

ALMA MATER STUDIORUM  
UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI SCIENZE

Corso di laurea magistrale in Biologia Marina  
Campus di Ravenna

PROFILI TRASCRIZIONALI DURANTE IL  
PROCESSO DI ARGENTINIZZAZIONE  
NELL'ANGUILLA EUROPEA  
(*Anguilla anguilla*, Linneo 1758)

Tesi di Laurea in

Adattamenti degli animali all'ambiente marino

Relatore:

Dott.ssa Silvia Franzellitti

Presentato da:

Luca Marchesi

Correlatore:

Prof.ssa Elena Fabbri

Sessione Unica

Anno Accademico 2015/2016

# INDICE

<b>I.</b>	<b>Introduzione</b> .....	<b>4</b>
	1.1. Tassonomia e distribuzione geografica .....	4
	1.2. Aspetti morfologici e fisiologici.....	4
	1.3. Ecologia e alimentazione.....	7
	1.4. Ciclo vitale .....	8
	1.5. Differenziamento fra i sessi .....	13
	1.6. Argentizzazione .....	15
	1.7. Maturazione sessuale.....	19
	1.8. Pesca dell'anguilla nelle valli di Comacchio .....	22
	1.9. Fattori impattanti sulla sopravvivenza.....	24
	1.9.1. Cause di origine naturale .....	24
	1.9.2. Cause di origine antropica .....	27
	1.10. Stato di conservazione dell'anguilla .....	29
<b>II.</b>	<b>Scopo della ricerca</b> .....	<b>32</b>
<b>III.</b>	<b>Materiali e metodi</b> .....	<b>34</b>
	3.1. Campionamento .....	34
	3.2. Misure morfometriche .....	34
	3.3. Estrazione e purificazione dell'RNA totale dai tessuti.....	36
	3.4. Valutazione dei livelli di mRNA codificanti per i recettori adrenergici $\alpha_1$ e $\beta_2$ .....	36
	3.4.1. Preparazione del cDNA: la retrotrascrizione .....	37

3.4.2. Selezione dei primers.....	37
3.4.3. La PCR quantitativa real time.....	37
3.5. Analisi statistica .....	41
<b>IV. Risultati .....</b>	<b>43</b>
4.1. Variazione di <i>ADRA1</i> e <i>ADRB2</i> tra i diversi gruppi nello stesso tessuto.....	43
4.2. Confronti fra <i>ADRA1</i> e <i>ADRB2</i> all'interno dello stesso gruppo.....	49
4.3. Confronto fra <i>ADRA1</i> e <i>ADRB2</i> all'interno dello stesso gruppo e nello stesso tessuto.....	50
<b>V. Discussione .....</b>	<b>53</b>
<b>VI. Conclusione.....</b>	<b>58</b>
<b>VII. Bibliografia .....</b>	<b>60</b>



## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Tassonomia e distribuzione geografica

L'anguilla europea (Linneo, 1758) è un teleosteo migratore catadromo appartenente all'ordine degli *Anguilliformes* (**Fig.1**). Il suo areale di distribuzione si estende dalla Scandinavia fino alle coste del Nord Africa, inclusi i Paesi Mediterranei (Dekker, 2003). Essa è diffusa nei corsi d'acqua dolce, negli estuari e nelle lagune di tutti i Paesi Europei che si affacciano sull'Oceano Atlantico e sul Mar Mediterraneo. Raramente la sua presenza si riscontra nel Mar di Barents e nel Mar Bianco. È noto che piccole popolazioni penetrano nel Mar Nero (Kottelat & Freyhof, 2007).



**Fig. 1** distribuzione dell'anguilla europea (*Anguilla anguilla* L.) ([www.ittiofauna.org](http://www.ittiofauna.org))

### 1.2 Aspetti morfologici e fisiologici

Il corpo dell'anguilla europea è caratterizzato da una costituzione slanciata e serpentiforme di forma rotondeggiante nella zona anteriore e compresso ai lati nella parte posteriore. Il capo si presenta alquanto allungato ed è provvisto di un muso conico. Le ossa frontali sono ben separate fra loro. La bocca è situata in posizione mediana e la mascella appare leggermente prominente (Tesch, 1977,1991). I denti, piccoli e numerosi, mostrano la forma di setole e sono posizionati in più serie sulle mascelle e sul complesso premaxillo-etmoverino (Tesch, 2003). Si riscontra la presenza di una piccola dentatura anche sulle ossa faringee a formare una sorta di cuscinetto ovale sull'osso faringeo superiore. Il cinto scapolare non è articolato al cranio ma alla colonna vertebrale (Tesch, 1977,1991). Le pinne pettorali, di forma tondeggiate, sono supportate da raggi biforcuti e raggruppati. La pinna dorsale si origina a metà della distanza compresa fra l'estremità delle pettorali l'ano, mentre la

pinna anale si sviluppa a partire dalla metà della lunghezza del corpo. Entrambe possiedono una forma allungata e sono supportate da raggi molli non biforcuti e non divisi (Tesch, 2003). Dalla loro convergenza, in corrispondenza dell'estremità posteriore del corpo, si forma la pinna caudale diflocerca. Non è riscontrata la presenza della pinna pelvica. Il numero di vertebre è elevato (100-119) e le vertebre caudali non sono provviste di processi laterali (Tesch, 1977, 1991). Il tegumento, coperto da uno strato di muco prodotto dalle cellule secretorie situate nell'epidermide, presenta un certo numero di minute scaglie cicloidi caratterizzate da una forma ellittica e disposte irregolarmente su tutto il corpo. Durante la fase trofica nelle acque continentali gli individui mostrano una livrea bruno verdastra o marrone sul dorso e giallastra sul ventre, per questo motivo vengono definiti anguille gialle. Al contrario gli individui sessualmente maturi, che intraprendono la migrazione riproduttiva, sviluppano una colorazione più scura sul dorso ed argentea sul ventre. Pertanto, in questo stadio di sviluppo, essi sono noti come anguille argentine (Tesch, 1977, 1991). Non è presente dimorfismo sessuale; i maschi, però, raggiungono la maturità sessuale ad un'età inferiore rispetto alle femmine per cui la taglia massima dei primi è sensibilmente inferiore (Tesch, 1977, 1991). Generalmente gli individui di sesso maschile non superano i 45 cm ed i 200 g di peso, mentre gli individui femmina raggiungono una lunghezza totale di 100 cm con un peso medio di 2 kg (**Fig. 2**).

La vescica natatoria è di tipo fisostomo: essa è direttamente collegata all'esofago mediante un "dotto pneumatico" il quale possiede una funzione di riassorbimento (Steen, 1963b, c) e rappresenta distintamente una riserva di ossigeno quando è pieno.

Gli occhi circolari appaiono di ridotte dimensioni e sono collocati dietro la bocca. A differenza di ciò che si osserva negli altri teleostei, nell'anguilla gli occhi non sono provvisti della coroide, ossia la lamina del bulbo oculare ampiamente vascolarizzata che rifornisce la parte posteriore dell'occhio di sangue arterioso ben ossigenato (Duke-Elder, 1958). L'iride è relativamente ben sviluppata. La pupilla è rotonda e contrattile capace di regolare la quantità di luce che entra nell'occhio (Walls, 1942). In condizioni di elevata intensità luminosa essa si contrae, mentre in condizioni di luminosità più tenue si espande. La retina è molto sensibile alla penombra, poiché vive in zone poco illuminate o buie (Wunder, 1936). Le cellule a cono sono estremamente piccole ed il rapporto con le cellule a bastoncino è molto basso, 1:150 (Gordon et al., 1978). Le narici di ciascuna cavità nasale sono situate molto distanti fra loro mentre nella maggior parte dei pesci esse si trovano molto vicine l'una all'altra. Questa peculiarità è dovuta

alla forma molto allungata della rosetta olfattoria che, nelle altre specie, è praticamente rotonda o a forma ovale. Le rosette si estendono quasi dal margine anteriore della mandibola superiore fino al bordo anteriore degli occhi, dove sono posizionate le due paia di narici posteriori (esalanti). Le narici anteriori (inalanti) sono tubuliformi, rivolte verso il basso e giacenti in prossimità del margine anteriore della cavità nasale. La rosetta olfattoria è formata da un gran numero di pieghe olfattive. Gli esemplari di anguille gialle possiedono dalle 50 alle 70 pieghe e, in alcuni casi, possono presentarne 100 (Laibach, 1937; Teichmann, 1954; Kaluza, 1959; Gorovaya, 1973). La parte posteriore della rosetta è provvista di un gran numero di ciglia che permettono lo scorrimento di un gran flusso di acqua attraverso la cavità nasale, aumentando, grazie anche alla forma di quest'ultima, il contatto fra l'epitelio olfattivo e l'acqua (Teichmann, 1959). Grazie a queste caratteristiche, l'anguilla possiede un senso dell'olfatto altamente sviluppato. Il sistema di canali formante l'apparato meccanosensoriale della linea laterale si estende dalla giuntura sopratemporale fino all'estremità posteriore del corpo, dislocandosi lungo i fianchi dell'animale (Zacchei & Tavolaro, 1988). L'anguilla non appartiene al superordine degli Ostariophysae dal momento che non possiede l'apparato di Weber che connette la vescica natatoria all'orecchio interno; di conseguenza non si verifica la trasmissione diretta delle vibrazioni dalla vescica agli organi uditivi.



**Fig. 2** anguilla maschio (esemplare più piccolo in secondo piano) e anguilla femmina (esemplare più grande in primo piano) (Tünen Institut)

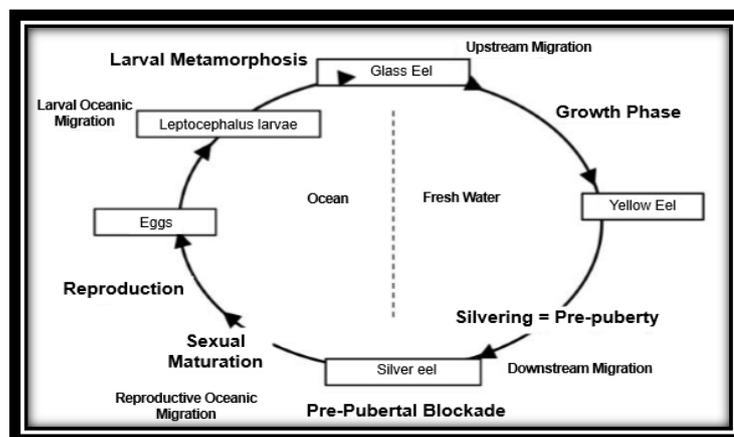
### 1.3 Ecologia e alimentazione

L'anguilla europea è una specie eurialina che tollera ampie variazioni di salinità ed è in grado di sopravvivere in una grande varietà di habitat (Tesch, 1977,1991). Nelle acque continentali è rinvenibile sia in zone d'acqua salmastra come laghi costieri, lagune ed estuari sia in zone d'acqua dolce come fiumi e laghi. Predilige acque relativamente calde, moderatamente correnti, ricche di vegetazione e con substrato sabbioso o fangoso, all'interno del quale può infossarsi durante la stagione invernale. Vive anche sui fondali duri purché siano presenti anfratti e nascondigli in cui trovare riparo (Tesch, 1977, 1991). Generalmente si osserva che sono le femmine a penetrare maggiormente nell'entroterra. I maschi, invece, tendono a stazionare presso i tratti inferiori dei fiumi, gli estuari e le lagune. Gli adulti tollerano bene l'ipossia e, in condizioni estreme, possono restare fuori dall'acqua per periodi lunghi, purché nell'ambiente ci siano condizioni di umidità tali da permetterne la sopravvivenza. Ciò è reso possibile dalla presenza di particolari accorgimenti fisiologici come la respirazione cutanea, permessa sia da un'ampia vascolarizzazione della pelle sia dalle cellule secretorie, giacenti fra i vasi sanguigni, che contengono sufficienti quantità di acqua da consentire una pronta diffusione dell'ossigeno nel sangue (Jakubowski, 1960) sia dallo strato mucoso che ricopre l'epidermide e che le protegge dalla disidratazione (Gadeau De Kerville, 1918). Essa presenta abitudini lucifughe. Durante il giorno rimane nascosta in prossimità del fondale, mentre nelle ore crepuscolari e notturne mostra la sua massima attività ricercando il cibo grazie al suo olfatto particolarmente sviluppato (Tesch, 1977,1991). Solitamente l'alimentazione avviene durante i mesi più caldi dell'anno. L'anguilla è un pesce carnivoro caratterizzato da un'ecologia bentonica, pertanto la ricerca del cibo avviene sul fondale (Tesch, 1977, 1991). Essa ha uno spettro alimentare ampio. La maggior parte degli studi mostra che, nelle acque dolci, gli esemplari lunghi meno di 30-40 cm si cibano di piccoli invertebrati (larve e adulti di insetti acquatici), mentre la dieta degli esemplari più grandi è principalmente ittiofaga. In ambiente estuariale e lagunare, l'anguilla si nutre di grossi invertebrati, incluse diverse specie di crostacei e vermi oligocheti, e di pesci. Nonostante questa dieta apparentemente opportunistica, la letteratura scientifica indica un grado più o meno alto di specializzazione trofica (Moriarty, 2003). Costa et al. (1992) hanno dimostrato che la selezione delle prede era associata ad una combinazione di fattori quali: abbondanza dell'organismo preda, la sua catturabilità e la taglia dell'anguilla. Gli esemplari più piccoli si alimentavano

principalmente di anfipodi (*Gammarus chevreuxi*, *Corophium volutator*) ma, quando raggiungevano i 200 mm di lunghezza, la loro dieta cambiava spostandosi verso *Carcinus maenas* e gamberetti (*Palaemon longirostris*, *Palaemon serratus*). Le anguille di taglia compresa fra i 200 ed i 300 mm predavano preferenzialmente policheti (*Nereis diversicolor*), mentre gli individui più lunghi di 300 mm raramente si nutrivano di piccoli crostacei. La loro dieta, infatti, si concentrava su bivalvi (*Scrobicularia plana*). Anche nelle acque dolci la specializzazione nella dieta è comune. Birò (1974), analizzando il contenuto stomacale di esemplari di anguilla catturati nel Lago Balaton (Ungheria), ha osservato che la dieta degli individui che frequentavano la zona litorale consisteva principalmente di *Asellus aquaticus* o di altri crostacei come *Corophium curvispinum*. Le anguille che occupavano la zona centrale del lago, invece, si nutrivano di larve di *Chironomus plumosus*, che rappresentava la componente numericamente predominante del benthos, e di diverse specie di pesci come *Perca fluviatilis*.

#### 1.4 Ciclo vitale

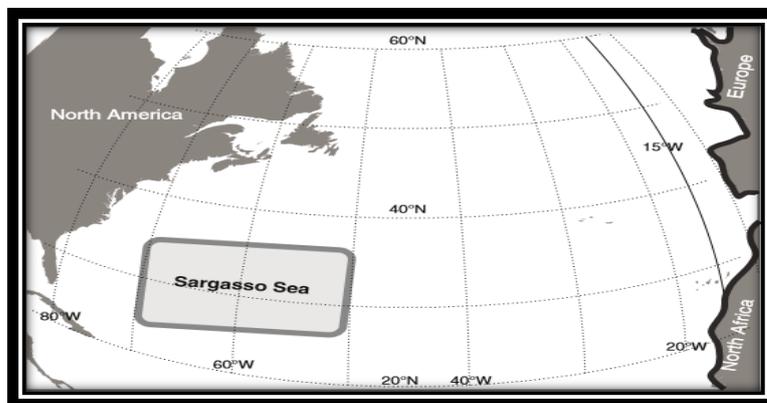
L'anguilla europea è una specie catadroma caratterizzata da un ciclo vitale semelparo piuttosto complesso (**Fig. 3**).



**Fig. 3** Ciclo biologico dell'anguilla (Rousseau et al., 2014)

Gli adulti sessualmente maturi, dopo aver trascorso diversi anni nelle acque continentali, seguendo la corrente Nord-equatoriale e la corrente delle Canarie, intraprendono una migrazione in mare aperto che li porterà a coprire una distanza di 6000 km per raggiungere il Mar dei Sargassi (Oceano Atlantico) 6-7 mesi più tardi, dove avranno luogo l'accoppiamento e la deposizione delle uova, che generalmente si protraggono nel periodo compreso fra Marzo e Luglio (**Fig. 4**). La migrazione avviene fra

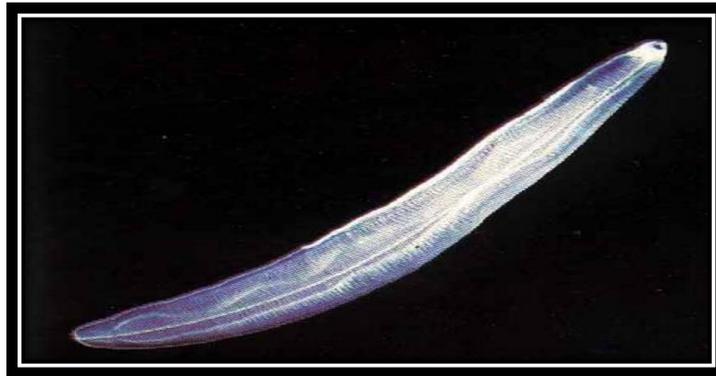
la tarda estate e l'autunno e si conclude col raggiungimento dei siti di riproduzione nella primavera successiva. La deposizione delle uova è effettuata fra i 100 e i 200 metri di profondità (Kottelat & Freyhof, 2007). Solitamente i maschi lasciano le acque continentali 1-2 mesi prima rispetto alle femmine (Usui, 1991; Tesch, 2003). Al termine di ogni evento riproduttivo gli adulti muoiono.



**Fig. 4** Areale di riproduzione di *Anguilla anguilla* nell'Oceano Atlantico (Blanke et al., 2012)

Alla schiusa delle uova segue il primo stadio di sviluppo, rappresentato dalla larva leptocefalo (**Fig. 5**), caratterizzata da una morfologia piuttosto semplice: il corpo è compresso lateralmente e trasparente, caratteristica che gli evita di essere vista dai predatori. Ha una forma simile a quella di una foglia e può raggiungere una lunghezza massima di approssimativamente 80 mm. La coda è di piccole dimensioni, l'intestino è semplice e sprovvisto di protuberanze, avvolgimenti o curvature, i miomeri sono relativamente pochi. Il tessuto renale termina leggermente dietro il centro dell'intestino. La pinna dorsale è moderatamente corta, la testa ed il muso sono abbastanza brevi. Assenza di melanofori sulla testa e sull'intero corpo (Jespersen, 1942; Smith, 1989; Mochioka, 1994, 1996; Ozawa et al., 1991). Il leptocefalo presenta tre stadi di crescita: lo stadio con il sacco del tuorlo che inizia alla schiusa delle uova ed è caratterizzato dalla presenza del tuorlo, un globulo oleoso che ha la funzione di sostenere lo sviluppo della larva nel primo periodo di vita, e da piccoli melanofori nella regione caudale. Si osservano anche dei tenui incrementi dei loro otoliti (Mochioka, 1996). Lo stadio pre-leptocefalo, in cui l'ano si sposta all'indietro, si sviluppano dei piccoli denti aghiformi, la capsula nasale è informe ed è visibile come una leggera depressione nel muso, ciascuna pinna non è ancora differenziata e sono presenti dei piccoli melanofori sulla coda (Castle, 1963; Mochioka, 1994). In fine abbiamo lo stadio leptocefalo, dove l'ano rimane stabile, i denti aghiformi dello stadio precedente vengono sostituiti da denti poggianti su un'ampia base, la capsula nasale è formata e ciascuna pinna è

differenziata. È visibile l'incremento degli otoliti. Dall'analisi della loro crescita giornaliera, si è scoperto che il tasso di accrescimento dei leptocefali spazia da 0.15 a 0.90 mm/giorno (Tsukamoto et al., 1992; Wang & Tzeng, 2000; Arai et al., 2001; Ishikawa et al., 2001). Buona parte della massa corporea larvale è composta da una matrice gelatinosa che, insieme alla notocorda, garantisce supporto strutturale in assenza di una colonna vertebrale ossificata (Rasquin, 1955; Pfeiler, 1989, 1991). L'ingente quantità di glicosaminoglicani idrofili contenuti nella matrice, da un lato, permette ai leptocefali di trattenere molta acqua nel loro corpo (più del 90% del peso totale) facilitandoli nel galleggiamento e nel trasporto passivo mediato dalle correnti oceaniche, dall'altro provvede a fornire riserve energetiche durante il processo di metamorfosi (Mochioka, 2003). La loro dieta è costituita da materia organica sospesa, la "neve marina", o da materiali detritici o gelatinosi come gli involucri larvali scartati dalle altre specie.



**Fig.5** leptocefalo di *Anguilla anguilla* (www.ittiofauna.org)

I leptocefali, trasportati alla deriva dalla Corrente del Golfo e dalla Corrente Nord Atlantica, attraversano l'Oceano Atlantico fino a raggiungere le coste dell'Europa. Dalla letteratura specializzata emergono numerose discrepanze riguardo la durata della migrazione larvale, dal momento che la sua stima dipende dal metodo usato (Bonhommeau et al., 2010). Sulla base dei risultati ottenuti mediante l'analisi della microstruttura degli otoliti, alcuni autori hanno stimato una durata inferiore o, al massimo, uguale ad un anno (Arai et al., 2000; Wang & Tzeng, 2000; Kuroki et al., 2008). Invece, studi effettuati attraverso l'elaborazione di modelli matematici sulla circolazione oceanica globale (Kettle & Haines, 2006; Bonhommeau et al., 2009) ed attraverso l'analisi macrostrutturale degli otoliti (Kei et al., 2011) mostrano che la migrazione compiuta dai leptocefali possa durare addirittura due anni. Giunti in prossimità della piattaforma continentale europea, i leptocefali vanno incontro ad un processo di metamorfosi trasformandosi in ceche, piccole anguilline trasparenti (**Fig.6**).

