopancreas stages. *PloS one*, 2014, 9.1: e84921.
- WANG, Xin, et al. Comparison of the growth performance and nutritional qualities of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) with different stocking densities in rice-crab culture systems. *Aquaculture Reports*, 2021, 20: 100761.
- WANG, Xuexi, et al. Dietary DHA/EPA ratio affects growth, tissue fatty acid profiles and expression of genes involved in lipid metabolism in mud crab *Scylla paramamosain* supplied with appropriate n-3 LC-PUFA at two lipid levels. *Aquaculture*, 2021, 532: 736028.
- WANG, Xuexi, et al. Dietary lipid and n-3 long-chain PUFA levels impact growth performance and lipid metabolism of juvenile mud crab, *Scylla paramamosain*. *British Journal of Nutrition*, 2021, 125.8: 876-890.
- WEBSTER, Simon George; KELLER, Rainer; DIRCKSEN, Heinrich. The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism,

osmoregulation, moulting, and reproduction. *General and comparative endocrinology*, 2012, 175.2: 217-233.

WELCH, William J. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiological reviews*, 1992, 72.4: 1063-1081.

WELCH, William J.; FERAMISCO, J. R. Purification of the major mammalian heat shock proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257.24: 14949-14959.

WEN, Xiao Bo, et al. Reproduction response of Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) fed different sources of dietary lipid. *Comparative biochemistry and physiology part a: molecular & integrative physiology*, 2002, 131.3: 675-681.

WILLIAMS, A. B. The swimming crabs of the genus. *inrcres (Decapoda: Portunidae)*. *Fish. Bull*, 1974, 72: 685-798.

WU, Qingyang, et al. Growth performance and biochemical composition dynamics of ovary, hepatopancreas and muscle tissues at different ovarian maturation stages of female mud crab, *Scylla paramamosain*. *Aquaculture*, 2020, 515: 734560.

WU, Xugan, et al. Fattening culture improves the gonadal development and nutritional quality of male Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Aquaculture*, 2020, 518: 734865.

YUAN, Ye, et al. New insight into the molting and growth in crustaceans: regulation of energy homeostasis through the lipid nutrition. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 914590.

ZARA, Fernando J., et al. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology*, 2012, 32.2: 249-262.

ZARA, Fernando J., et al. The ovarian cycle histochemistry and its relationship with hepatopancreas weight in the blue crab *Callinectes danae* (Crustacea: Portunidae). *Acta Zoologica*, 2013, 94.2: 134-146.

ZENG, Xianyuan, et al. Variations in lipid composition of ovaries and hepatopancreas during vitellogenesis in the mud crab *Scylla paramamosain*: Implications of lipid transfer from hepatopancreas to ovaries. *Aquaculture Reports*, 2024, 35: 102008.

ZHANG, Bao-Yuan, et al. Comparative study on growth performance and edible portion nutritional composition of male *Eriocheir sinensis* at different growth stages in rice-crab culture systems. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2024, 130: 106156.

ZHANG, Wei, et al. Effects of dietary n-3HUFA on different growth stages of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*: Growth, haematological characteristics, enzyme activities and fatty acid profiles. *Aquaculture Nutrition*, 2019, 25.5: 1098-1114.

ZHENG, Xiaochuan, et al. Dietary supplementation with icariin affects estrogen synthesis, vitellogenesis, and oocyte development in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Frontiers in Marine Science*, 2020, 7: 161.

ZMORA, Nili, et al. Vitellogenin and its messenger RNA during ovarian development in the female blue crab, *Callinectes sapidus*: gene expression, synthesis, transport, and cleavage. *Biology of reproduction*, 2007, 77.1: 138-146.