Nell'anguilla europea tale trasformazione avviene, mediamente, ad un'età compresa fra i 176 ed i 198 giorni ed ha una durata di 18-76 giorni (Lecomte-Finiger, 1992).



**Fig. 6** ceche di *Anguilla anguilla* (www.europeaneel.com)

Il passaggio dallo stadio di leptocefalo a quello di ceca determina una serie di importanti cambiamenti a livello morfo-anatomico, fisiologico, metabolico e comportamentale: la morfologia del corpo cambia rapidamente, passando da una forma a foglia, compressa lateralmente, ad una forma cilindrica e la colonna vertebrale si ossifica. Si osserva uno sviluppo definitivo dei reni e la comparsa di lamelle branchiali secondarie che includono le cellule del cloruro. Si ha uno sviluppo della muscolatura, di tutti i tessuti e organi interni, ed un marcato rimodellamento dell'apparato digerente (stomaco ed intestino), che porta ad un cambiamento delle abitudini alimentari. La retina con cellule a bastoncello, tipica dello stadio di leptocefalo, si sviluppa in una retina duplice, provvista di cellule sia a bastoncello sia a cono suggerendo lo sviluppo dell'acuità visiva utilizzata per l'alimentazione (Pankhurst, 1984). Durante il processo di metamorfosi, il leptocefalo cessa di alimentarsi attivamente poiché impiega, come fonte di energia, le riserve di lipidi e di glicosaminoglicani (fase non trofica della metamorfosi), degradando la matrice gelatinosa nella quale sono immagazzinati (Pfeiler, 1984, 1986). Ciò induce una riduzione del volume della larva e ad un aumento della sua densità corporea, al quale segue il passaggio dal comportamento pelagico al comportamento bentonico che implica la cessazione della migrazione oceanica alla deriva delle correnti. Una volta completata la trasformazione presso le coste del continente europeo, le ceche assumono definitivamente lo stile di vita bentonico e migrano dal mare alle acque continentali, compiendo la "rimonta". Questo processo costituisce il reclutamento delle ceche a tutti i sistemi idrografici, siano essi lagune costiere, estuari e fiumi, canali e piccoli corsi d'acqua, laghi e bacini artificiali. Il passaggio dal mare alle acque continentali avviene con un meccanismo chiamato "selective tidal transport", STT (McCleave & Wippelhauser, 1982): poiché non hanno ancora attivato la vescica

natatoria, esse non sono ancora in grado di nuotare attivamente, dunque compiono movimenti verticali per spostarsi nella massa d'acqua in estuario, approfittando così della marea montante che le trasporta attraverso l'estuario. Nel corso di questa fase le ceche vanno incontro ad una serie di cambiamenti fisiologici e anche comportamentali, acquistano la pigmentazione e la capacità di nuotare attivamente, raggiungendo a poco a poco l'aspetto definitivo, già evidente negli stadi giovanili denominati ragani. La fase successiva, conosciuta come anguilla gialla (**Fig. 7**), in relazione alla livrea che l'animale assume nel corso dell'accrescimento, ha una durata molto variabile, che si protrae dai 3 agli 8 anni per i maschi e dai 5 ai 15 anni per le femmine (Tesch, 2003). Il pattern di crescita è estremamente variabile proprio in funzione della grande varietà di habitat che l'animale può colonizzare. Durante questo stadio, gli individui, che sono sessualmente immaturi, sviluppano i cromatofori i quali si concentrano in due strati situati presso il limite più interno ed il limite più esterno dell'epidermide e sono distinti in due tipologie: melanofori marroni o neri e xantofori gialli (Aoyama & Miller, 2003). Durante il periodo trascorso nelle acque interne, negli estuari e nelle lagune le anguille gialle si dedicano interamente all'alimentazione e all'accrescimento, accumulando lipidi, soprattutto trigliceridi. Queste riserve lipidiche, immagazzinate principalmente nella muscolatura, serviranno per fornire il supporto energetico necessario per la migrazione verso il Mar dei Sargassi, la maturazione delle gonadi e la riproduzione (Pierron et al., 2006).



**Fig. 7** esemplare di anguilla gialla ([www.regione.fvg.it](http://www.regione.fvg.it))

## 1.5 Differenziamento fra i sessi

Gli esemplari maturi iniziano lo sviluppo con una gonade indifferenziata e con un basso numero di cellule germinali (Colombo & Grandi, 1996). I maschi si sviluppano passando per uno stadio intersessuale dove le gonadi contengono sia gli spermatogoni sia gli oogoni (definito organo di Syrski), mentre le femmine sviluppano gli ovari direttamente dalla gonade primordiale indifferenziata (Colombo & Grandi, 1996; Beullins et al., 1997 b). Benchè le gli individui che diventano femmine, mantengono tale sesso, è stato suggerito che alcuni presunti maschi possono trasformarsi in femmine (Wiberg, 1983; Colombo et al., 1984). Sebbene l'intersessualità accada occasionalmente negli adulti maturi (Lokman & Young, 1998), non ci sono prove del fatto che individui differenziati possano cambiare sesso (Beullins et al., 1997 b). Rimane poco chiaro, tuttavia, se alcune femmine possono svilupparsi da uno stadio intersessuale (Beullins et al., 1997 b). Il differenziamento delle gonadi ha luogo durante la fase di anguilla gialla (Colombo & Grandi, 1996), ma la difficoltà di distinguere i testicoli e gli ovari durante le fasi precoci dello sviluppo, anche impiegando tecniche istologiche, significa che l'esatta tempistica del differenziamento sessuale nel ciclo biologico risulti incerta in alcuni casi (Tesch, 2003). Più in generale, sembra che il differenziamento sessuale sia più strettamente correlato con la taglia del corpo (lunghezza totale, LT) piuttosto che con l'età (Bienarz et al., 1981; Helfman et al., 1987; Colombo & Grandi, 1996; Oliveira & McCleave, 2000; Jellyman, 2001).

Il differenziamento gonadico raramente inizia ad una lunghezza inferiore ai 150 mm LT, però mostra una diversità significativa fra le specie del genere *Anguilla*. Nell'anguilla europea, il differenziamento sessuale avviene attorno ai 200 mm LT e spesso si completa attorno ai 350 mm LT (Colombo et al., 1984; Amin, 1997; Beullins et al., 1997 b; Oliveira & McCleave, 2000). Alcune evidenze mostrano che le femmine si differenziano ad una taglia più piccola rispetto ai maschi. Ad esempio, in *A. anguilla*, i ragani destinati a diventare femmine vanno incontro al differenziamento sessuale ad una lunghezza superiore ai 190 mm di LT e coloro che diventeranno maschi, invece, sono sottoposti al differenziamento dopo aver raggiunto una taglia maggiore di 270 mm (Amin, 1997). In alcuni casi ciò potrebbe essere dovuto al fatto che le femmine tendono a svilupparsi più rapidamente; i maschi qualche volta mostrano una fase intersessuale prolungata ed il completo differenziamento dei testicoli dall'organo di Syrski è ritardata fino alla metamorfosi nello stadio di anguilla argentina (Colombo et al., 1984; Beullins et al., 1997 a). In generale, le femmine crescono più veloci dei maschi della medesima età

(Vøllestad & Jonsson, 1986; Poole & Reynolds, 1996; Holmgren et al., 1997; Oliveira, 1997; Oliveira & McCleave, 2002) e la differenza nel tasso di crescita fra gli esemplari di sesso maschile e quelli di sesso femminile aumenta con l'età (Harries, 1974; Poole & Reynolds, 1996; Holmgren et al., 1997; Oliveira, 1997; Oliveira & McCleave, 2002). Tuttavia, c'è una quantità crescente di prove che i maschi possono crescere più veloci delle femmine nei primi stadi di vita precedentemente al differenziamento sessuale (Kuhlmann, 1975; Holmgren & Mosegaard, 1996; Holmgren et al., 1997). In fine, un ultimo aspetto da considerare è che il tasso di crescita individuale, generalmente, diminuisce con l'età in entrambi i sessi (Poole & Reynolds, 1996; Holmgren et al., 1997; Oliveira & McCleave, 2002). I maschi, in verità, possono presentare un tasso di crescita medio generale più alto nelle acque dolci rispetto alle femmine perché raggiungono la maturità sessuale molto rapidamente (Holmgren et al., 1997). Helfman et al. (1987) hanno proposto un'ipotesi secondo cui le anguille maschio e le anguille femmine si sviluppano e maturano in base alle differenti strategie di vita. Poiché si ritiene che il successo riproduttivo dei maschi dipenda unicamente dalla loro abilità di raggiungere i siti di riproduzione e non dalla taglia del corpo (Boëtius & Boëtius, 1980), essi dovrebbero iniziare a migrare una volta che hanno raggiunto la taglia fondamentale per intraprendere la migrazione riproduttiva con successo e per sviluppare i gameti (Vøllestad, 1992). Ci si aspetta, dunque, che i maschi massimizzino la loro fitness minimizzando il tempo impiegato per raggiungere la maturità sessuale. Questa strategia è definita come minimizzazione del tempo (time-minimizing strategy) (Helfman et al., 1987). Al contrario, la fitness delle femmine è basata su più complesso set di fattori che favoriscono l'accrescimento della taglia. In primo luogo, la fecondità degli esemplari femminili, come nella maggior parte delle specie ittiche, aumenta esponenzialmente con la taglia del corpo (Wenner & Musick, 1974; Barbin & McCleave, 1997). In secondo luogo, le femmine devono essere grandi abbastanza per avere riserve di energia adeguate sia per foraggiarsi durante la migrazione sia per completare la maturazione di milioni di uova, una volta raggiunti i siti riproduttivi. Esse, quindi, devono bilanciare un'elevata fecondità, associata ad una taglia del corpo più grande, con l'alta probabilità di mortalità pre-ovideposizione dovuta alla riproduzione posticipata (Stearns, 1976; Helfman et al., 1987). Si pensa, dunque, che le femmine adottino una strategia che massimizza la taglia (size-maximizing strategy) (Helfman et al., 1987; Larsson et al., 1990; Jellyman, 2001), sebbene altri studiosi hanno suggerito l'ipotesi che esse maturino il più presto possibile, come i maschi (Vøllestad, 1992; Svendäng et al., 1996). Una strategia di compromesso, proposta da Oliveira (1999), ha predetto che la taglia

ottimale per la migrazione dipende dalle caratteristiche locali dell'habitat; in acque meno produttive, dove la crescita è limitata, le femmine possono compiere la metamorfosi ad una lunghezza minima che garantisce una migrazione ed una riproduzione di successo, mentre in condizioni più favorevoli, la tendenza mostrata sarebbe quella di raggiungere una taglia più grande ritardando la migrazione (De Leo & Gatto, 1996; Oliveira, 1999; Jellyman, 2001). Sebbene siano stati identificati cromosomi sessuali eteromofi in alcune specie di anguille, il sesso delle gonadi in via di sviluppo appare labile ed il genere è determinato principalmente dai fattori ambientali. Gli individui che mostrano una crescita rapida prima del differenziamento delle gonadi tendono a svilupparsi come maschi, mentre le anguille che inizialmente crescono lentamente, plausibilmente tendono a svilupparsi come femmine. Paradossalmente, gli individui di sesso maschile mostrano la tendenza a predominare in condizioni di elevata densità. Ciò può essere dovuto al fatto che la strategia maschile di "crescita veloce e di maturazione precoce" aumenti le possibilità di un individuo di sopravvivere durante i periodi di competizione intraspecifica.

## 1.6 Argentinizzazione

Dopo diversi anni trascorsi ad alimentarsi nelle acque continentali, le anguille sessualmente immature vanno incontro ad una seconda metamorfosi pre-pubertale, nota come argentinizzazione. Tale trasformazione segna il passaggio dell'anguilla all'ultimo stadio di sviluppo, noto come anguilla argentina (**Fig. 8**), e ha la funzione di preadattare l'animale sia alla vita necto-pelagica oceanica (Sébert, 2003), sia alla maturazione sessuale che sarà completata solo durante la migrazione riproduttiva verso il Mar dei Sargassi. I fattori interni ed esterni responsabili dell'inizio dell'argentinizzazione non sono conosciuti. Larsson et al. (1990) ipotizzarono che, per compiere la metamorfosi, nell'anguilla era richiesto un certo livello di riserve lipidiche e stabilirono una soglia del 28%. Qualunque sia il limite, tuttavia, le riserve lipidiche probabilmente non costituiscono un prerequisito per avviare l'argentinizzazione, ma sono necessarie per la migrazione finale nel Mar dei Sargassi. Huang et al. (1998) suggerirono che l'ormone IGF-I (*Insulin-like Growth Factor-I*), prodotto dal fegato sotto il controllo dell'ormone della crescita (GH), rappresenti il collegamento fra la crescita e l'induzione della pubertà. L'IGF-I agisce sulla ghiandola pituitaria stimolando la produzione del GTH-II (*Gonado Tropic Hormone-II*) ed esercita un feedback negativo su GH (Rousseau et al., 1998). Conseguentemente, un picco di GH potrebbe stimolare

la secrezione di IGF-I. Tale situazione dovrebbe indurre la diminuzione del GH e, nel contempo, la sintesi del GTH-II il quale, stimolando la sintesi di steroidi sessuali (ossia androgeni), dovrebbe indurre le modifiche morfologiche necessarie all'anguilla per compiere il passaggio dalla vita bentonica, condotta in acque dolci e salmastre, alla vita necto-pelagica, condotta in mare aperto, e per effettuare la riproduzione. Dallo studio sperimentale condotto da Van Ginneken et al. (2007) è emerso che l'attività della Tiroide aumenta all'inizio dell'argentinizzazione, mostrando picchi nel rilascio degli ormoni TT3 e TT4. Tale evidenza ha trovato riscontro anche in altri lavori nei quali un incremento dell'attività tiroidea ed ipofisaria accompagnava la metamorfosi (Callamand & Fontaine, 1942; Etienne, 1959; Knowles & Vollrath, 1966). Anche negli studi di Han et al. (2004) i livelli ematici di tiroxina aumentavano in parallelo con l'espressione genica del TSH $\beta$ , supportando l'ipotesi che l'asse Ipotalamo-Ipofisi-Tiroide fosse correlato con il processo di argentinizzazione. Lo studio di Van Ginneken et al. (2007) ha mostrato anche un aumento dei livelli plasmatici del cortisolo. Esso svolge diversi ruoli: consente la mobilitazione delle riserve energetiche necessarie all'individuo durante la migrazione, favorisce l'adattamento all'acqua salata, facilitando la secrezione branchiale del Na<sup>+</sup> e presenta anche un effetto positivo nella produzione dell'LH sia *in vivo* che *in vitro*. I diversi effetti del cortisolo indicano che l'asse corticotropo può svolgere un ruolo importante nel corso dell'argentinizzazione, sia consentendo la mobilitazione di energia sia agendo nel momento della comparsa della pubertà. Durante il processo di argentinizzazione si notano anche cambiamenti morfo-anatomici. L'epidermide diventa spessa e la superficie totale delle scaglie aumenta considerevolmente durante la progressiva maturazione sessuale degli individui, cosicché la pelle diventi più dura e più resistente ai danni meccanici (Pankhurst, 1982). Il tessuto epidermico assume una diversa colorazione in seguito alla diminuzione progressiva degli xantofori e all'intensificazione, nella superficie ventrale, della concentrazione di guanina (Sinha & Jones, 1975) la quale contribuisce a creare lo strato riflettente che caratterizza la tipica livrea argentea degli adulti di anguilla sessualmente maturi. Negli esemplari immaturi, la maggior parte di materiale riflettente è collocata sotto lo strato di cromatofori più interno e solo una minima quantità si trova al di sotto dello strato più esterno. Al contrario, negli adulti maturi la maggior parte di guanina è collocata sotto lo strato più esterno, mentre al di sotto dello strato più interno quasi non c'è traccia. È stato osservato che l'argentinizzazione riveste un'importante funzione ecologica poiché aumenta il mimetismo delle anguille, riducendone la visibilità a potenziali predatori, durante la migrazione riproduttiva in mare aperto (Pankhurst & Lythgoe, 1982; Helfman et al.,

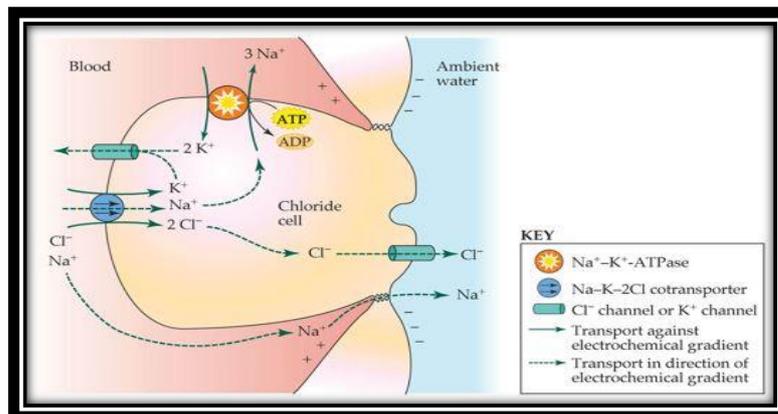
1987). Cambia la forma delle pinne pettorali: nell'anguilla gialla sono relativamente ampie e presentano una forma di cucchiaio, mentre nell'anguilla argentina si allungano ed assumono una forma appuntita il che rappresenta un tipico adattamento alla vita necto-pelagica. Il tratto alimentare subisce dei cambiamenti morfologici degenerativi. Pankhurst e Sorensen (1984) esaminarono la morfologia dell'intestino di esemplari di anguilla europea maturati artificialmente in laboratorio ed osservarono un decremento della dimensione e dello spessore della muscolatura. Inoltre notarono sia una drastica riduzione nel numero di villi e di cellule mucose sia cambiamenti strutturali nel tessuto epiteliale con il passaggio da cellule colonnari a cellule cuboidali più corte. Questa alterazione potrebbe facilitare il processo di osmoregolazione durante la migrazione diadroma e potrebbe essere vista come una sorta di "chiusura" di un apparato superfluo (Pankhurst & Sorensen, 1984), dal momento che le anguille argentine, durante il viaggio verso il Mar dei Sargassi, cessano di alimentarsi attivamente ed utilizzano, come fonte di energia, le riserve lipidiche che hanno accumulato durante la crescita nelle acque continentali.



**Fig. 8** esemplare di anguilla argentina (www.regione.fvg.it)

In corrispondenza delle branchie aumenta la dimensione ed il numero delle cellule del cloro (Fontaine et al., 1995; Sasai et al., 1998), necessarie per mantenere l'equilibrio osmotico all'interno dei fluidi corporei (**Fig.9**). Esse sono interposte tra le cellule pavimentose branchiali, deputate a realizzare gli scambi respiratori, e presentano un'elevata densità della pompa ionica  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi associata ai cotrasportatori  $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ , situati nella membrana basolaterale, e ad un canale per il  $\text{Cl}^-$ , collocato nella membrana apicale, rivolta verso l'esterno. Ciascuna cellula del cloro è associata a cellule accessorie. I cotrasportatori  $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  trasportano questi ioni dal sangue all'interno della cellula. Successivamente vengono escreti all'esterno tre ioni  $\text{Na}^+$  per opera della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi che, contemporaneamente, trasporta all'interno due ioni  $\text{K}^+$ . Gli ioni  $\text{K}^+$  ritornano nel liquido interstiziale, attraverso uno specifico canale,

mentre gli ioni  $\text{Cl}^-$  fuoriescono dalla cellula per diffusione, mediante un canale della membrana luminale. Essi, dunque, creano un potenziale transepiteliale che richiama gli ioni  $\text{Na}^+$ , i quali escono all'esterno seguendo la via paracellulare, esistente tra le cellule del cloro e le cellule accessorie. La secrezione di  $\text{NaCl}$  avviene contro gradiente osmotico ed il movimento del sale non è seguito dal movimento dell'acqua (Poli & Fabbri, 2012).



**Fig. 9** Schema riassuntivo di una cellula del cloro (Poli & Fabbri, 2012)

La funzione e la morfologia della vescica natatoria cambiano allo scopo di adattare le anguille argentine alla vita oceanica, consentendo loro di nuotare a profondità maggiori rispetto a quelle alle quali normalmente vivono durante la fase di crescita nelle acque continentali (Kleckner, 1980a, b; Kleckner & Kruger, 1981). Il tasso di deposizione di gas aumenta considerevolmente, i capillari sanguigni, situati ventralmente e dorsalmente l'entrata della vescica e formanti la rete mirabile, si accrescono in lunghezza e nel diametro del lume. A questi cambiamenti si aggiunge un incremento di cristalli di guanina nelle cellule parietali della vescica natatoria che servono a ridurre la perdita di gas tramite diffusione (Kleckner, 1980a, b). Grazie a tali modifiche, è ampiamente compensata la diminuzione del volume della vescica natatoria, causata dalla dall'aumento di pressione e dalla grande profondità. Il diametro degli occhi si ingrandisce, la retina continua a mantenere dimensioni larghe, anche se in modo sproporzionato – i.e. non diventa più piccola in relazione alla superficie del corpo come avviene in tutte le altre specie di pesci che sono state oggetto di studio (Teichmann, 1954). Il numero totale delle cellule a bastoncino aumenta considerevolmente, sebbene la densità dei fotorecettori resti costante, mentre si riduce la quantità di cellule cono. In aggiunta a questi cambiamenti morfologici, si osserva anche un cambiamento nella composizione di due particolari pigmenti retinici: la rodopsina e la porfiropsina. L'una è maggiormente presente nei pesci marini adattati alla vita bentonica e alla vita in acque

profonde ed è capace di assorbire lunghezze d'onda di 480-400 nm, mentre l'altra predomina nei pesci d'acqua dolce e assorbe lunghezze d'onda superiori ai 500 nm (Wald, 1959). Le anguille sessualmente immature possiedono una mescolanza di rodopsina e porfiropsina, gli individui ad uno stadio precoce di maturazione sessuale hanno una miscela di rodopsina e una piccola quantità di porfiropsina, mentre gli esemplari ad uno stadio tardivo di maturazione sessuale mostrano una predominanza di rodopsina e assenza di porfiropsina (Gordon et al., 1978). Mentre le anguille gialle mostrano una retina purpurea, non dissimile a quella osservata negli altri pesci d'acqua dolce, le anguille argentine assumono una pigmentazione dorata, simile a quella dei pesci che vivono nelle profondità marine. Tutti questi cambiamenti sono finalizzati ad aumentare la sensibilità oculare degli esemplari adulti, una volta raggiunte le grandi profondità marine (**Fig. 10**).

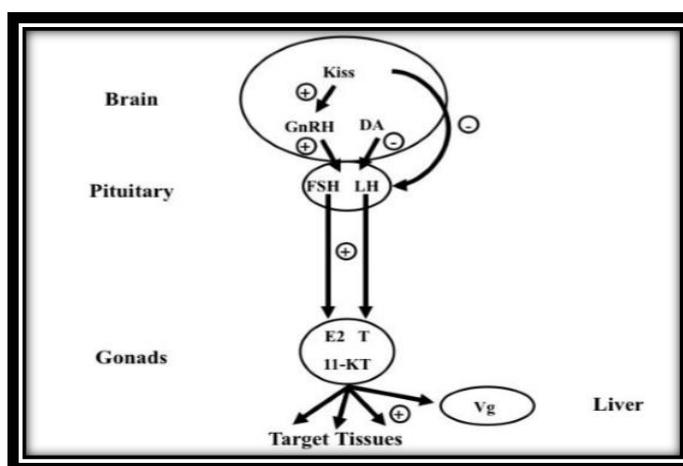


**Fig. 10** anguilla gialla (sopra) e anguilla argentina (sotto) a confronto ([www.EelRegulations.co.uk](http://www.EelRegulations.co.uk))

### 1.7 Maturazione sessuale

Poiché l'arginizzazione è un cambiamento pre-pubertale, si suppone che le anguille completino la maturazione sessuale durante la migrazione oceanica, terminando tale processo una volta raggiunte le aree di riproduzione (Dufour et al., 2003). Tuttavia gli esatti meccanismi di maturazione sessuale e di riproduzione sono avvolti nel mistero dal momento poiché fino ad ora nessun anguilla argentina matura è stata osservata durante la fase migratoria o è stata catturata nei siti riproduttivi. Nel complesso, la maturazione sessuale nelle anguille, come in tutti i vertebrati, è controllata dall'asse Ipotalamo-Ipofisi-Gonadi (**Fig. 11**). I neuroni neuroendocrini localizzati nella regione preottica dell'Ipotalamo modulano il rilascio di GnRH (*Gonadotropin Releasing*

*Hormone*), di cui l'anguilla possiede due forme molecolari: una simile al GnRH dei mammiferi e l'altra simile al GnRH-II del pollo (King et al., 1990). Esso stimola l'Ipofisi alla sintesi ed al rilascio delle gonadotropine pituitarie (GTH-I e GTH-II): l'ormone luteizzante (LH) e l'ormone follicolo-stimolante (FSH). Durante il processo di argentinizzazione, in *A. anguilla* (Aroua et al., 2005) sono state osservate variazioni nei livelli di mRNA delle subunità  $\alpha$  e  $\beta$  delle gonadotropine, con un iniziale aumento dell'espressione di FSH $\beta$  ed un aumento tardivo dell'espressione di LH $\beta$  (Aroua et al., 2005). Questi dati suggeriscono che l'ormone follicolo-stimolante potrebbe giocare un ruolo nella fase precoce di attivazione delle gonadi, mentre l'ormone luteizzante potrebbe entrare in funzione più tardi durante il processo di argentinizzazione.



**Fig. 11** Asse ipotalamo-ipofisi-gonadi nell'anguilla (Rousseau et al., 2014)

Negli ovari delle femmine, l'FSH favorisce la sintesi di testosterone all'interno delle cellule della teca. Esso viene trasformato in 17 $\beta$ -estradiolo (E2) dentro le cellule della granulosa e viene rilasciato in circolo (le cellule della teca e le cellule della granulosa formano, rispettivamente, lo strato esterno e lo strato interno dei follicoli ovarici). In risposta agli alti livelli plasmatici di estradiolo, gli epatociti, provvisti dei necessari recettori (*Esr1*, recettore per gli estrogeni di tipo 1; *Esr2*, recettore per gli estrogeni di tipo 2) (Burzawa-Gérard et al., 1994), liberano le vitellogenine (Vtgs), che rappresentano una particolare categoria di fosfolipoglicoproteine ed appartengono alla famiglia delle LLTP (*Large Lipid Transfer Proteins*) (Babin et al., 1999). Un gran numero di studi ha dimostrato che i teleostei possiedono tre differenti vitellogenine: VtgA, VtgB e VtgC, ciascuna delle quali viene incorporata negli oociti. Passando dai capillari della teca allo strato della granulosa, le Vtgs raggiungono la superficie degli oociti in corrispondenza della quale si legano a specifici recettori di membrana (VtgR) e vengono assorbiti mediante endocitosi. Le Vtgs rappresentano i precursori del tuorlo (o vitello), la cui

deposizione negli ovociti mediante il processo della “vitellogenesi”, rappresenta una fase cruciale del loro sviluppo (Poli & Fabbri, 2012). In seguito alla loro proteolisi si forma prevalentemente la lipovitellina, una proteina contenente circa il 20% in peso di lipidi impiegati sia come riserva energetica sia per la sintesi delle membrane plasmatiche. Un altro prodotto che si forma è la fosvitina, una proteina a cui si legano il fosforo ed il calcio. Essa ricopre il ruolo di rendere disponibili i minerali di cui l'embrione avrà bisogno per la crescita e per svolgere le funzioni metaboliche. Nei testicoli degli individui di sesso maschile, l'ormone FSH stimola le cellule di Leydig alla sintesi dell'11-chetotestosterone (11-KT) il quale, a sua volta, induce le cellule del Sertoli a produrre mediatori (IGF-I) che stimolano la proliferazione degli spermatogoni e la divisione meiotica, determinando la trasformazione prima in spermatociti e poi in spermatici. Questi ultimi non si dividono, ma si trasformano in spermatozoi flagellati. L'ormone LH, invece, agisce sia sulle cellule di Leydig, sia sulle cellule del Sertoli, stimolando la produzione di ormoni che controllano le fasi finali della maturazione degli spermatozoi e l'acquisizione della motilità (Poli & Fabbri, 2012). La spermatogenesi, nei maschi, è fortemente influenzata dagli acidi grassi che svolgono funzioni molto importanti, fra cui: regolare la produzione degli ormoni steroidei, assicurare l'appropriata composizione della membrana citoplasmatica degli spermatozoi (Dupont et al., 2014) e conferire alle membrane delle cellule spermatiche la fluidità necessaria per la fusione con gli ovociti durante l'atto della fecondazione (Wathes et al., 2007). In particolar modo, gli acidi grassi poli-insaturi (PUFAs), che sono i principali componenti del liquido seminale delle anguille, svolgono ruoli fondamentali durante la formazione dei gameti maschili. Ad esempio: l'acido arachidonico (AA; 20:4n-6) stimola la produzione di testosterone tramite la sintesi di prostaglandine, specialmente PGE<sub>2</sub>, e favorisce l'aumento di velocità degli spermatozoi. L'acido  $\alpha$ -linolenico (ALA; 18:3 n-3) e l'acido linoleico (LA; 18:2 n-6) aumentano la motilità degli spermatozoi e sono i precursori di altri due acidi grassi molto importanti, gli n-3 acido eicosapentaenoico (EPA; 20:5 n-3) e acido docosaesaenoico (DHA; 22:6 n-3) i quali sia inducono la produzione di altre prostaglandine (Wade et al., 1994; Wathes et al., 2007) sia rappresentano i principali costituenti delle membrane plasmatiche degli spermatozoi.

## 1.8 La pesca dell'anguilla nelle Valli di Comacchio

Le Valli di Comacchio sono una vasta zona umida costiera compresa fra le province di Ravenna e Ferrara e situata all'interno del Parco Regionale del Delta del Po, tra il fiume Po di Volano ed il fiume Reno. Esse costituiscono la laguna costiera più estesa d'Italia, con una superficie pari a 14.383 ha. Il complesso lagunare (**Fig. 12**) è formato da 4 bacini di acqua salmastra (Valle Lido di Magnavacca, Valle Fossa di Porto, Valle Campo e Valle Fattibello) collegati al Mar Adriatico attraverso il canale di Porto Garibaldi, il Canale Logonovo e il Canale Bellocchio-Gobbino. Questi specchi d'acqua si sono formati soprattutto con la crisi e l'estinzione del ramo principale del Delta del Po in epoca etrusco-romana, l'Eridano. In epoca medioevale, quindi, l'ambiente palustre ha preso il sopravvento. Dopo il X secolo, con l'ulteriore spostamento verso nord del Delta del Po e l'estinzione del ramo meridionale denominato "Primaro", si sono accentuati i fenomeni di rimonta delle acque marine. In questo modo si è formato quell' esteso insieme di valli salmastre che fino ad un secolo fa caratterizzava la parte sud-orientale della provincia di Ferrara e che è progressivamente stato prosciugato dall'uomo. L'ultima grande bonifica, compiuta negli anni '60 del XX secolo, ha ridotto di 5 volte l'estensione delle valli fino a portarle alle attuali condizioni. La profondità del complesso lagunare è assai variabile: mediamente 60 cm, con massimi di 1,5-2 m. I fondali sono per lo più costituiti da argille, limi e materiali bioclastici, più raramente da sabbie. La salinità può raggiungere il 45% nei mesi più caldi e diminuire fino al 20% durante l'inverno, a seconda della piovosità e della regolazione del ricambio idrico con il mare (Carrieri et al., 1992), in genere diminuisce da N verso S per l'influenza delle acque del Reno. La temperatura dell'acqua può variare tra i 0 e i 30°C nel corso dell'anno. In virtù dell'importanza che rivestono dal punto di vista della biodiversità, le Valli di Comacchio sono classificate come sito di interesse comunitario (S.I.C), ai sensi della direttiva 92/43/CEE; come zona di protezione speciale (Z.P.S), ai sensi della direttiva 79/409/CEE e come area Ramsar, ai sensi della Convenzione sulle zone umide di importanza internazionale (Ramsar, Iran 1971)



**Fig. 12** Valli di Comacchio, veduta aerea ([www.parcodeltapo.it](http://www.parcodeltapo.it))

La pesca e l'allevamento dell'anguilla nelle Valli di Comacchio è esercitata da secoli; le prime realtà risalgono al 1300 con la "vallicoltura", che rappresenta una particolare forma di piscicoltura, praticata tradizionalmente nelle lagune costiere. Lo strumento principe impiegato per la cattura delle anguille è rappresentato dal "lavoriero" (**Fig.13**), un attrezzo da posta fisso a forma di V, sviluppato dai pescatori di Comacchio nella seconda metà del XVI secolo, che viene collocato nel canale di comunicazione tra laguna e mare. Esso è una formato da una struttura in legno provvista di griglie in metallo ed è costituito da una serie di bacini comunicanti che permettono di catturare il pesce durante lo spostamento dalle Valli verso il mare per iniziare la migrazione riproduttiva.



**Fig. 13** Lavoriero ([www.regione.fvg.it](http://www.regione.fvg.it))

## **1.9 Fattori impattanti sulla sopravvivenza**

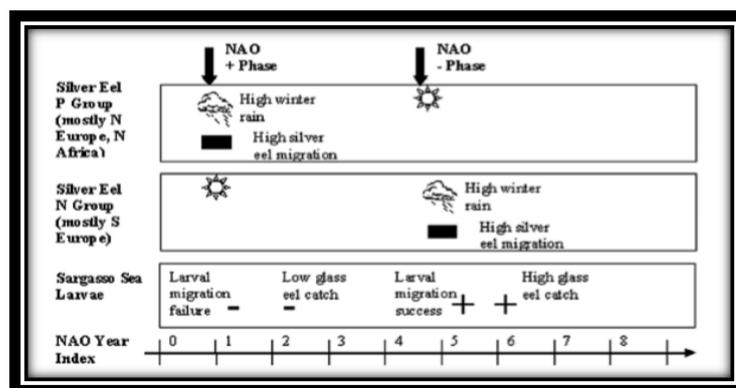
Considerata la complessità del suo ciclo vitale, i fattori che influenzano la sopravvivenza e la dinamica delle popolazioni dell'anguilla europea sono molteplici e di natura differente. Essi spaziano da cause di origine naturale a cause di origine antropica e riguardano tutti gli stadi di sviluppo della specie.

### **1.9.1 Cause di origine naturale**

Negli ultimi 40 anni, si sono verificati forti cambiamenti di temperatura del Mar dei Sargassi, risultati in un riscaldamento degli strati superficiali dell'oceano (0-100 m) da meno di 21.2°C nel 1971 a più di 22.0°C negli anni 2000. Tali cambiamenti hanno influenzato notevolmente gli indici di reclutamento delle anguille ceche. Essi sono aumentati nei primi anni del 1970, hanno raggiunto un picco all'inizio del 1980 e, successivamente, hanno incominciato a diminuire. In meno di 25 anni, il reclutamento delle ceche è calato più del 90%. È stato osservato da Bonhommeau et al. (2008) che l'aumento di temperatura, dovuto al cambiamento climatico, è correlato negativamente con la sopravvivenza dei leptocefali e, di conseguenza, con il reclutamento delle anguille ceche. L'eccessivo riscaldamento degli strati oceanici superficiali ostacola i processi di rimescolamento verticale della colonna d'acqua, aumentandone la stratificazione, e riducendo la risalita di nutrienti. Di conseguenza si sviluppa una comunità fitoplanctonica limitata con una ridotta produzione primaria (PP). Ciò esercita un controllo bottom-up negativo sulla sopravvivenza degli stadi larvali. Poiché i leptocefali vivono principalmente negli strati superficiali della colonna d'acqua, è probabile che la loro crescita, il loro trasporto e l'eventuale reclutamento siano influenzati dalla variabilità dei processi biologici e fisici che avvengono nei primi 100 metri di profondità. M Miller, KD Friedland, D Knights, DJ Jellyman e K Tsukamoto (dati non pubblicati) hanno suggerito che i cambiamenti associati ai pattern atmosferici possano alterare le caratteristiche biologiche degli strati superficiali dove i leptocefali si alimentano. Friedland et al. (2007) hanno suggerito che la fluttuazione in latitudine dell'isoterma di 22.5°C, che rappresenta un indicatore del limite settentrionale dell'area di riproduzione dell'anguilla europea, può influenzare sia la posizione della zona riproduttiva sia il trasporto dei leptocefali al di fuori del Mar dei Sargassi, aumentando il processo di ritenzione delle larve al suo interno. Inoltre, anche i cambiamenti nella

circolazione dei venti possono alterare la possibilità di lasciare il Mar dei Sargassi da parte dei leptocefali.

Di grande importanza sono gli effetti del pattern di circolazione atmosferica noto come Oscillazione Nord Atlantica (NAO) sul comportamento migratorio delle anguille argentine femmina e sulla sopravvivenza degli stadi giovanili. Kettle et al. (2008) hanno condotto uno studio mirato a comprendere l’impatto della NAO sulla migrazione trans-Atlantica dell’anguilla europea. Dalle ricerche compiute, essi hanno ipotizzato un collegamento fra le fluttuazioni della NAO, il successo riproduttivo nel Mar dei Sargassi, la cattura delle ceche e l’approdo delle anguille presso le coste del Nord Europa-Nord Africa e Sud Europa. Durante la “fase positiva” della NAO, si registra un aumento delle precipitazioni piovose nell’Europa Settentrionale e nell’Africa Settentrionale (in contrapposizione alle condizioni di siccità caratterizzanti l’Europa Meridionale). Ciò induce la migrazione delle anguille argentine femmina dal Nord Europa verso i siti riproduttivi. Dal momento che la “fase positiva” è associata anche da un’elevata stratificazione del Mar dei Sargassi ed alla riduzione della disponibilità di cibo per le larve appena nate, il reclutamento larvale fallisce e, di conseguenza, si registrano basse catture di anguille ceche lungo le coste Europee l’anno seguente. Al contrario, la “fase negativa” della NAO, è associata ad elevata piovosità in Europa Meridionale e a concomitanti condizioni ambientali favorevoli nel Mar dei Sargassi. Questa combinazione di fattori porta ad un elevato successo riproduttivo delle anguille argentine, giungenti dalle zone meridionali del Continente Europeo, seguito sia da un maggior reclutamento di larve sia da una gran quantità di anguille ceche catturate lungo le coste Europee l’anno seguente (**Fig. 14**)



**Fig.14** Schema dell’ipotetico collegamento fra la NAO, il successo migratorio nel Mar dei Sargassi, le catture delle anguille ceche e l’approdo delle anguille lungo le coste Europee e Nordafricane (Kettle et al. 2008)

Oltre alle fluttuazioni atmosferico-climatiche e agli eventi oceanografici, esistono altri fattori naturali che influenzano la sopravvivenza le dinamiche delle popolazioni di anguilla europea come la predazione, le malattie ed il parassitismo. In particolare, va segnalata l'infezione del nematode *Anguillicola crassus*, che può essere considerata come una delle principali cause del declino degli stock di anguilla europea (**Fig. 15**). Questo parassita è originario dell'Asia Orientale ed il suo ospite naturale è rappresentato dall'anguilla giapponese (*Anguilla japonica*, Temminck & Schlegel, 1846). La contaminazione della specie europea è avvenuta a causa dell'introduzione di alcuni esemplari infetti di *A. japonica* per scopi commerciali (Neumann, 1985; Peters & Hartmann, 1986; Wielgoss et al., 2008). Lo stadio adulto di *Anguillicola crassus* vive all'interno della vescica natatoria. L'infezione causa il rigonfiamento della parete e la contrazione della dimensione della vescica (Haenen et al., 1989; Banning & Haenen, 1990; Beregi et al., 1998). Poiché il parassita adulto si nutre di sangue, lo scambio di gas ne risulta compromesso (Würtz et al., 1996) e si riduce la disponibilità di ossigeno (Haenen et al., 2010). L'efficienza natatoria diminuisce e si riducono sia il successo della migrazione transoceanica (Feunteun, 2002) sia, di conseguenza, la capacità riproduttiva delle anguille argentine (Székely et al., 2003).



**Fig.15** Infestazione di *Anguillicola crassus* nella vescica natatoria di un anguilla. L'esemplare più grande è femmina; gli esemplari di media taglia sono maschi; gli esemplari più piccoli sono pre-adulti (Tesch, 2003)

## 1.9.2 Cause di origine antropica

Durante il loro ciclo biologico, le anguille devono migrare due volte fra il mare e le acque dolci interne. Come per le altre specie diadrome, gli sbarramenti sui fiumi possono ridurre più o meno completamente la connettività fra gli idrosistemi e l'accessibilità per gli habitat a monte dei corsi d'acqua per le giovani anguille che arrivano dal mare. Gli sbarramenti sono stati indicati spesso come i responsabili per la diminuzione o, addirittura, l'estinzione delle popolazioni locali in Europa (Legault & Porcher, 1989; Feunteun et al., 1992, 1998b; Chancerel, 1994; Moriarty & Dekker, 1997). Molti fiumi Europei sono stati pesantemente ostacolati dalla costruzione di dighe. È noto che il passaggio attraverso le turbine induce un'elevata mortalità (Larinier & Dartiguelongue, 1989) e può arrestare le dinamiche di migrazione verso valle (Feunteun et al. 1998a, 2000). Le anguille sono spesso ferite dalle turbine non solo a causa della loro forma affusolata, ma specialmente perché, essendo migratori obbligati, esse seguono la corrente principale ed inevitabilmente passano dai complessi idroelettrici. Si pensa che anche le ostruzioni chimiche rappresentate dagli scarichi industriali ed urbani contribuiscano a ridurre la connettività dei sistemi fluviali (Moriarty & Dekker, 1997). Di conseguenza, gli esperti in materia hanno stimato che fra i 123.800 km<sup>2</sup> di habitat per le anguille disponibili in Europa, il 33% (41.800 Km<sup>2</sup>) risulta inaccessibile per ragioni naturali o artificiali (Moriarty & Dekker, 1997). Di grande importanza è l'impatto dovuto alla perdita di habitat dovuto a bonifiche e a riduzioni dell'estensione di zone umide ed estuarine. Non è nota la superficie totale che è andata perduta, ma diversi studi hanno ipotizzato che il 50-90% delle zone umide è stato distrutto in Europa durante l'ultimo secolo (Feunteun, 2002).

La fase di acqua dolce dell'anguilla è estremamente sensibile all'inquinamento. L'ecologia bentonica e l'elevato immagazzinamento di grassi nei tessuti, le rende particolarmente vulnerabili agli alti livelli di contaminanti presenti nei sedimenti attraverso il bioaccumulo e la biomagnificazione (Colligns et al., 1996; Belpaire & Goemans, 2007). A causa della mobilitazione delle riserve lipidiche durante la migrazione verso il Mar dei Sargassi, le sostanze chimiche bioaccumulate vengono rilasciate nel sangue dei futuri riproduttori i quali possono subire effetti tossici acuti o cronici, diminuendo la loro capacità riproduttiva, oppure possono lasciare un retaggio letale nel sacco vitellino delle larve (Robinet & Feunteun, 2002; Van Ginneken & Maes, 2005; Palstra et al, 2006; Van Ginneken et al., 2009). L'accumulo di policlorobifenili (PCBs) ha conseguenze sulla qualità dei gameti, sulle uova e quindi sulla fertilità

(Palstra et al., 2005). I PCB sono negativamente correlati con la sopravvivenza e lo sviluppo larvale. È stato osservato sperimentalmente che l'esposizione di uova di anguilla argentina a simili contaminanti induceva malformazioni nell'embrione come la presenza di un vistoso edema nel sacco del tuorlo, la deformazione della regione cefalica e l'assenza di battito cardiaco (Palstra et al., 2006). Gony (1990) ha condotto uno studio sperimentale in cui ha descritto gli effetti dell'esposizione al cadmio ( $\text{Cd}^{2+}$ ) nell'anguilla europea. Egli ha osservato il verificarsi di perturbazioni strutturali e funzionali nel tessuto branchiale come il rigonfiamento delle lamelle primarie e secondarie causato dall'ipertrofia dell'epitelio e dall'aumento di lamelle secondarie dopo due ore di esposizione ad una concentrazione pari a  $5\mu\text{g/L}$  di  $\text{Cd}^{2+}$ . Nello stesso momento è apparso del melanismo nei vasi sanguigni branchiali. In base alla risposta dei singoli individui al metallo pesante, erano apparsi anche altri danni come l'esfogliazione dell'epitelio, il collasso e la fusione delle lamelle. Inoltre è stato osservato che *in vitro* il  $\text{Cd}^{2+}$  esercita un'inibizione dose-dipendente sull'attività della pompa  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasi e dell'anidasi carbonica nell'intestino e nelle branchie dell'anguilla, causando una probabile alterazione dell'equilibrio acido-base e dell'osmoregolazione (Lionetto et al., 1998). Fabbri et al. (2003) hanno riportato che il  $\text{Cd}^{2+}$  ed il mercurio ( $\text{Hg}^{2+}$ ) possono danneggiare un'importante *pathway* di trasduzione del segnale intracellulare coinvolto nel controllo adrenergico del metabolismo del glucosio nel fegato dell'anguilla. È stato osservato che concentrazioni micromolari di entrambi i metalli pesanti avevano inibito l'azione dell'enzima adenilato ciclasi, riducendo significativamente i livelli di AMP ciclico modulati dall'adrenalina negli epatociti, causando, di conseguenza, una diminuzione dell'output di glucosio. Santos e Hall (1990) hanno studiato l'effetto del piombo inorganico (Pb) sulla composizione biochimica del sangue dell'anguilla mediante l'esposizione di alcuni individui (peso medio 50 g) per 30 giorni a  $30\mu\text{g/L}$  di Pb. I risultati hanno dimostrato un aumento nel numero di linfociti ed un innalzamento dei livelli plasmatici di lattato negli esemplari esposti al Pb.

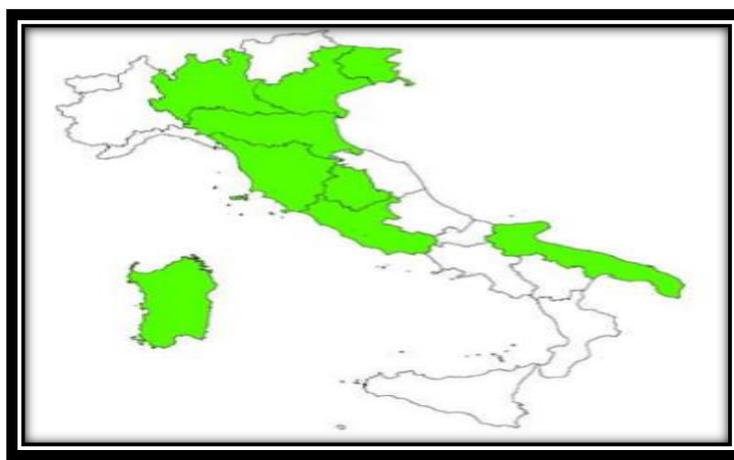
L'esposizione a diversi insetticidi causa scompensi nel metabolismo dell'anguilla: il fosfororganico fenitrothion (Sancho et al., 1996), e l'organoclorurato endosulfano (Gimeno et al., 1994, 1995) danneggiano il metabolismo dei carboidrati provocando una riduzione delle riserve di glicogeno nella muscolatura e nel fegato, l'aumento di glucosio nel tessuto muscolare e nel sangue e una diminuzione del lattato nel tessuto branchiale, nel tessuto epatico, nel sangue e nei muscoli. Il clororganico lindano

influenza il sistema cardiovascolare e respiratorio, provocando bradicardia, iperventilazione e danneggiando considerevolmente il cuore (Mourad, 1990, 1991). Janicki e Kinter (1971) hanno riportato che il DDT danneggia l'assorbimento intestinale dei fluidi nelle anguille adattate all'acqua marina; il DDT inibisce anche l'attività delle pompe  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasi e  $\text{Mg}^{2+}$  negli omogenati di mucosa intestinale e filamenti branchiali (Kinter et al., 1972). Fernandez-Vega et al. (1999) hanno esposto alcuni esemplari di anguilla a concentrazioni subletali dell'erbicida thiobencarb. I risultati hanno mostrato che il thiobencarb limita significativamente l'attività acetil colinesterasi (AChE). Questo enzima influenza la lipidogenesi inducendo una veloce mobilizzazione dei lipidi per mezzo dell'attività muscolare involontaria e continua e, successivamente, riduce l'efficienza migratoria ed il successo riproduttivo delle anguille femmina (Corsi et al., 2005). È stato dimostrato che anche il fenitrothion influenza il metabolismo lipidico: le anguille testate in laboratorio mostravano un accresciuto consumo di grassi in presenza di questo insetticida organofosfato (Sancho et al., 1998) e quindi una minor efficienza nell'immagazzinamento delle riserve lipidiche.

### **1.10 Stato di conservazione dell'anguilla**

Dekker (2003) ha riportato che nell'arco del decennio compreso fra gli anni '70 ed '80 la dimensione delle popolazioni di anguilla europea è stata soggetta ad un calo del 90%. Gli stock hanno dimensioni inferiori ai limiti biologici per la sopravvivenza dell'intera popolazione poiché tutti gli stadi del ciclo vitale della specie hanno subito un vistoso declino (ICES, 2002). È altamente probabile che la riduzione del reclutamento dei giovanili potrebbe innescare il collasso di tutta la popolazione determinando, conseguentemente, sia la grave perdita di un'importante componente della biodiversità (Beaulaton & Briand, 2007), sia un rilevante danno a livello economico dal momento che l'anguilla rappresenta una specie di punta nei settori della pesca e dell'acquacoltura in Italia (Ciccotti et al., 2000), e nel resto dell'Europa. Nel 2007 l'anguilla europea è stata inserita nell'allegato B del Regolamento CE 338/97 dalla Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) e, nel 2008, l'International Union for conservation of Nature (IUCN) l'ha inclusa nella lista rossa come specie a rischio di estinzione. L'Unione Europea, recependo le criticità evidenziate nel corso degli anni, in data 18 settembre del 2007, ha approvato il Regolamento CE N.1100/2007, che costituisce il punto di partenza per riportare lo stock di anguilla europea a livelli sostenibili. Nello specifico, ad ogni Paese membro viene richiesto di stendere dei Piani

di gestione nazionali, il cui scopo primario consiste nell'individuazione di misure tali da consentire ad almeno il 40% delle anguille argentine di raggiungere il mare per effettuare la migrazione riproduttiva. In Italia, in accordo con il Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali, è stato deciso che ciascuna Regione elaborerà il proprio Piano, il quale rappresenterà, successivamente, la base per il Piano nazionale. Si attribuisce, così, ad ogni Regione la facoltà di identificare le misure ritenute più idonee per ripristinare lo stock di anguilla e la tempistica necessaria a raggiungere l'obiettivo del 40%. La pesca all'anguilla è stata vietata nelle Regioni che non hanno aderito al Piano nazionale (**Fig. 15**)



**Fig.15** Regioni dove è stato predisposto un Piano di gestione per l'anguilla ([www.regione.fvg.it](http://www.regione.fvg.it))

In territorio Italiano, il Piano nazionale è supportato prevalentemente dalle strategie delle Regioni dell'alto Adriatico, fra le più rappresentative a livello nazionale per le qualità ambientali delle zone umide costiere e dell'entroterra, dei corsi d'acqua sfocianti nel mare e delle vie d'acqua interne. Il piano di gestione prevede l'applicazione di una serie di misure come:

- ✓ Riduzione della pesca commerciale
- ✓ Restrizione alla pesca ricreativa, misure di ripopolamento
- ✓ Misure strutturali per rendere guadabili i fiumi e migliorare gli habitat fluviali, unitamente ad altre misure ambientali
- ✓ Trasporto delle anguille argentine dalle acque interne ad acque dalle quali possano migrare liberamente verso il Mare dei Sargassi
- ✓ Lotta ai predatori
- ✓ Spegnimento temporaneo delle turbine per la produzione di energia elettrica, misure nel campo dell'acquacoltura



## 2. SCOPO DELLA RICERCA

Il ciclo biologico delle anguille adulte è contraddistinto da due stadi di sviluppo. Nel primo, gli individui sessualmente immaturi vivono nelle acque continentali per diversi anni, dove si accrescono ed accumulano riserve lipidiche con l'alimentazione. Nel secondo, invece, gli esemplari iniziano la migrazione in mare, muovendosi verso i siti di riproduzione e andando incontro ad un processo di maturazione sessuale che, almeno nelle femmine, sarà definitivamente completato all'arrivo nel Mar dei Sargassi. Il passaggio dalla fase di acqua dolce (anguilla gialla) alla fase migratoria marina (anguilla argentina) comporta un ampio spettro di cambiamenti necessari per adattare l'animale alle nuove condizioni di vita. Benché le principali differenze fra lo stadio giallo ed argentino siano state descritte (Durif et al., 2005), ancora poco si conosce a proposito delle dinamiche e, soprattutto, dei processi molecolari che regolano l'argentinizzazione. Pertanto, nel lavoro di Tesi qui presentato è stato condotto uno studio volto a verificare l'esistenza di eventuali differenze nei profili trascrizionali dei recettori adrenergici  $\alpha_1$  e  $\beta_2$  in femmine di anguilla europea (*Anguilla anguilla*) a diverso stadio di maturazione sessuale. L'RNA totale è stato estratto da 5 diversi tessuti (fegato, muscolo, cuore, branchie, cervello) di anguille femmina campionate nella laguna di Commacchio (Italia) in quattro diversi periodi dell'anno. Uno studio precedente (Franzellitti et al., 2015) aveva dimostrato che questi 4 gruppi di anguille rappresentavano 3 diversi stadi di argentinizzazione che comprendevano lo stadio FII (anguilla gialla) e lo stadio FIV (anguilla argentina). L'espressione dei recettori adrenergici  $\alpha_1$  e  $\beta_2$  è stata valutata mediante PCR quantitativa real time. Tramite questa tecnica è stato possibile ottenere una quantificazione precisa dei prodotti genici oggetto del presente lavoro di Tesi anche in tessuti in cui tali recettori, che rappresentano una classe di proteine la cui espressione è strettamente regolata, sono espressi a livelli relativamente bassi. I risultati ottenuti nel presente lavoro di Tesi hanno lo scopo di contribuire alla comprensione delle basi molecolari del controllo adrenergico della fisiologia delle anguille e della sua eventuale regolazione durante il processo di argentinizzazione. I risultati di questo studio si pongono in continuità con altri lavori precedentemente svolti nel nostro laboratorio o presenti nella letteratura scientifica che cercano di delineare un quadro il più preciso possibile riguardante i processi endocrini che stanno alla base dell'argentinizzazione, integrando ulteriori nozioni utili alla corretta comprensione di questo particolare processo di maturazione sessuale.



### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Campionamento

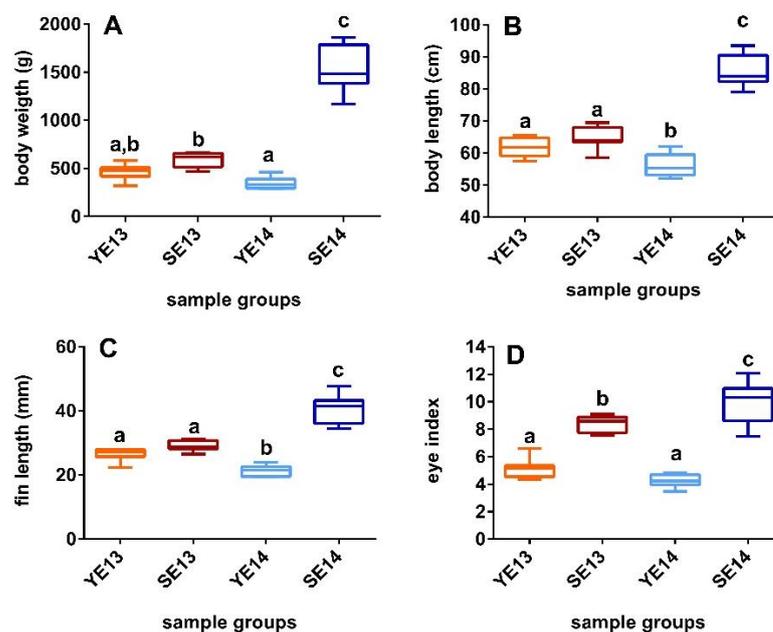
Per il mio lavoro sono stati utilizzati campioni prelevati da esemplari di anguilla europea (*Anguilla anguilla*) catturati nelle Valli di Comacchio (Mare Adriatico Settentrionale, Italia). Gli stessi esemplari sono stati utilizzati in precedenza nello studio di Franzellitti et al. (2015) per la messa a punto di un protocollo di PCR quantitativa real time per la valutazione di profili di espressione di trascritti da utilizzare come markers molecolari dello stadio di argentinizzazione.

Gli animali sono stati campionati in 4 periodi differenti dell'anno. Le anguille argentine sono state catturate con l'ausilio del lavoriero nel periodo compreso tra Ottobre e Novembre 2013 (SE13) (temperatura media dell'acqua 14°C) e tra Novembre e Dicembre 2014 (SE14) (temperatura media dell'acqua 12°C), poiché le stesse lasciano la laguna di Comacchio solamente durante la stagione invernale. La cattura delle anguille gialle invece è stata effettuata a Ottobre 2013 (YE13) e Aprile 2014 (YE14), quando la temperatura media dell'acqua si era assestata attorno ai 15°C. Per ciascun periodo di campionamento sono stati raccolti otto esemplari.

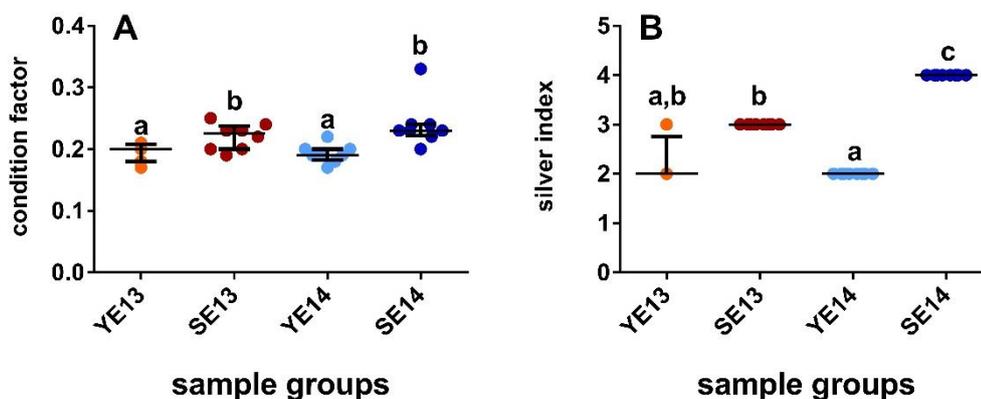
#### 3.2 Misure morfometriche

I dati riguardanti i parametri morfometrici sono riportati da Franzellitti et al. (2015). Sono stati misurati la lunghezza del corpo (L), il peso del corpo (W), la lunghezza della pinna pettorale (FL). In accordo con il metodo proposto da Pankhurst (1982), è stato calcolato l'indice dell'occhio (Eye Index, EI) utilizzando il diametro verticale (Dv) e orizzontale (Dh) dell'occhio e la lunghezza totale del corpo,  $EI = [0,25 \times (Dv + Dh) \times \pi/L]$ . Esso stabilisce un valore soglia pari a 6.5 per le anguille sessualmente mature (**Fig. 15**). Da questi parametri sono stati calcolati sia il Fattore di Condizione (K),  $K = 10^5 \times W \times L^{-3}$  (Fulton, 1904), sia l'indice di argentinizzazione (Silver Index, SI) in accordo con Durif et al. (2005), prendendo in considerazione la lunghezza corporea totale ed il peso, la lunghezza della pinna pettorale ed il diametro medio dell'occhio, quest'ultimo basato sui Dv e Dh (**Fig. 16**). Con l'impiego di questi indici è stato possibile effettuare la caratterizzazione di ciascun esemplare, definendone il sesso e lo stadio di argentinizzazione. Il SI classifica le femmine in cinque stadi di maturazione (Durif et al., 2005): gli stadi FI e FII corrispondono alla fase di crescita/fase trofica (corrispondente

all'iniziale fase di anguilla gialla) in cui le gonadi mostrano piccoli oociti primari non-vitellogenici, con un denso ooplasma e un denso nucleo provvisto di un largo nucleolo (Aroua et al., 2005); i livelli di GTH-II sono vicini allo zero. Lo stadio FIII corrisponde alla fase pre-migratoria o fase gialla/argentina. Esso è caratterizzato dall'inizio dello sviluppo gonadico, gli oociti sono più larghi e si osservano piccole vescicole lipidiche nell'ooplasma. Ciò indica l'inizio dell'incorporazione di riserve lipidiche negli oociti (vitellogenesi endogena) (Aroua et al., 2005). Gli stadi FIV ed FV corrispondono alla fase argentina. Rispettivamente, nello stadio FIV le femmine iniziano a digiunare e a produrre gonadotropine mentre nello stadio FV si ha la regressione del tratto digestivo, l'allungamento della pinna pettorale e i livelli più alti di gonadotropine; gli oociti sono ulteriormente espansi con un largo nucleo e piccoli nucleoli in posizione periferica e numerose vescicole lipidiche nell'ooplasma, che rappresenta lo stadio "oil-droplet" della vitellogenesi (Aroua et al., 2005). Le anguille dei gruppi SE13 e SE14 sono state classificate nello stadio FIII (femmine argentine pre-migratrici) e nello stadio FIV (femmine argentine migratrici), rispettivamente. Tutte le anguille del gruppo YE14 sono state classificate nello stadio FII (femmine gialle in fase trofica), mentre 2 individui del gruppo YE13 sono state classificate come FIII (fase pre-migratoria) e 6 come FII. Tutti gli esemplari sono stati sacrificati con una rapida decapitazione e, successivamente, sono stati estratti i tessuti necessari alle analisi: fegato, muscolo, cuore, branchie e cervello. Prima di essere sezionato, il fegato è stato sottoposto ad una perfusione con soluzione fisiologica (Mommsen & Moon, 1990), per eliminare il sangue. I tessuti estratti sono stati congelati in azoto liquido e conservati ad una temperatura di -80°C.



**Fig. 15** Variabilità fra gruppi dei parametri biometrici misurati nelle anguille campionate nella Laguna di Comacchio. I box plots rappresentano il quartile medio, superiore ed inferiore per il peso corporeo (A), per la lunghezza corporea (B), per la pinna pettorale (C) e per l'indice dell'occyo (eye index) (D). Le lettere diverse indicano differenze statistiche ( $p < 0.05$ ; test di Mann-Whitney,  $n = 8$ ) (Franzellitti et al., 2015)



**Fig. 16** Variabilità fra gruppi dei valori Fattore di Condizione (A) e del Silver Index (B) stimati nelle anguille campionate nella Laguna di Comacchio. Le linee orizzontali indicano i valori medi; le barre di errore rappresentano il quartile superiore ed il quartile inferiore; i punti rappresentano i valori calcolati per le singole anguille all'interno di ciascun gruppo. Le lettere diverse indicano differenze statistiche ( $p < 0.05$ ; test di Mann-Whitney,  $n = 8$ ) (Franzellitti et al., 2015).

### 3.3 Estrazione e purificazione dell'RNA totale dai tessuti

L'RNA totale è stato estratto da ciascuna tipologia di tessuto omogeneizzando circa 100 mg di tessuto nel reagente TRI reagent (Sigma Aldrich) per mezzo di un omogeneizzatore Ultraturrax (IKA) secondo la procedura indicata da Chomczynski e Sacchi (1987). È quindi seguita la risospensione dell'RNA estratto in un opportuno volume di acqua microfiltrata (milliQ) sterile e, successivamente, si è proceduto con una verifica quali-quantitativa sia attraverso lettura allo spettrofotometro ( $\lambda = 260$  nm) sia attraverso elettroforesi orizzontale su gel denaturante (Sambrook et al., 1989).

### 3.4 Valutazione dei livelli di mRNA codificanti per i recettori adrenergici $\alpha_1$ e $\beta_2$

Dopo aver estratto l'RNA totale dai tessuti dei diversi gruppi di anguille, è stato utilizzato un protocollo di PCR quantitativa real time, precedentemente messo a punto da Kiwan (2011), allo scopo di quantificare i livelli tissutali dei trascritti che codificano per i recettori adrenergici  $\alpha_1$  e  $\beta_2$  di anguilla (*ADRA1* e *ADRB2*).

### 3.4.1 Preparazione del cDNA: la retrotrascrizione

La retrotrascrizione è una reazione enzimatica che consente di ottenere da un filamento stampo di RNA una molecola di DNA a singolo filamento ad esso complementare (cDNA). Questa reazione è catalizzata dalla trascrittasi inversa (o DNA polimerasi RNA-dipendente), un enzima che si serve del filamento di RNA come stampo, polimerizzando nel filamento di sintesi i deossinucleotidi-trifosfato (dNTPs) complementari alla sequenza del filamento stampo. La sintesi del cDNA è resa possibile dall'utilizzo di oligonucleotidi sintetici detti inneschi (o primers) che, appaiandosi alla sequenza dell'RNA ad essi complementari, costituiscono un piccolo tratto a doppio filamento dal quale la trascrittasi inversa può iniziare la sintesi del nuovo filamento. Per ogni campione, il cDNA è stato sintetizzato a partire da 1 µg di RNA totale utilizzando il kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-rad Laboratories), seguendo il protocollo descritto dal produttore. I campioni di cDNA così ottenuti sono stati conservati a -20°C e utilizzati nella successiva fase di amplificazione.

### 3.4.2 Selezione dei primers

I primers gene e specie specifici sono stati disegnati e selezionati con il software Primer Express (Life Technologies) da Kiwan (2011), utilizzando sequenze nucleotidiche precedentemente ottenute nel nostro laboratorio e codificanti per i recettori adrenergici  $\alpha_1$  (*ADRA1*) e  $\beta_2$  (*ADRB2*) di *Anguilla anguilla*. Le sequenze sono state depositate nella banca dati GenBank (<https://www.ncbi.nlm.gov/genbank/>) con i seguenti numeri di accesso: KC608866 per *ADRA1* e KC503765 per *ADRB2*. Le sequenze dei primers sono disponibili presso il nostro laboratorio.

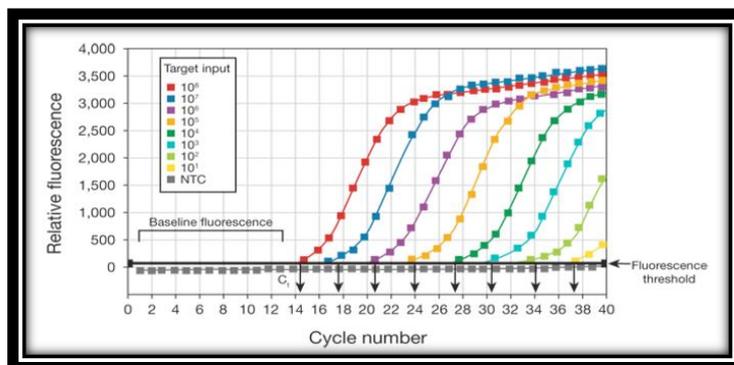
### 3.4.3 La PCR quantitativa real time

La Reazione a Catena della DNA Polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR), ideata da Kary B. Mullis attorno alla metà degli anni Ottanta (Mullis et al., 1986), rappresenta una tecnica che consente di selezionare ed amplificare da una preparazione eterogenea di DNA uno specifico segmento di interesse, di cui è nota la sequenza delle due estremità terminali, producendone un elevato numero di copie. Prima di procedere con l'amplificazione, si prepara una miscela di reazione nella quale il DNA di partenza è incluso in una soluzione che contiene i deossiribonucleotidi trifosfato (dNTP), ioni  $Mg^{2+}$ , una coppia di primers (forward e reverse), che rappresentano piccole sequenze di

oligonucleotidi complementari alle estremità 5' e 3' della regione target del filamento stampo, e la DNA polimerasi. Allo scopo di evitare che questo enzima si denaturi in seguito alle alte temperature a cui procede la reazione di PCR, si impiegano DNA polimerasi estratte da organismi termofili: quella più comunemente usata è la Taq DNA polimerasi, estratta dal batterio *Thermophilus aquaticus* (Saiki et al., 1988). La reazione di amplificazione consiste nella ripetizione ciclica di tre fasi fondamentali. La fase di denaturazione, in cui si porta la miscela di reazione ad una temperatura compresa fra i 90 ed i 98°C in modo da consentire la denaturazione del DNA; la fase di appaiamento o annealing, in cui la temperatura viene abbassata per consentire l'appaiamento dei primers alle regioni a loro complementari dei filamenti di DNA denaturati, formando un piccolo tratto di DNA a doppia catena e la fase di estensione, dove la DNA-polimerasi, previo innalzamento della temperatura, partendo dai piccoli tratti di DNA a doppia catena formati dall'appaiamento dei primers con le regioni loro complementari, inizia la sintesi del DNA mediante la formazione di legami fosfodiesterici tra l'estremità 3' del deossinucleotide trifosfato (dNTP), presente nel filamento stampo, e quella 5' del dNTP complementare allo stampo. Una volta conclusa la replicazione del filamento stampo, il ciclo di PCR si ripete fino all'esaurimento dei reagenti presenti in soluzione.

La real time PCR è stata uno strumento essenziale per il progresso in biologia molecolare negli ultimi anni ed ha accelerato in modo sorprendente l'acquisizione di conoscenze nell'ambito della genetica. Si tratta di una variante della PCR precedentemente illustrata, caratterizzata da una sensibilità elevata che permette la rilevazione della cinetica della reazione di PCR in tempo reale; in particolare viene rilevata la fluorescenza emessa nel corso della reazione da un *reporter*, che rappresenta un indicatore della produzione dell'amplificato. I reporters utilizzati includono coloranti che legano il DNA a doppio filamento (dsDNA), oppure coloranti fissati ai primers di PCR oppure sonde che si ibridano con i prodotti di PCR durante l'amplificazione. Nel corso di ogni ciclo di PCR, in particolare all'inizio della fase esponenziale della reazione, è possibile stabilire una relazione lineare tra la quantità di prodotto di PCR e la quantità iniziale del cDNA corrispondente al trascritto bersaglio contenuto nel campione. In questo modo, quindi, è possibile effettuare una stima indiretta dell'espressione del trascritto target contenuto nel campione analizzato. L'amplificato può essere rilevato quantitativamente con diversi metodi. In questa Tesi è stato adottato il metodo basato sull'impiego del SYBR Green I®. Si tratta di un agente intercalante che si lega in corrispondenza del solco minore della doppia elica di DNA

emettendo fluorescenza. La cinetica della reazione di PCR è ricostruita all'interno di un grafico, noto come grafico di amplificazione (**Fig.17**), che esprime l'incremento di intensità della fluorescenza emessa ad ogni ciclo, e dal quale si estrapolano i parametri necessari per la quantificazione.



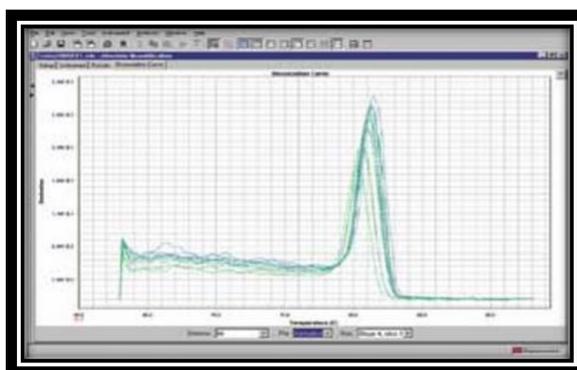
**Fig. 17** Grafico di amplificazione che esprime l'incremento dell'intensità emessa ad ogni ciclo. Il grafico di amplificazione si crea quando il segnale fluorescente, proveniente da ciascun campione, è plottato con il numero di cicli; quindi il grafico di amplificazione rappresenta l'accumulo di prodotto lungo la durata dell'esperimento di real-time PCR (Life technologies™).

Si definisce ciclo soglia ( $C_T$ ) il ciclo in cui il segnale di fluorescenza rilevato al di sopra di un determinato valore soglia aumenta significativamente. Maggiore è la quantità iniziale del cDNA bersaglio, più velocemente sarà accumulato il prodotto di PCR, minore sarà il valore di  $C_T$  rilevato.

In questa Tesi è stato impiegato il protocollo di quantificazione assoluta messo a punto da Kiwan (2011) per valutare i livelli dei trascritti *ADRB2* e *ADRA1* e permetterne il confronto nei diversi tessuti delle anguille campionate a diversi stadi di argentizzazione. Questo approccio richiede l'utilizzo di template contenenti quantità note del prodotto genico in esame (standards) per costruire una curva standard che esprima la relazione tra il numero di molecole del cDNA target e il valore misurato di  $C_T$ . I dati sono espressi come numero di copie per il trascritto in esame riferito alla quantità nominale di RNA impiegata nella reazione di amplificazione. Ciascuna coppia di primers è stata sottoposta ad una fase di verifica preliminare seguendo le linee guida internazionali MIQE (*Minimum information for Publication of Quantitative Real-time Experiments*), che fissano i criteri di qualità e di affidabilità relativi ai protocolli di qPCR, in modo da garantire l'integrità della letteratura scientifica, promuovere la coerenza fra i laboratori e aumentare la trasparenza sperimentale (Bustin et al., 2009). In questa verifica è stata misurata la specificità dell'amplificazione attraverso l'analisi dei prodotti di PCR via

elettroforesi su gel di agarosio, ed è stata determinata l'efficienza della reazione di amplificazione, definita come:  $E = [(10^{-1/\text{slope}}) - 1] * 100$ .

L'efficienza della reazione di amplificazione si calcola considerando la pendenza (slope) della retta di regressione che si ottiene dalla correlazione fra i valori di  $C_T$  e la quantità nominale di RNA ricavata da diluizioni scalari di un campione di cDNA (l'analisi di ogni diluizione è stata eseguita in triplicato). Nel presente lavoro di Tesi i valori di efficienza ottenuti sono risultati compresi tra il 99% ed il 100%, in accordo con le linee guida MIQE. Le reazioni di real-time PCR sono state eseguite in duplicato, in volume finale di 10  $\mu\text{L}$  che contiene: iTaq™ Universal Master Mix (BioRad Laboratories) 2X, provvista di tutti i reagenti necessari per l'amplificazione (iTaq™ DNA polimerasi, dNTPs,  $\text{MgCl}_2$  e ROX), il reporter SYBR® green I, 0.2  $\mu\text{M}$  dei primers forward e reverse, una quantità di cDNA pari a 15 ng dell'RNA totale di partenza per i campioni sperimentali, oppure 2  $\mu\text{L}$  di ciascun standard alla opportuna concentrazione, ottenuto clonando i singoli prodotti di PCR con il STRATACLONE PCR cloning kit (Agilent), all'interno di un vettore plasmidico. Una volta ricombinato, il plasmide è stato estratto dai cloni positivi mediante l'utilizzo del kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN) ed è stato quindi utilizzato come template per la costruzione delle curve degli standard da utilizzare nel protocollo di PCR real time. Le amplificazioni sono state eseguite in un sistema StepOne real time PCR system (Life Technologies) utilizzando un protocollo termico standard "fast mode" (Franzellitti et al., 2015). Dopo ogni reazione di amplificazione è stata effettuata una curva di dissociazione (curva di melting) per verificare l'assenza di prodotti di amplificazione aspecifici che potrebbero alterare la validità del risultato ottenuto (**Fig. 18**).



**Fig. 18** Esempio di curva di melting (Life technologies™)

### 3.5 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata grazie al test di Kruskal-Wallis (software: PAST), un test non parametrico che consente di effettuare l'ANOVA ad una via senza tener conto sia della normalità di distribuzione della popolazione di dati sia dell'omogeneità delle varianze. È stata valutata la variazione dell'espressione dei recettori *ADRA1* e *ADRB2* fra i diversi gruppi di anguille all'interno dello stesso tessuto, sono stati confrontati i livelli di espressione del recettore *ADRA1* e del recettore *ADRB2* all'interno di ciascun gruppo di anguille ed è stata testata la differenza dei livelli di *ADRA1* e *ADRB2* all'interno dello stesso tessuto e nello stesso gruppo di anguille. Successivamente sono stati effettuati i confronti a coppie tra i diversi campioni con il test di Mann-Whitney, che rappresenta l'analogo non parametrico del test *t* di Student per campioni indipendenti e consente di verificare le differenze statistiche tra due gruppi di dati.



## 4. RISULTATI

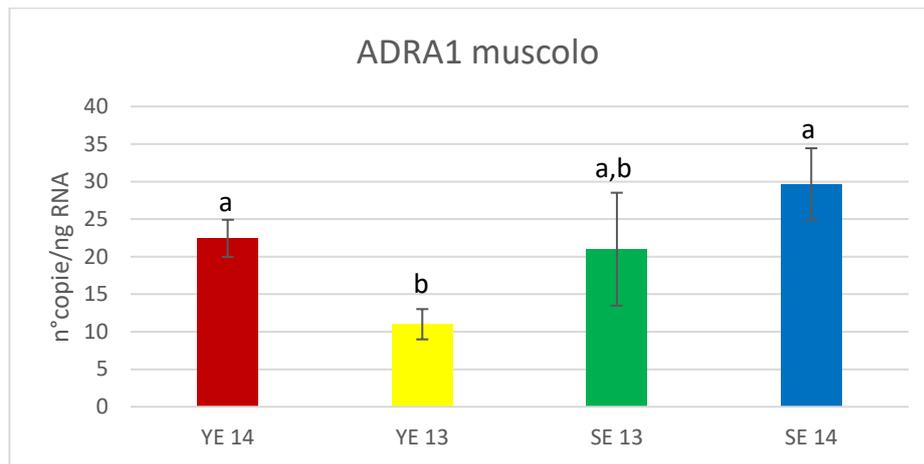
### 4.1 Variazione di *ADRA1* e *ADRB2* tra i diversi gruppi nello stesso tessuto

L'ipotesi testata è se l'espressione dei due recettori differiscono significativamente o no all'interno dello stesso tessuto fra i diversi gruppi di anguille ( $p=0,05$ ).

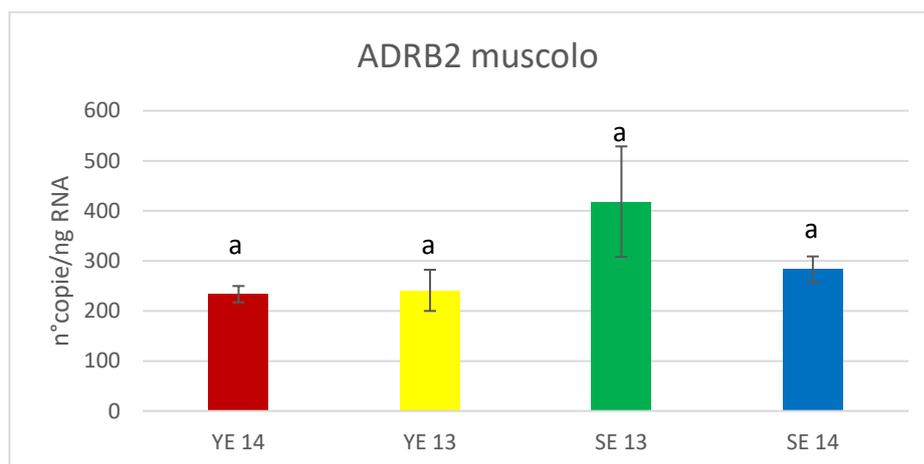
**Tabella 1:** risultati del test di Kruskal-Wallis riguardo la variazione dei livelli di mRNA codificanti per *ADRA1* e *ADRB2* all'interno dello stesso tessuto nei diversi gruppi di anguille ( $p=0,05$ ).

Kruskal-Wallis				
Tessuto	Recettore	H (chi2)	Hc (tie corrected)	p (same)
Muscolo	<b>ADRA1</b>	2,059	2,065	0,559
	<b>ADRB2</b>	-1,118	-1,121	1
Cervello	<b>ADRA1</b>	18,3	18,3	0,000381
	<b>ADRB2</b>	13,02	13,02	0,0046
Cuore	<b>ADRA1</b>	16,14	16,14	0,001063
	<b>ADRB2</b>	3,664	3,664	0,3001
Branchie	<b>ADRA1</b>	2,429	2,429	0,4882
	<b>ADRB2</b>	7,326	7,326	0,0622
Fegato	<b>ADRA1</b>	17,29	17,29	0,000615
	<b>ADRB2</b>	5,91	5,911	0,116

Il risultato del test di Kruskal-Wallis mostra che, in generale, l'espressione di *ADRA1* non varia significativamente nel muscolo e nelle branchie, mentre negli altri tessuti le variazioni osservate sono statisticamente significative. Per quanto riguarda *ADRB2*, nel muscolo, nel cuore, nelle branchie e nel fegato non si osservano differenze significative a differenza, invece, del cervello (**Tabella 1**).

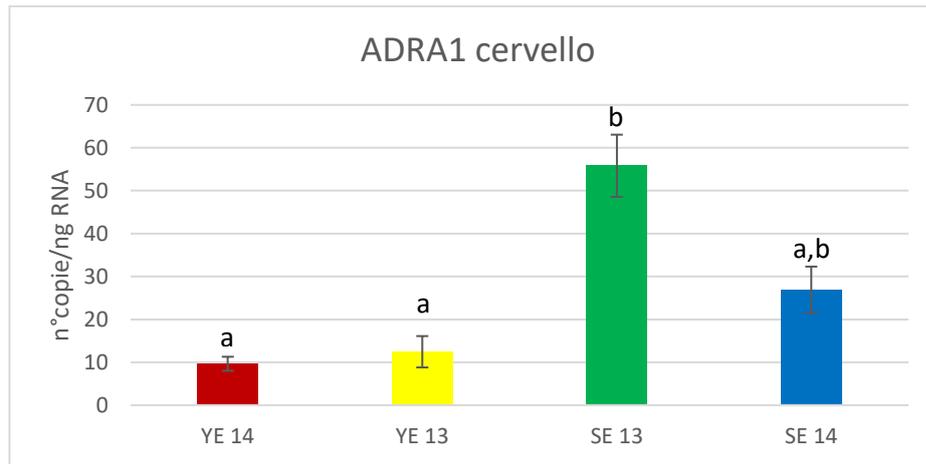


**Fig. 19** Livelli di espressione del trascritto di *ADRA1* nel muscolo di anguille europee a differenti stadi di argentinizzazione, valutati mediante qPCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard del numero di copie del prodotto genico normalizzato sui nanogrammi di RNA totale impiegati in una singola reazione di qPCR. I gruppi di anguille sono stati ordinati sulla base dei valori medi dell'indice di argentinizzazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitney test,  $n=8$ )

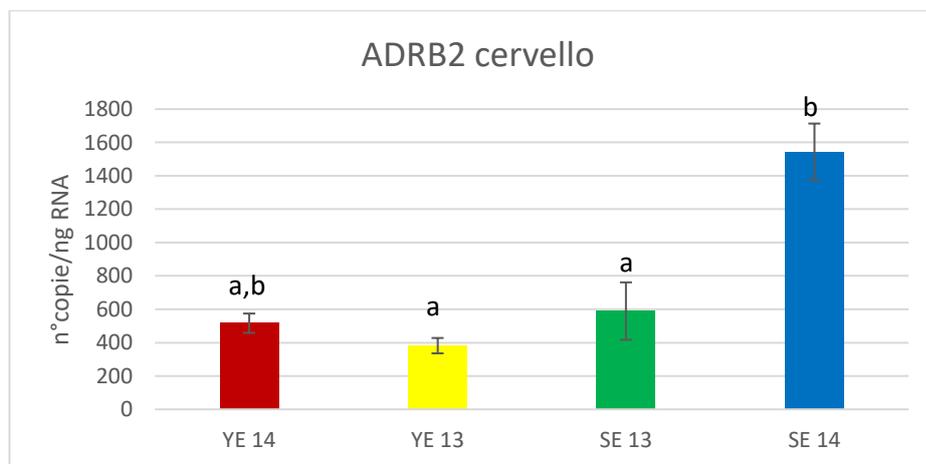


**Fig. 20** Livelli di espressione del trascritto di *ADRB2* nel muscolo di anguille europee a differenti stadi di argentinizzazione, valutati mediante qPCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard del numero di copie del prodotto genico normalizzato sui nanogrammi di RNA totale impiegati in una singola reazione di qPCR. I gruppi di anguille sono stati ordinati sulla base dei valori medi dell'indice di argentinizzazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ; Mann-Whitney test,  $n=8$ )

Per quanto riguarda l'espressione *ADRA1* nel muscolo, si osservano differenze statisticamente significative dai confronti a coppie fra i gruppi YE13 vs YE14 e YE13 vs SE14 (**Fig. 19**). Per quanto riguarda, invece, l'espressione di *ADRB2* non si osservano differenze significative fra i gruppi diversi gruppi di anguille (**Fig. 20**).



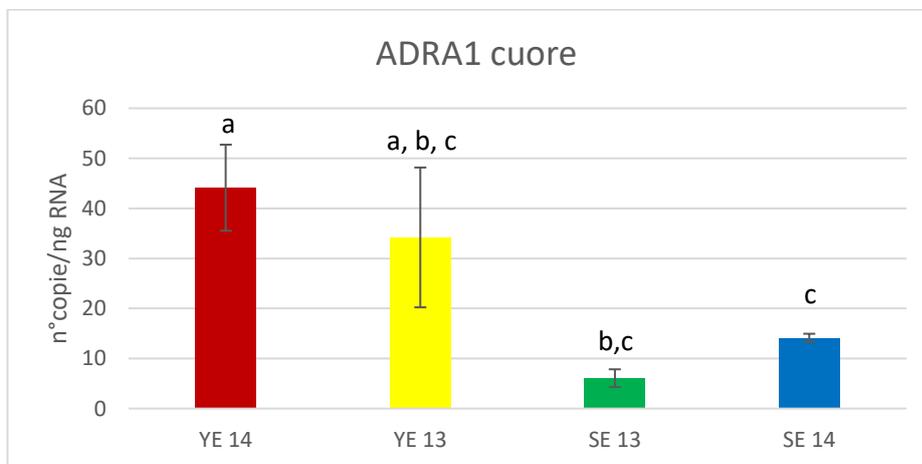
**Fig. 21** Livelli di espressione del trascritto di *ADRA1* nel cervello di anguille europee a differenti stadi di argentinizzazione, valutati mediante qPCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard del numero di copie del prodotto genico normalizzato sui nanogrammi di RNA totale impiegati in una singola reazione di qPCR. I gruppi di anguille sono stati ordinati sulla base dei valori medi dell'indice di argentinizzazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ; test di Mann-Whitney,  $n=8$ )



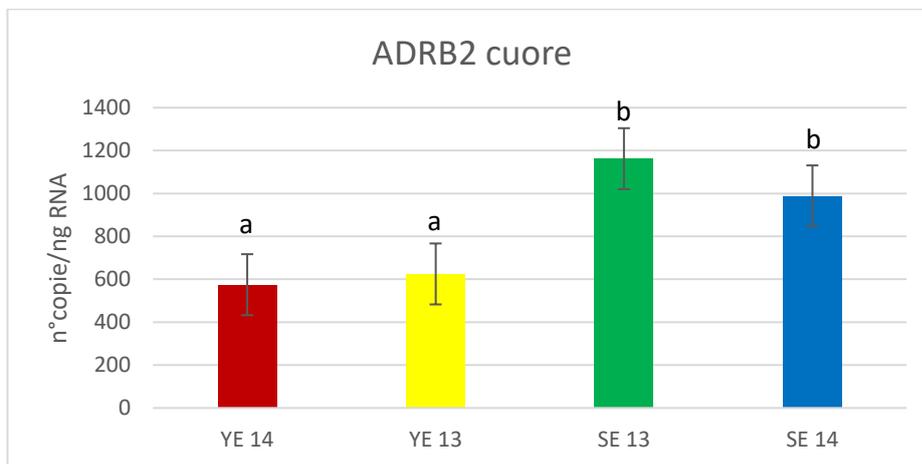
**Fig. 22** Livelli di espressione del trascritto di *ADRB2* nel cervello di anguille europee a differenti stadi di argentinizzazione, valutati mediante qPCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard del numero di copie del prodotto genico normalizzato sui nanogrammi di RNA totale impiegati in una singola reazione di qPCR. I gruppi di anguille sono stati ordinati sulla base dei valori medi dell'indice di argentinizzazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ; test di Mann-Whitney,  $n=8$ )

Per quanto riguarda l'espressione *ADRA1* nel cervello, si osservano differenze statisticamente significative dai confronti a coppie fra i gruppi SE13 vs SE14; YE14 vs SE13; YE14 vs SE14 e YE13 vs SE13 (**Fig. 21**). Per quanto riguarda, invece,

l'espressione di *ADRB2* si osservano differenze significative fra i gruppi YE13 vs SE14; SE13 vs SE14; YE14 vs SE13; YE14 vs SE14 (**Fig. 22**).

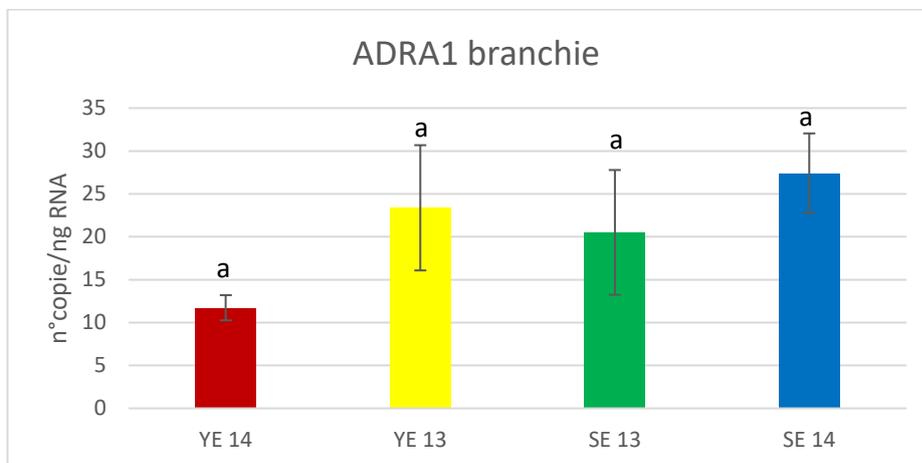


**Fig. 23** Livelli di espressione del trascritto di *ADRA1* nel cuore di anguille europee a differenti stadi di argentinizzazione, valutati mediante qPCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard del numero di copie del prodotto genico normalizzato sui nanogrammi di RNA totale impiegati in una singola reazione di qPCR. I gruppi di anguille sono stati ordinati sulla base dei valori medi dell'indice di argentinizzazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ; test di Mann-Whitney,  $n=8$ )

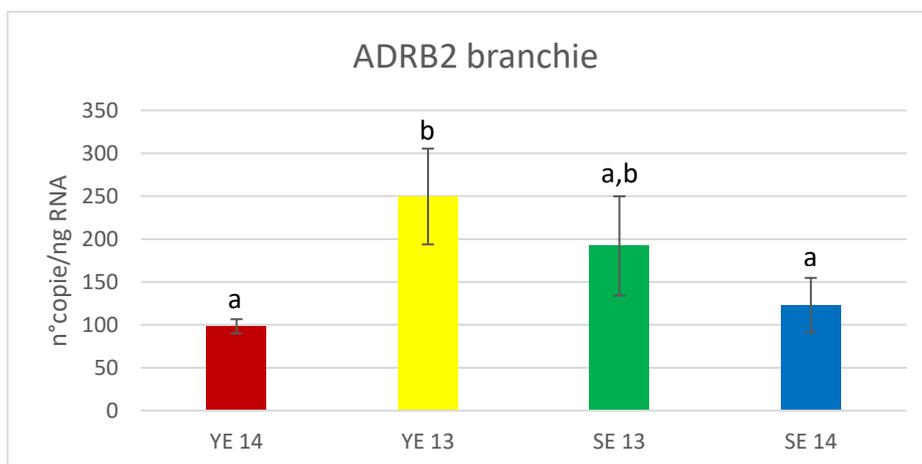


**Fig. 24** Livelli di espressione del trascritto di *ADRB2* nel cuore di anguille europee a differenti stadi di argentinizzazione, valutati mediante qPCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard del numero di copie del prodotto genico normalizzato sui nanogrammi di RNA totale impiegati in una singola reazione di qPCR. I gruppi di anguille sono stati ordinati sulla base dei valori medi dell'indice di argentinizzazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ; test di Mann-Whitney,  $n=8$ )

Per quanto riguarda l'espressione di *ADRA1* nel cuore, si osservano differenze significative dai confronti a coppie fra i gruppi YE14 vs SE13 e YE14 vs SE14 (**Fig. 23**). Per quanto riguarda l'espressione di *ADRB2* si osservano differenze significative fra YE14 vs SE13; YE14 vs SE14; YE13 vs SE13 e fra YE13 vs SE14 (**Fig. 24**).

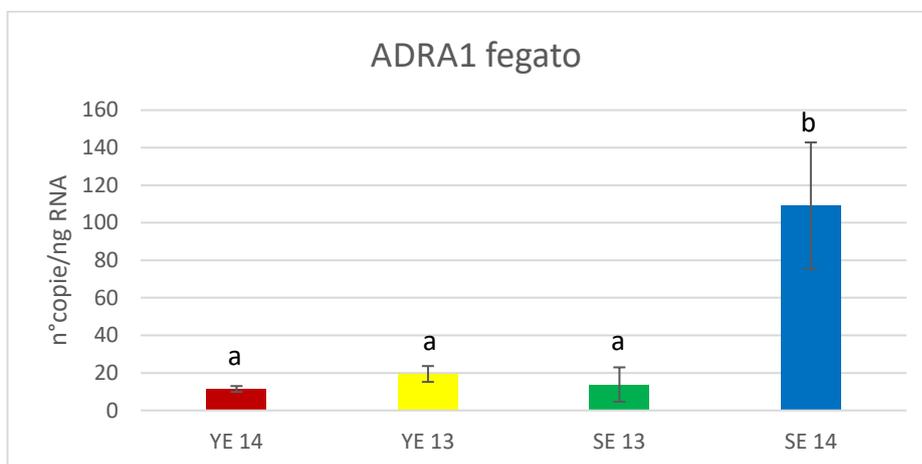


**Fig. 25** Livelli di espressione del trascritto di *ADRA1* nelle branchie di anguille europee a differenti stadi di argentinizzazione, valutati mediante qPCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard del numero di copie del prodotto genico normalizzato sui nanogrammi di RNA totale impiegati in una singola reazione di qPCR. I gruppi di anguille sono stati ordinati sulla base dei valori medi dell'indice di argentinizzazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ; test di Mann-Whitney,  $n=8$ )

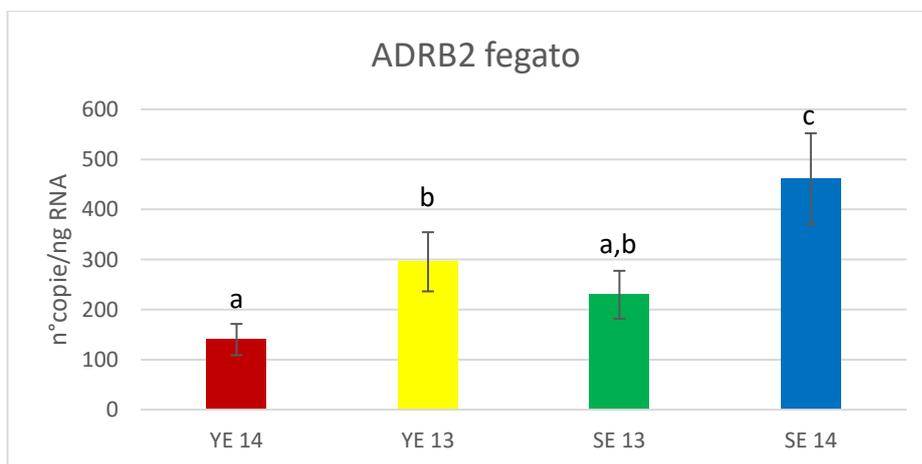


**Fig. 26** Livelli di espressione del trascritto di *ADRB2* nelle branchie di anguille europee a differenti stadi di argentinizzazione, valutati mediante qPCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard del numero di copie del prodotto genico normalizzato sui nanogrammi di RNA totale impiegati in una singola reazione di qPCR. I gruppi di anguille sono stati ordinati sulla base dei valori medi dell'indice di argentinizzazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ; test di Mann-Whitney,  $n=8$ )

Per quanto riguarda l'espressione di *ADRA1* nelle branchie, dal confronto a coppie fra i diversi gruppi di anguille non si osservano differenze statisticamente significative (**Fig. 25**). Per ciò che concerne l'espressione di *ADRB2* le differenze si riscontrano in YE13 vs YE14 e in YE13 vs SE14. In questi due confronti a coppie si osserva, invece, una differenza statisticamente significativa (**Fig. 26**).



**Fig. 27** Livelli di espressione del trascritto di *ADRA1* nel fegato di anguille europee a differenti stadi di argentinizzazione, valutati mediante qPCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard del numero di copie del prodotto genico normalizzato sui nanogrammi di RNA totale impiegati in una singola reazione di qPCR. I gruppi di anguille sono stati ordinati sulla base dei valori medi dell'indice di argentinizzazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ; test di Mann-Whitney,  $n=8$ )



**Fig. 28** Livelli di espressione del trascritto di *ADRB2* nel fegato di anguille europee a differenti stadi di argentinizzazione, valutati mediante qPCR. I dati sono espressi come media  $\pm$  errore standard del numero di copie del prodotto genico normalizzato sui nanogrammi di RNA totale impiegati in una singola reazione di qPCR. I gruppi di anguille sono stati ordinati sulla base dei valori medi dell'indice di argentinizzazione. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0,05$ ; test di Mann-Whitney,  $n=8$ )

Per quanto riguarda l'espressione di *ADRA1*, dai confronti a coppie fra i diversi gruppi di anguille, emergono differenze statisticamente significative in YE13 vs SE14; YE14 vs SE14 e SE13 vs SE14 (**Fig. 27**). Mentre, per quanto riguarda *ADRB2*, le differenze significative si osservano in SE13 vs SE14; in YE13 vs SE14; in YE14 vs SE14; in YE14 vs YE13; in YE13 vs SE13 e in YE14 vs SE13 (**Fig. 28**).

#### 4.2 Confronti fra *ADRA1* e *ADRB2* all'interno dello stesso gruppo

Si è operato un confronto fra i livelli di espressione del recettore *ADRA1* e del recettore *ADRB2* all'interno di ciascun gruppo di anguille ( $p= 0,05$ ).

**Tabella 2:** risultati del test di Kruskal-Wallis riguardo il confronto dei livelli di mRNA codificanti per *ADRA1* e *ADRB2* all'interno dello stesso gruppo di anguille ( $p= 0,05$ )

<b>Kruskal-Wallis</b>			
<b>Gruppo</b>	<b>H (chi2)</b>	<b>Hc (tie corrected)</b>	<b>p (same)</b>
SE13	43,81	43,82	0,0000000000003594
SE14	36,06	36,06	0,0000000001911
YE13	40,3	40,31	0,0000000002163
YE14	58,23	58,23	0,0000000000002336

**Tabella 3:** risultati del test di Mann-Whitney riguardo il confronto dei livelli di mRNA codificanti per *ADRA1* e *ADRB2* all'interno dello stesso gruppo di anguille

<b>Mann-Whitney</b>	
<b>Gruppo</b>	<b>ADRA1 vs ADRB2</b>
SE13	0,00000000000005476
SE14	0,00000000002378
YE13	0,0000000000004383
YE14	0,0000000000002425

Dai risultati emerge che in ciascuno dei gruppi di anguille considerati esiste una differenza significativa fra i livelli di espressione del recettore *ADRA1* e del recettore *ADRB2* (**Tabella 2** e **Tabella 3**).

### 4.3 Confronto fra *ADRA1* e *ADRB2* all'interno dello stesso gruppo e nello stesso tessuto

L'ipotesi testata riguarda la differenza dei livelli di *ADRA1* e *ADRB2* all'interno dello stesso tessuto e nello stesso gruppo di anguille ( $p = 0,05$ )

**Tabella 4:** Risultati del test di Kruskal-Wallis riguardo la differenza dei livelli di *ADRA1* e *ADRB2* all'interno dello stesso tessuto e negli stessi gruppi ( $p = 0.05$ ).

Tessuto	Kruskal-Wallis			
	Gruppo	H (chi2)	Hc (tie corrected)	p (same)
Muscolo	YE 13	9,351	9,351	0,002229
	YE14	11,29	11,29	0,0007775
	SE13	-0,7436	-0,7541	1
	SE14	3,302	3,31	0,06887
Cervello	YE 13	2,755	2,761	0,09658
	YE14	11,29	11,29	0,0007775
	SE13	11,29	11,29	0,0007775
	SE14	11,12	11,12	0,0008551
Cuore	YE 13	11,29	11,29	0,0007775
	YE14	11,29	11,29	0,0007775
	SE13	11,29	11,29	0,0007775
	SE14	9,751	9,751	0,001793
Branchie	YE 13	10,11	10,11	0,001477
	YE14	11,29	11,29	0,0007775
	SE13	9,276	9,276	0,002322
	SE14	9,101	9,101	0,002555
Fegato	YE 13	11,29	11,29	0,0007775
	YE14	11,29	11,29	0,0007775
	SE13	4,279	4,279	0,0386
	SE14	2,347	2,347	0,1255

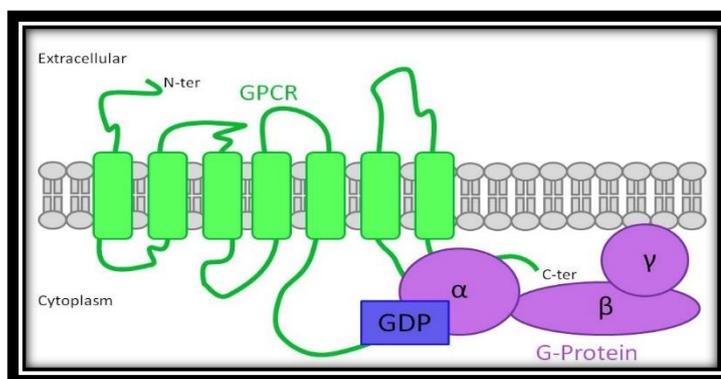
Il test di Kruskal-Wallis ha messo in evidenza che nel muscolo si osservano differenze statisticamente significative fra i livelli di *ADRA1* e *ADRB2* nei gruppi YE13 e YE14, mentre nei gruppi SE13 ed SE14 le differenze dei livelli di espressione dei due recettori non risultano statisticamente significative. Nel cervello le espressioni di *ADRA1* e *ADRB2* differiscono in modo statisticamente significativo nei gruppi YE14, SE13, SE14;

mentre nel gruppo YE13 non si osserva una differenza statisticamente significativa. Nel cuore, nelle branchie e nei gruppi YE13, YE14 ed SE13 del fegato le differenze fra i livelli di *ADRA1* e *ADRB2* sono statisticamente significative; nel gruppo SE14 del fegato, invece, le differenze fra le espressioni dei due recettori adrenergici non sono statisticamente significative (**Tabella 4**).



## 5. DISCUSSIONE

I recettori adrenergici  $\alpha_1$  e  $\beta_2$  studiati in questo lavoro di Tesi appartengono alla famiglia dei recettori a 7 segmenti transmembrana accoppiati alle proteine G implicati nei meccanismi di trasduzione del segnale ormonale. Strutturalmente, tutti i recettori accoppiati a proteine G sono costituiti da due code formate da amminoacidi idrofili e situate su entrambi i lati della membrana cellulare. Quella rivolta verso lo spazio extracellulare contiene il sito di legame specifico mentre quella rivolta verso lo spazio intracellulare presenta il sito catalitico che interagisce con la proteina G. Si distinguono anche tre anse intracellulari e tre anse extracellulari, costituite da amminoacidi idrofili ed i caratteristici sette domini transmembrana formati da amminoacidi idrofobi (**Fig. 28**).

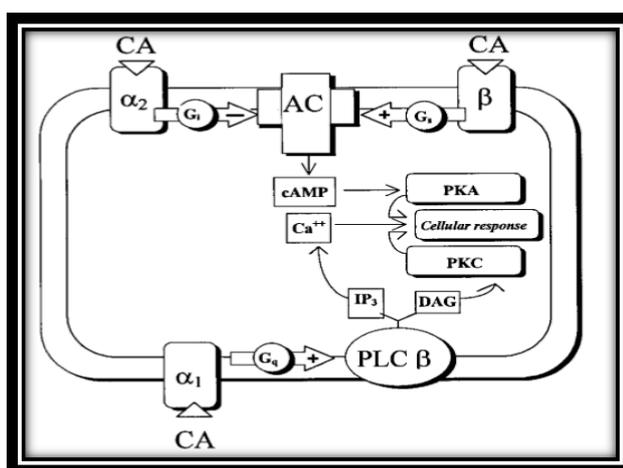


**Fig. 28** Struttura molecolare del recettore accoppiato alla proteina G ([www.fastbleep.com](http://www.fastbleep.com))

Dal punto di vista funzionale, i recettori  $\alpha_1$  sono accoppiati alla proteina Gq ed impiegano come secondo messaggero il  $\text{Ca}^{2+}$ . Il legame dell'agonista con il recettore porta all'attivazione della proteina Gq. Successivamente avviene uno scambio GDP/GTP sulla subunità  $\alpha$  della proteina Gq, portando alla dissociazione della proteina eterotrimerica in due componenti: una subunità  $\alpha$  legata alla GTP ed un dimero  $\beta\gamma$  libero. La subunità  $\alpha$  attiva un enzima di membrana noto come fosfolipasi C (PLC) il quale agisce su un fosfolipide costituente la membrana citoplasmatica, il fosfatidilinositolo-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>), trasformandolo in due componenti: inositolo trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerolo (DAG). IP<sub>3</sub> stimola i canali ionici del  $\text{Ca}^{2+}$  presenti sul Reticolo Endoplasmatico, all'apertura. In questo modo, gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  si liberano nel citoplasma, aumentandone la concentrazione. Il DAG, invece, attiva la proteina chinasi C (PKC) che, a sua volta, opera l'apertura dei canali ionici del  $\text{Ca}^{2+}$  presenti nella membrana citoplasmatica. Anche in questo caso si ha ingresso di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  nel citoplasma, con un

conseguente aumento della loro concentrazione. Gli ioni  $\text{Ca}^{2+}$  attivano una particolare categoria di proteine, note come calmoduline (sono proteine allosteriche  $\text{Ca}^{2+}$ -affini); ciascuna di queste proteine, legandosi agli ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , modifica la propria conformazione molecolare e diviene capace di attivare un determinato processo intracellulare.

I recettori  $\beta_2$  sono accoppiati alla proteina  $G_s$  (G stimolatoria), ed impiegano come secondo messaggero l'AMP ciclico (AMPc). Il legame tra l'agonista e il recettore porta questi recettori ad una conformazione che induce l'attivazione della proteina  $G_s$ . Successivamente avviene uno scambio GDP/GTP sulla subunità  $\alpha$  della proteina  $G_s$ , portando alla dissociazione della proteina eterotrimerica in due componenti: una subunità  $\alpha$  legata alla GTP ed un dimero  $\beta\gamma$  libero. La subunità  $\alpha$  attiva l'enzima adenilato ciclasi (AC) che, a sua volta, catalizza la formazione dell'AMPc. L'AMPc attiva la proteina chinasi A (PKA) che, a sua volta, è responsabile dell'attivazione della risposta cellulare (Casella & Taglietti, 1996) (**Fig. 29**).



**Fig.29** Vie di trasduzione del segnale mediate di recettori adrenergici  $\alpha$  e  $\beta$  in un epatocita. Le frecce indicano la direzione del *pathway*. Abbreviazioni: PLC  $\beta$ , fosfolipasi C  $\beta$ ; AC, adenilato ciclasi; cAMP, AMP ciclico; IP<sub>3</sub>, inositolo 1,4,5-trifosfato; DAG, diacilglicerolo; PKA, proteina chinasi A; PKC, proteina chinasi C (Fabbri et al., 1998)

I dati riportati in questo lavoro di Tesi dimostrano la presenza dei trascritti codificanti per i recettori adrenergici  $\alpha_1$  (*ADRA1*) e  $\beta_2$  (*ADRB2*) nei vari tessuti dell'anguilla europea. In generale, con la sola eccezione del cuore, *ADRB2* è espresso a livelli significativamente più elevati rispetto a *ADRA1*, in accordo con le numerose evidenze sperimentali riportate nei pesci che dimostrano una maggior contributo dei recettori adrenergici  $\beta_2$  e un minimo contributo dei recettori adrenergici  $\alpha_1$  al controllo delle funzioni fisiologiche

modulate dalle catecolamine (Fabbri & Moon, 2016). Inoltre, questa Tesi riporta per la prima volta la distribuzione tissutale di questi trascritti nell'anguilla europea, che è risultata in sostanziale accordo con dati analoghi riportati per la trota iridea *Oncorhynchus mykiss* (Chen et al., 2007; Nickerson et al., 2003) e per il ciprinide *Pimephales promelas* (recettori  $\beta_2$ ; Giltrow et al., 2011). Inoltre, i profili di espressione di *ADRA1* e *ADRB2* nei vari tessuti sono risultati variare nei vari stadi del processo di argentinizzazione.

In generale, si osserva un significativo aumento dei livelli di espressione di entrambi i trascritti nelle anguille argentine rispetto alle gialle. Una eccezione a questo quadro generale è rappresentata dall'espressione del recettore  $\alpha_1$  nel cuore. In questo tessuto i livelli di *ADRA1* risultano drammaticamente ridotti nelle anguille argentine rispetto ai valori misurati nelle anguille gialle. Questa riduzione, inoltre, è accompagnata da un significativo aumento dei livelli di *ADRB2*. Nel cuore dei vertebrati sia l'adrenalina che la noradrenalina esercitano un'azione stimolante che si manifesta con un aumento della forza di contrazione (effetto inotropo positivo), della frequenza di contrazione (effetto cronotropo positivo) e della conduzione dell'eccitamento nel miocardio (effetto cronotropo positivo). Si tratta, quindi, di un'azione che stimola l'attività cardiaca in tutti i suoi aspetti, e che si traduce in un forte aumento del lavoro cardiaco. Nella maggior parte dei teleostei, l'adrenalina rappresenta il principale ormone che influenza la contrattilità cardiaca (Farrell & Jones, 1992), causando sia effetti cronotropici che inotropici. Gli effetti cronotropi positivi sono correlati con la presenza dei recettori  $\beta_2$  (Ask et al., 1981; Hipkins, 1985). In *Anguilla anguilla*, l'adrenalina riduce la frequenza della contrazione dei miociti inducendo il rilascio di acetilcolina (Cameron & Brown, 1981), e in *Perca fluviatilis* è stato dimostrato che questo effetto è mediato dai recettori  $\alpha_1$  (Tirri & Ripatti, 1982). Considerando queste evidenze sperimentali, la variazione dei livelli relativi di *ADRA1* e *ADRB2* attraverso le varie fasi del processo di argentinizzazione osservata in questo studio può essere messa in relazione alle modificazioni preparatorie alla migrazione, quando la fisiologia del nuoto delle anguille subisce drastici cambiamenti adattandosi al nuoto sostenuto in ambiente pelagico. Le stesse modificazioni molecolari e funzionali potrebbero interessare il muscolo, anche se in questo tessuto non si osservano variazioni rilevanti dei livelli di *ADRA1* e *ADRB2* né particolari andamenti attraverso le varie fasi del processo di argentinizzazione.

Altri tessuti meritano un approfondimento, visto l'importante ruolo svolto dal sistema adrenergico nella regolazione delle loro funzioni fisiologiche. Ad esempio, fra i tessuti

analizzati, il cervello è considerato quello in cui avvengono le più rilevanti modificazioni a livello molecolare durante il processo di argentinizzazione. Infatti, nel cervello dei maschi di anguilla europea è stato osservato l'aumento dell'espressione di geni coinvolti nella trasduzione del segnale intracellulare, nello sviluppo e nel differenziamento (Churcher et al., 2014). In accordo, i campioni di cervello di femmine di anguille argentine analizzate nel presente studio (SE13 e SE14) hanno mostrato livelli di *ADRB2* (SE14) e di *ADRA1* (SE13 e SE14) significativamente più elevate rispetto alle anguille gialle. Nei vertebrati, il ruolo dei recettori adrenergici, in particolare dei recettori  $\beta$ , in questo tessuto sembra essere associato alla regolazione del metabolismo energetico, all'aumento della glicogenolisi, dell'attività della  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasi, e alla funzione svolta dalla norepinefrina nei processi di formazione della memoria (Giltrow et al., 2011). Insieme alle evidenze riportate da Churcher et al. (2014), i dati riportati in questa Tesi dimostrano un ri-arrangiamento dell'assetto recettoriale verosimilmente legato al cambiamento di habitat, e quindi di comportamento, a cui le anguille vanno incontro nel passaggio dallo stadio di anguilla gialla (fase trofica, bentonica) allo stadio di anguilla argentina (fase migratoria, pelagica).

I profili di espressione rilevati nel fegato sia per *ADRA1* e *ADRB2* sono in assoluto d'accordo con uno studio precedente condotto nel nostro laboratorio in cui i livelli di questi trascritti erano stati valutati in epatociti isolati da anguille gialle (stadio di argentinizzazione FII) e argentine (stadio di argentinizzazione FIV) campionate nella stessa area di studio (Kiwán, 2011). Infatti, sia nel presente lavoro di Tesi che in Kiwán (2011) i livelli di entrambi i trascritti risultano significativamente più elevati nelle anguille argentine rispetto alle gialle, con *ADRB2* sempre espresso a livelli maggiori rispetto a *ADRA1*. Questo dato giustifica le evidenze riportate da numerosi studi secondo i quali il controllo adrenergico del metabolismo glucidico nel fegato è in massima parte controllato attraverso i recettori  $\beta$  (Fabbri & Moon, 2016). Però in entrambi gli studi *ADRA1* presenta un tasso di aumento relativo maggiore rispetto ad *ADRB2* attraverso i vari stadi di argentinizzazione. Questo dato concorda con le evidenze riportate da Kiwán (2011) dimostranti che l'effetto di un bloccante recettoriale specifico per i recettori  $\alpha$  (il prazosin) sulla glicogenolisi indotta dall'adrenalina è rilevabile (seppur modestamente) nei soli epatociti isolati dalle anguille argentine. L'insieme dei dati riportati da Kiwán (2011) e dal presente lavoro di Tesi dimostrerebbero una diversa dinamica del controllo adrenergico sulla glicogenolisi epatica tra anguille gialle e argentine.



## 6. CONCLUSIONE

Questo lavoro di Tesi ha dimostrato la presenza dei trascritti codificanti per i recettori adrenergici  $\alpha_1$  (*ADRA1*) e  $\beta_2$  (*ADRB2*) in diversi tessuti di esemplari di femmine di anguilla europea a diversi stadi di maturazione sessuale (stadi di argentinizzazione). I risultati riportati dimostrano che tali recettori sono ubiquitariamente espressi in tutti i tessuti analizzati, anche se *ADRB2* è mediamente più espresso nel cuore e nel cervello, mentre la distribuzione tissutale di *ADRA1* risulta sostanzialmente influenzata dallo stadio di argentinizzazione degli animali. Il cervello è il tessuto in cui sono state osservate le variazioni più grandi dei livelli di espressione di entrambi i trascritti, corroborando studi precedenti che indicano questo come il tessuto in cui si verificano le più rilevanti modificazioni molecolari durante il processo di argentinizzazione, e supportando le precedenti ipotesi riguardanti il controllo adrenergico degli aspetti comportamentali come, ad esempio, l'apprendimento innato (Giltrow et al., 2011). Si ipotizza che questi aspetti siano tra i fattori che contribuiscono al particolare comportamento migratorio dell'anguilla europea.

Dal presente studio è emerso che *ADRB2* risulta significativamente più espresso di *ADRA1* in tutti i tessuti analizzati ed in tutti i gruppi di anguille esaminati confermando le numerose evidenze sperimentali riportate nei pesci che dimostrano un maggior contributo dei recettori adrenergici  $\beta_2$  al controllo delle funzioni fisiologiche modulate dalle catecolamine, e il generale mantenimento di questa caratteristica dell'espressione relativa a *ADRA1/ADRB2* attraverso le varie fasi del processo di argentinizzazione.

Si può quindi affermare che le variazioni dei profili trascrizionali di *ADRA1* e *ADRB2* osservate nel presente studio possono rappresentare uno tra i processi di regolazione alla base delle modificazioni fisiologiche che interessano le anguille durante l'intero processo di argentinizzazione, e si aggiungono alle già descritte variazioni fisiologiche, morfologiche, e comportamentali largamente descritte in letteratura.



## 7. BIBLIOGRAFIA

- Amin EM 1997. Gonad differentiation and early gonadal development of the European eel *Anguilla anguilla* L. in Egyptian waters. Arab Gulf J Sci Res 15: 175-186
- Aoyama J, Miller MJ 2003. The Silver Eel. In Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (eds): Eel Biology. Springer, Tokyo, 107-117
- Arai T, Otake T, Tsukamoto K 2000. Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels *Anguilla rostrata* and *Anguilla anguilla*, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. Mar Biol 137: 39–45
- Arai T, Aoyama J, Ishikawa S, Miller MJ, Otake T, Inagaki T, Tsukamoto K 2001. Early life history of tropical *Anguilla leptocephali* in western Pacific Ocean. Mar Biol 138: 887-895
- Aroua S, Schmitz M, Baloché S, Vidal B, Rousseau K, Dufour S 2005. Endocrine evidence that silvering, a secondary metamorphosis in the eel, is a pubertal rather than a metamorphic event. Neuroendocrinology 82: 221-232
- Ask JA, Stene-Larsen G, Helle KB 1981. Temperature effects on the  $\beta_2$ -adrenoceptors of the trout atrium. J Comp Physiol 143: 161–8
- Babin PJ, Bogerd J, Kooiman FP, Van Marrewijk WJ, Van der Horst DJ 1999. Apolipoprotein I/II, apolipoprotein B, vitellogenin and microsomal triglyceride transfer protein genes are derived from a common ancestor. J Mol Evol 49: 150-160
- Barbin GP, McCleave JD 1997. Fecundity of the American eel *Anguilla rostrata* at 45°N in Mine U.S.A. J Fish Biol 51: 840-847
- Banning P, Haenen OLM 1990. Effects of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in wild and farmed eel *Anguilla anguilla*. In: Pathology in Marine Science Perkins FO, Cheng TC (eds). Academic Press, New York, NY 317–330
- Beaulaton L, Briand C 2007. Effect of management measures on glass eel escapement. ICES J Mar Sci 64 (7): 1402-1413
- Belpaire C, Goemans G 2007. The European eel *Anguilla anguilla*, a rapporteur of the chemical status for the water framework directive?. Life and Environment 57: 235-252

- Beregi A, Molnar K, Bekesi L, Szekely C 1998. Radiodiagnostic method for studying swimbladder inflammation caused by *Anguillicola crassus* (Nematoda: *Dracunculoidea*). *Dis Aquat Org* 34: 155–160
- Beullins K, Eding EH, Ollevier F, Komen J, Richter CJJ 1997a. Sex differentiation, changes in length, weight and eye size before and after metamorphosis of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Acquaculture* 153: 151-162
- Beullins K, Eding EH, Gilson P, Ollevier F, Komen J, Richter CJJ 1997b. Gonadal differentiation, intersexuality and sex ratios of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Acquaculture* 153: 135-150
- Bienarz K, Epler PBM, Passakas T 1981. Development of European eel (*Anguilla anguilla* L.) gonads in artificial conditions. *Acquaculture* 22: 53-66
- Birò P 1974. Observations on the food of eel (*Anguilla anguilla* L.) in Lake Balaton. *Annals Inst biol Tihany* 41: 133-152
- Blanke B, Bonhommeau S, Grima N, Drillet Y 2012. Sensitivity of advective transfer times across the North Atlantic Ocean to the temporal and spatial resolution of model velocity data: Implication for European Eel larval transport. *Dynam Atmos Oceans* 55-56: 22-24
- Boëtius I, Boëtius J 1980. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1: 1-28
- Bonhommeau S, Chassot E, Rivot E 2008. Fluctuations in European eel (*Anguilla anguilla*) recruitment resulting from environmental changes in the Sargasso Sea. *Fish Oceanogr* 17: 32-44
- Bonhommeau S, Le Pape O, Gascuel D, Blanke B, Tréguier AM, Grima N, Vermard Y, Castonguay M, Rivot E. 2009. Estimates of the mortality and the duration of the transAtlantic migration of European eel leptocephali using a particle tracking model. *J Fish Biol* 74: 1891–1914
- Bonhommeau S, Castonguay M, Rivot E, Sabatié R, Le Pape O 2010. The duration of migration of Atlantic *Anguilla* larvae. *Fish Fish* 11: 289-306
- Burzawa-Gérard E, Nath P, Baloché S, Peyon P 1994. ELISA (enzyme-linked-immunosorbent assay) for vitellogenin and vitellus in the eel (*Anguilla anguilla*) and in

- the Indian major carp (*Labeo rohita*). In: Scott AP, Sumpter JP, Kime DE, Rolfe MS (eds). Reproductive Physiology of Fish Symposium. University of East Anglia Press, Norwich, UK 319
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT 2009. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55:4
- Callamand O, Fontaine M 1942. L'Activité thyroïdienne de l'Anguille au cours de son développement. *Arch Zool Exp Gen* 82: 129-135
- Cameron JS, Brown SE 1981. Adrenergic and cholinergic responses of the isolated heart of the goldfish *Carassius auratus*. *Comp Biochem Physiol* 70C: 109–16
- Carrieri A, Cavallini G, Plazzi M, Rossi R 1992. Struttura della popolazione di anguille gialle e argentine (*Anguilla anguilla*) nelle Valli di Comacchio (biennio 1989-1990)
- Casella C, Taglietti V 1996. Principi di fisiologia. La Goliardica Pavese ed. Pavia
- Castle PHJ 1963. Anguillid leptocephali in the southwest Pacific. *Zool Publ Vic Univ Welling* 33: 1-14
- Chancerel F 1994. Note Technique. La répartition de l'anguille en France. *Bull Fr Pêche Piscic* 35: 289-294
- Chen X, Perry SF, Aris-Brosou S, Selva C, Moon TW 2007. Characterization and functional divergence of the alpha 1-adrenoceptor gene family: insights from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiol Genomics* 32: 142-153
- Chomczynski P, Sacchi N 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9
- Churcher AM, Pujolar JM, Milan M, Hubbard PC, Martins RS, Saraiva JL, Huertas M, Bargelloni L, Patarnello T, Marino IA, Zane L, Canario AV. Changes in the gene expression profiles of the brains of male European eels (*Anguilla anguilla*) during sexual maturation. *BMC Genomics* 15: 799
- Ciccotti E, Busilacchi S, Cataudella S 2000. Eel, *Anguilla anguilla* (L.), in Italy: recruitment, fisheries and aquaculture. *Dana*, 12: 7-15

CITES 2008. A Brief Introduction to the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora: appendices I, II and III. United Nations Environmental Programme

Colligns SE, Johnson MS, Leah RT 1996. Metal contamination of angler-caught fish from the Mersey Estuary. *Mar Environ Res* 41: 281-297

Colombo G, Grandi G, Rossi R 1984. Gonad differentiation and body growth in *Anguilla anguilla* L. *J Fish Biol* 24: 215–228

Colombo G, Grandi G 1996. Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. *J Fish Biol* 48: 493–512

Corsi I, Mariottini M, Badesso A, Caruso T, Borghesi N, Bonacci S, Iacocca A, Focardi S 2005. Contamination and sub-lethal toxicological effects of persistent organic pollutants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Orbetello lagoon (Tuscany, Italy). *Hydrobiologia* 550: 237–249

Costa JL, Assis CA, Almeida PR, Moreira FM, Costa MJ 1992. On the food of the European eel, *Anguilla anguilla* (L.), in the upper zone of the Tagus estuary, Portugal. *J Fish Biol* 41: 841-850

De Leo GA, Gatto M 1996. Trends in vital rates of the European eel: evidence for density dependence? *Ecol Appl* 6: 1281–1294

Dekker W 2003. Did lack of spawners cause the collapse of the European eel *Anguilla anguilla*?. *Fish Manag Ecol* 10: 365-376

Dekker W 2003. On the distribution of the European eel (*Anguilla anguilla*) and its fisheries. *Can J Fish Aquat Sci.* 60: 787-799

Dufour S, Burzawa-Gérard E, Le Belle N, Sbaihi M, Vidal B 2003. Reproductive endocrinology of the European eel, *Anguilla anguilla*. In In Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (eds): *Eel Biology*. Springer, Tokyo, 373-383

Duke-Elder S 1958. The eye in evolution. In: Duke-Elder S (eds): *System of Ophthalmology*. Henry Kimpton, London, UK 273–332

Dupont J, Reverchon M, Bertolo MJ, Forment P 2014. Nutritional signals and reproduction. *Mol Cell Endocrinol* 382: 527-537

- Durif C, Durif S, Elie P 2005. The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. J Fish Biol 66: 1025-1043
- Etienne N 1959. Influence de la maturation sexuelle provoquée sur l'activité de l'Anguille européenne mâle, *Anguilla anguilla* L. Société de Biologie 41-44
- Fabbri E, Capuzzo A, Moon TW 1998. The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. Comp Biochem Phys C 120: 177-192
- Fabbri E, Caselli F, Piano A, Sartor G, Capuzzo A 2003. Cd<sup>2+</sup> and Hg<sup>2+</sup> affect glucose release and cAMP-dependent transduction pathway in isolated eel hepatocytes. Aquat Toxicol 62:55–65
- Fabbri E, Moon TW 2016. Adrenergic signaling in teleost fish liver, a challenging path. Comp Biochem Phys B 199: 74-86
- Farrell AP, Jones DR 1992. The heart. In: Hoar WS, Randall DJ, Farrell AP, editors. Fish Physiology: The Cardiovascular System, vol. XIA. San Diego: Academic Press 1–88
- Fernandez-Vega C, Sancho E, Ferrando MD, Andreu-Moliner E 1999. Thiobencarb toxicity and plasma AChE inhibition in the European eel. J Environ Sci Health B 34:61–73
- Feunteun E, Rigaud C, Elie P 1992. Le marais doux endigué de Bourgneuf-Machecoul: premiers éléments de connaissance du peuplement piscicole; relation ichtyofaune-habitat; mise en évidence de problèmes majeurs de gestion. Revue des Sciences de L Eau 5 4: 509–527
- Feunteun E, Acou A, Laffaille P, Legault A, 1998a. Catadromous migration dynamics of European Eel, *Anguilla anguilla*, in anthropic catchments. 27<sup>th</sup> SIL Congress, June 1998, Dublin, Ireland
- Feunteun E, Acou A, Guillouët J, Laffaille P, Legault A 1998b. Spatial distribution of an eel population (*Anguilla anguilla* L.) in a small coastal catchment of northern Brittany (France). Consequences of hydraulic works. Bull Fr Pêche Piscic 349: 129–139
- Feunteun E, Acou A, Laffaille P, Legault A 2000. The European Eel (*Anguilla anguilla*, L.): prediction of spawner escapement from continental population parameters. Can J Fish Aquat Sci 57: 1627–1635

- Feunteun EE 2002. Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain. *Ecol Eng* 18 5: 575- 591
- Fontaine YA, Pisam M, Le Moal C, Rambourg A 1995. Silvering and gill “mitochondrial-rich” cells in the eel, *Anguilla anguilla*. *Cell Tissue Res* 281: 465-471
- Franzellitti S, Kiwan A, Valbonesi P, Fabbri E 2015. Selection of best performing reference products for investigating transcriptional regulation across silvering in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Sci Rep* 1-14
- Friedland KD, Miller MJ, Knights B 2007. Oceanic changes in the Sargasso Sea and declines in recruitment of the European eel. *ICES J Mar Sci, Advance Access* March 30, 2007, 12 pp
- Fulton T W 1904. The rate of growth of fishes. 22nd Annual Report of the Fishery Board of Scotland Part III:141–241
- Gadeau de Kerville M 1918. Recherches experimentales sur la durée de la vie de l'anguille commune (*Anguilla anguilla* L.) dans un milieu sec. *Bull Soc Zool Fr* 42: 115-117
- Giltrow E, Eccles PD, Hutchinson TH, Sumpter JP, Rand-Weaver M 2011. Characterisation and expression of  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - and  $\beta_3$ -adrenergic receptors in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Gen Comp Endocrinol* 173: 483–490
- Gimeno L, Ferrando MD, Sanchez S, Andreu E 1994. Endosulfan effects on liver and blood of the eel, *Anguilla anguilla*. *Comp Biochem Physiol* 108C: 343-348
- Gimeno L, Ferrando MD, Sanchez S, Gimeno LO, Andreu E 1995. Pesticide effects on eel metabolism. *Ecotoxicol Environ Saf* 31: 153-157
- Gony S 1990. Short note on the effects of cadmium on the gill of the glass eel (*Anguilla anguilla*). *Int Rev Gen Hydrobiol* 75: 835–836
- Gordon J, Shapley RW, Kaplan E 1978. The eel retina, receptor classes and spectral mechanisms. *J Gen Physiol* 71: 123-138
- Gorovaya SL 1973. Morphology of the olfactory analyser of the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Vyestsi Akad Nauk SSR* 5: 104-108
- Haenen OLM, Grisez L, De Charleroy D, Belpaire C, Ollevier F 1989. Experimentally induced infections of European eel *Anguilla anguilla* with *Anguillicola crassus*

(Nematoda, *Dracunculoidea*) and subsequent migration of larvae. *Dis Aquat Org* 7: 97–101

Haenen OLM, Lehmann J, Engelsma MY, Sturenberg FJ, Roozenburg I, Kerkhoff S, Breteler JK 2010. The health status of European silver eels, *Anguilla anguilla*, in the Dutch River Rhine Watershed and Lake IJsselmeer. *Aquaculture* 309: 15-24

Han YS, Liao IC, Tzeng WN, Ju JY 2004. Cloning of the cDNA for thyroid stimulating hormone  $\beta$  subunit and changes in activity of the pituitary-thyroid axis during silvering of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *J Mol Endocrinol* 32: 179-194

Harries DHA 1974. Sex, growth and distribution of the long finned eel, *Anguilla dieffenbachii*. M.Sc. Thesis, University of Otago, Dunedin

Helfman GS, Facey DE, Stanton Hales L, Bozeman EL 1987. Reproductive ecology of the American eel 1987. *Am Fish Soc Symp* 1: 42-56

Helfman GS, Facey DE, Hales S, Bozeman EL 1987. Reproductive ecology of the American eel. In: Dadswell MJ, Klauda RJ, Moffitt CM, Saunders RL, Rulifson RA, Cooper JE (eds). *Common strategies of anadromous fishes, Massachusetts*. American Fisheries Society, Bethesda 286-297

Hipkins S. Adrenergic responses of the cardiovascular system of the eel, *Anguilla australis*, *in vivo* 1985. *J Exp Biol* 235: 7–20

Holmgren K, Mosegaard H 1996. Implications of individual growth status on the future sex of the European eel. *J Fish Biol* 49: 910–925

Holmgren K, Wickström H, Clevestam P 1997. Sex related growth of European eel, *Anguilla anguilla*, with focus on median silver eel age. *Can J Fish Aquat Sci* 54: 2775–2781

Huang YS, Rousseau K, Le Belle N, Vidal B, Burzawa-Gérard E, Marchelidon J, Dufour S 1998. Insulin-like growth factor-I stimulates gonadotrophin production from eel pituitary cells: a possible metabolic signal for induction of puberty. *J Endocrinol* 159: 43-52

ICES 2002. ICES C.M. 2003/ACFM:06. Report of the ICES/EIFAC Working Group on Eels

Ishikawa S, Suzuki K, Inagaki T, Watanabe S, Kimura Y, Okamura A, Otake T, Mochioka N, Suzuki Y, Hasumoto H, Oya M, Miller MJ, Lee TW, Fricke H, Tsukamoto K

2001. Spawning time and place of the Japanese eel *Anguilla japonica* in the North Equatorial Current of the western North Pacific Ocean. *Fish Sci* 67: 1097-1103
- Jakubowski M 1960. The structure and vascularization of the skin of leather carp (*Cyprinus carpio var. nuda*) and flounder (*Pleuronectes flesus lascus* Pall.). *Acta biol cracov*, Ser Zool 3: 139-162
- Janicki RH, Kinter WB 1971. DDT: disrupted osmoregulatory events in the intestine of the eel *Anguilla rostrata* adapted to seawater. *Science* 173:1146–1148
- Jellyman DJ 2001. The influence of growth rate on the size of migrating female eels in Lake Ellesmere, New Zealand. *J Fish Biol* 58: 725-736
- Jespersen P 1942. Indo-Pacific leptocephalids of the genus *Anguilla*. *Dana Rep* 22: 1-128
- Kaluza J 1959. The blood vessels of the olfactory organ of the eel. *Acta Biol Cracov Ser Zool* 2: 89-96
- Kei Z, Yoshikazu S, Hideharu S, Kimura S 2011. Estimation of larval duration in *Anguilla* spp., based on cohort analysis, otolith microstructure, and Lagrangian simulations. *Mar Ecol Prog Ser* 438: 219-228
- Kettle AJ, Haines K 2006. How does the European eel (*Anguilla anguilla*) retain its population structure during its larval migration across the North Atlantic Ocean? *Can J Fish Aquat Sci* 63: 90–106
- Kettle JA, Dorothee CE, Bakker E, Haines K 2008. Impacts of North Atlantic Oscillation on the trans-Atlantic migrations of the European eel (*Anguilla anguilla*). *J Geophys Res* 113: 1-26
- King JA, Dufour S, Fontaine YA, Millar RP. 1990. Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and chicken II GnRH in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary. *Peptides* 11: 507–514
- Kinter WB, Merckens LS, Janicki RH, Guarino AM 1972. Studies on the mechanism of toxicity of DDT and polychlorinated biphenyls (PCBs): disruption of osmoregulation in marine fish. *Environ Health Perspect* 1:169–173
- Kiwan A 2011. Controllo adrenergico del metabolismo glucidico in *Anguilla anguilla*. Tesi di Laurea Magistrale in Biologia Marina – Alma Mater Studiorum Università di Bologna (Ravenna, Italia) 83

- Kleckner RC 1980a. Swimbladder wall guanine enhancement related to migratory depth in silver phase *Anguilla rostrata*. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 65: 351-354
- Kleckner RC 1980b. Swim bladder volume maintenance related to initial oceanic migratory depth in silver-phase *Anguilla rostrata*. *Science* 208: 1481-1482
- Kleckner RC, Kruger WH 1981. Changes in swim bladder retial morphology in *Anguilla rostrata* during premigration metamorphosis. *J Fish Biol* 18: 569-577
- Knowles F, Vollrath L 1966. Changes in the pituitary of the migrating European eel during its journey from rivers to the sea. *Zeitschrift für Zellforschung* 75: 317-327
- Kottelat M, Freyhof J 2007. Handbook of European freshwater fishes (1st ed). Publications Kottelat, Cornol, Switzerland
- Kuhlmann H 1975. Der Einfluss von Temperatur, Futter, Grösse und Herkunft auf die sexuelle Differentierung von Glassaalen (*Anguilla anguilla*). *Helgoländer wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 27: 139–155
- Kuroki M, Kawai M, Jónsson B, Aoyama J, Miller M, Noakes D, Tsukamoto K 2008. Inshore migration and otolith microstructure/microchemistry of anguillid glass eels recruited to Iceland. *Environ Biol Fishes* 83: 309–325
- Laibach E 1937. Das Geruchsorgan des Aals (*Anguilla vulgaris*) in seinen verschiedenen Entwicklungsstadien. *Zool Jb Anat* 63: 37-72
- Larinier M, Dartiguelongue J 1989. La circulation des poissons migrateurs: le transit à travers les turbines des installations hydroélectriques. *Bull Fr Pêche Piscic* 312/ 313: 1–90
- Larsson P, Hamrin S, Okla A 1990. Fat content as a factor inducing migratory behaviour in the eel (*Anguilla anguilla* L.) to the Sargasso Sea. *Naturwissenschaften* 77: 488–490
- Lecomte-Finiger R 1992. Growth history and age at recruitment of European glass eels (*Anguilla anguilla*) as revealed by otolith microstructure. *Mar Biol* 114: 205-210
- Legault A, Porcher JP 1989. Distribution du peuplement d'anguilles à l'échelle régionale Bretagne Basse Normandie (France). EIFAC Working Party on Eel, May and June 1989, Porto, Portugal

- Lionetto MG, Maffia M, Cappello MS, Giordano ME, Storelli C, Schettino T 1998. Effect of cadmium on carbonic anhydrase and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase in eel, *Anguilla anguilla*, intestine and gills. *Comp Biochem Phys A* 120:89–91
- Lokman PM, Young G 1998. An intersexual migratory (silver) longfinned New Zealand eel and its gonadal response to treatment with salmon pituitary homogenate. *J Fish Biol* 52: 547-555
- McCleave JD, Wippelhauser GS 1982. Behavioural aspects of selective tidal stream transport in juvenile American eels. *Am Fish Soc Symp* 1: 138-150
- Mochioka N 1994. Morphology and classification of *Anguilla japonica* leptocephalus. *Kaiyo Mon* 287: 299-301
- Mochioka N 1996. Morphology and growth of Japanese eel larvae. In: Early life-history and prospects of seed production of the Japanese eel *Anguilla japonica*. Koseisha-koseikaku, Tokyo 22-32
- Mochioka N 2003. Leptocephali. In Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (eds): *Eel Biology*. Springer, Tokyo, 51
- Moriarty C, Dekker W 1997. Management of the European eel. *Fish Bull* No 15.
- Moriarty C 2003. The yellow eel. In Aida K, Tsukamoto K, Yamauchi K (eds): *Eel Biology*. Springer, Tokyo, 91-105
- Mourad MH 1990. Effects of lindane on the electrocardiogram of eel, *Anguilla anguilla* L. *Acta Ichthyol Pisc* 20: 77-84
- Mourad MH 1991. Cardiovascular and respiratory changes in eel, *Anguilla anguilla* L., during exposure to lethal doses of lindane at different water temperatures. *Acta Ichthyol Pisc* 21: 73-79
- Mommsen TP, Moon TW 1990. Metabolic response of teleost hepatocytes to glucagon-like peptide and glucagon. *J Endocrinol* 126: 109–118
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273
- Neumann W 1985. The parasite *Anguillicola* in the swim bladder of eels. *Fischer und Teichwirt*, Nurnberg 11

- Nickerson JG, Dugan SG, Drouin G, Perry SF, Moon TW 2003. Activity of the unique beta-adrenergic Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger in trout erythrocytes is controlled by a novel beta3-AR subtype. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 285: R526-535
- Oliveira K 1997. Movements and growth rates of yellow-phase American eels in the Annaquatucket River, Rhode Island. *Trans Am Fish Soc* 126: 638–646
- Oliveira K 1999. Evidence for environmental sex determination in the American eel, *Anguilla rostrata*. *Env Biol Fish* 55: 381-389
- Oliveira K, McCleave JD 2000. Variation in population and life history traits of the American eel, *Anguilla rostrata*. *Can J Fish Aquat Sci* 56: 795-802
- Oliveira K, McCleave JD 2002. Sexually different growth histories of American eel in four rivers in Maine. *Env Biol Fish* 59: 141-151
- Ozawa T, Kakizoe F, Tabeta O, Maeda T, Yuwaki Y 1991. Japanese eel leptocephali from three cruises in the western North Pacific. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 1877-1881
- Palstra A, Van Ginneken JT, Murk AJ, Van Den Thillart JM 2005. Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften* 93: 145-148
- Palstra AP, Van Ginneken VJT, Murk AJ, Van den Thillart GEEJM 2006. Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften* 93: 145–148
- Pankhurst NW 1982. Changes in the skin scale complex with sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *J Fish Biol* 21: 549-561
- Pankhurst NW 1982. Relation of visual changes to the onset of sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *J Fish Biol* 21: 127–140
- Pankhurst NW, Sorensen PW 1984. Degeneration of the alimentary- tract in sexually maturing European *Anguilla anguilla* (Lesueur.). *Can J Zool* 62: 1143-1149
- Pankhurst NW, Lythgoe JN 1982. Structure and colour of the integument of the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *J Fish Biol* 21: 279-296
- Pankhurst NW 1984. Retinal development in larval and juvenile European eel, *Anguilla anguilla*. *Can J Zool* 62: 335-343

- Peters G, Hartmann F 1986. *Anguillicola*, a parasitic nematode of the swimbladder spreading among eel populations in Europe. *Dis Aquat Org* 1: 229–230
- Pfeiler E 1984. Glycosaminoglycan breakdown during metamorphosis of larval bonefish *Albula*. *Mar Biol Lett* 51: 241-249
- Pfeiler E 1986. Towards an explanation of the developmental strategy in leptocephalus larvae of marine teleost fishes. *Environ Biol Fish* 15: 3-13
- Pfeiler E 1989. Sensory systems and behavior of premetamorphic and metamorphic leptocephalus larvae. *Brain Behav Evol* 34: 25-34
- Pfeiler E 1991. Glycosaminoglycan composition of anguilliform and elopiform leptocephali. *J Fish Biol* 38: 533-540
- Pierron F, Baudrimont B, Bossy A, Bourdineaud JP, Brèthes D, Elie P, Massabuau JC 2006. Impairment of lipid storage by cadmium in the European Eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat Toxicol* 81: 304-311
- Poli A, Fabbri E 2012. *Fisiologia degli Animali marini*. EdiSES s.r.l., Napoli
- Poole WR, Reynolds J 1996. Growth rate and age at migration of *Anguilla anguilla*. *J Fis*
- Rasquin P 1955. Observation on the metamorphosis of the bonefish, *Albula vulpes* (Linnaeus). *J Morphol* 97: 77-117
- Robinet TT, Feunteun EE 2002. Sublethal effects of exposure to chemical compounds: a cause for the decline in Atlantic eels?. *Ecotoxicology* 11: 265-277
- Rousseau K, Huang YS, Le Belle N, Vidal B, Marchelidon J, Epelbaum J, Dufour S 1998. Long-term inhibitory effects of somatostatin and insulin-like growthfactor 1 on growth hormone release by serum-free primary culture of pituitary cells from european eel (*Anguilla anguilla*). *Neuroendocrinology* 67: 301–309
- Rousseau K, Lafont AG, Jérémy Pasquier, Maugars G, Jolly C, Sébert ME, Aroua S, Pasqualini C, Dufour S 2014. Advances in Eel Reproductive Physiology and Endocrinology. In Trischitta F, Takei Y, Sébert P (eds): *Eel Physiology 2014*. CRC Press, New York

- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 293: 487-491
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory Manual* (2<sup>nd</sup> ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sancho E, Ferrando MD, Andreu E 1996. Physiological stress responses of *Anguilla anguilla* to fenithron. *J Environ Sci Health, Part B, Pestic Food Contam Agric Wastes* B31: 87-98
- Sancho E, Ferrando MD, Andreu E 1998. Effects of sublethal exposure to a pesticide on levels of energetic compounds in *Anguilla anguilla*. *J Environ Sci Health B* 33:411–424
- Santos MA, Hall A 1990. Influence of inorganic lead on the biochemical blood composition of the eel, *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicol Environ Saf* 20: 7-9
- Sasai S, Kaneko T, Hasegawa S, Tsukamoto K 1998. Morphological alteration in two types of gill chloride cells in Japanese eels (*Anguilla japonica*) during catadromus migration. *Can J Zool* 76: 1480-1487
- Sébert P 2003. Fish adaptations to pressure. In: AL Val and BG Kapoor (eds). *Fish Adaptation*. Science Publishers, Enfield (NH), USA 73–95
- Sinha VPR, Jones JW 1975. *The European freshwater eel*. Liverpool University Press, Liverpool
- Smith DG 1989. Family Anguillidae: leptocephali. In: Bohlke EB (ed) *Fishes of the western North Pacific*, part 9, vol 2. Sears Foundation for Marine Research, Yale University, New Haven 88-899
- Stearns SC 1976. Life -history tactics: a review of ideas. *Q Rev Biol* 51: 3–47
- Steen JB 1963b. The physiology of the swimbladder of the eel *Anguilla vulgaris*. II. The reabsorption of gases. *Acta physiol scand* 58: 138-149
- Steen JB 1963c. The physiology of the swimbladder of the eel *Anguilla vulgaris*. III. The mechanism of gas secretion. *Acta physiol scand* 59: 221-241
- Svendäng H, Neuman E, Wickström H 1996. Maturation patterns in female European eel: age and size at the silver eel stage. *J Anim Ecol* 48: 342–351

- Székely CS, Molnár K, Müller T, Szabó A, Romvári R, Hancz CS, Bercsényi M 2003. Comparative study of X-ray computed tomography and conventional X-ray methods in the diagnosis of swimbladder infection of eel caused by *Anguillicola crassus*. *Dis aquat org* 58 (2-3): 157-164.
- Teichmann H 1954. Vergleichende Untersuchungen an der Nase der Fische. *Z Morph Ökol Tiere* 43: 171-212
- Teichmann H 1959. Über die Leistung des Geruchssinnes beim Aal (*Anguilla anguilla* L.). *Z vergl Physiol* 42
- Tesch FW 1977. *The eel*. Chapman & Hall ed., London
- Tesch FW 1991. *Anguilla anguilla* (Linnaeus, 1758). In: Hoestland H (ed) *The freshwater fish of Europe*, Wiesbaden: 389-347
- Tesch FW 2003. *The eel* (3rd ed). Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, UK
- Tirri R, Ripatti P 1982. Inhibitory adrenergic control of heart rate of perch (*Perca fluviatilis*) in vivo. *Comp Biochem Physiol* 73:399–401
- Tsukamoto K, Umezawa A, Ozawa T 1992. Age and growth of *Anguilla japonica* leptocephali collected in western North Pacific in July 1990. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 457-459
- Usui A 1991. *Eel culture*. Fishing News Books. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, UK
- Van Ginneken V, Bruijs M, Murk T, Palstra A, Van den Thillart G 2009. The effects of PCBs on the spawning migration of European silver eel (*Anguilla anguilla* L.). *Fish Fish* 365-386
- Van Ginneken V, Durif C, Dufour S, Sbaihi M, Boot R, Noorlander K, Doornbos J, Murk AJ, Van den Thillart G 2007. Endocrine profiles during silvering of the European eel (*Anguilla anguilla* L.) living in saltwater
- Van Ginneken V, Dufour S, Sbaihi M, Balm P, Noorlander K, de Bakker M, Doornbos J, Palstra A, Antonissen E, Mayer I, Van den Thillart G 2007. Does a 5, 500-km swim trial stimulate early sexual maturation in the European eel (*Anguilla anguilla* L.)? *Comp Biochem Physiol A* 147: 1095–1103

- Van Ginneken VJT, Maes GE 2005. The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus) its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Rev Fish Biol Fish* 15: 367-398
- Vøllestad LA 1992. Geographic variation in age and length at metamorphosis of maturing European eel: environmental effects and phenotypic plasticity. *J Anim Ecol* 61: 41–48
- Vøllestad LA, Jonsson B 1986. Life-history characteristics of the European eel, *Anguilla anguilla*, in the Isma River, Norway. *Trans Am Fish Soc* 115: 864–871
- Walls G 1942. *The Vertebrate Eye and its Adaptive Radiation*. Cranbrooke, Bloomfield Hills, USA
- Wade MG, Van Der Kraak G, Gerrits MF, Ballantyne J S 1994. Release and steroidogenic actions of polyunsaturated fatty acids in the goldfish testis. *Biol Reprod* 51: 131–139
- Wald G 1959. The significance of vertebrate metamorphosis. *Science* 128: 1481-1490
- Wathes DC, Abayasekara DRE, Aitken RJ 2007. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod* 77: 190–201
- Wang CH, Tzeng WN 2000. The timing of metamorphosis and growth rates of American and European eel leptocephali: a mechanism of larval segregative migration. *Fish Res* 46: 191-205
- Wenner CA, Musick JA 1974. Fecundity and gonad observations of the American eel, *Anguilla rostrata*, migrating from Chesapeake Bay, Virginia. *J Fish Res Board Can* 31: 1387–1391
- Wiberg U 1983. Sex determination in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) A hypothesis based on cytogenetic results correlated with the finding of skewed sex ratios in eel culture ponds. *Cytogenet Cell Genet* 36: 589-598
- Wielgoss S, Taraschewski H, Meyer A, Wirth T 2008. Population structure of the parasitic nematode *Anguillicola crassus*, an invader of declining North Atlantic eel stocks. *Mol Ecol* 17: 3478–3495
- Wunder W 1936. Physiologie der Süßwasserfische Mitteleuropas. In: *Handbuch Binnefish Mitteleur* 2B

Würtz J, Taraschewski H, Pelster B 1996. Changes in gas composition in the swimbladder of the European eel (*Anguilla anguilla*) infected with *Anguillicola crassus* (Nematoda). *Parasitology* 112: 233–238

Zacchei AM, Tavolaro P 1988. Lateral line system during the life cycle of *Anguilla anguilla* (L.). *Boll Zool* 3: 145–153