

Supplementary material

Seasonal temperature fluctuations differently affect immune and biochemical parameters of diploid and triploid *Oncorhynchus mykiss* cage-cultured in temperate latitudes

Andreia C. M. Rodrigues ^{1,*}, Carlos Gravato ², Carlos Silva ¹, Sílvia F. S. Pires ¹, Ana P. L. Costa ¹, Luís E. C. Conceição ³, Paulo Santos ⁴, Benjamín Costas ^{4,5}, José Calheiros ⁶, Manuela Castro-Cunha ⁶, Amadeu M. V. M. Soares ¹ and Rui J. M. Rocha ¹

¹ CESAM - Centro de Estudos do Ambiente e do Mar & Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, 3810- 193 Aveiro, Portugal

² Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa & CESAM, Universidade de Lisboa, Campo Grande 1749-016 Lisboa, Portugal

³ Sparos, Lda. Área Empresarial de Marim, Lote C, 8700-221 Olhão, Portugal

⁴ Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR/CIMAR), Universidade do Porto, Matosinhos, Portugal

⁵ Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, 4050-313 Porto, Portugal

⁶ A. Coelho & Castro Lda. Praça Luís de Camões. 4490-441 Póvoa de Varzim, Portugal

* Correspondence: rodrigues.a@ua.pt;

Supplementary Table 1: Diploid and triploid *O. mykiss* total lenght (TL, cm) and weight (W, g) measured in farm routine sampling from May 2016 to March 2017

Diploid batch					Triploid batch				
Date	TL (cm)	W (g)	TL (cm)	W (g)	Date	TL (cm)	W (g)	TL (cm)	W (g)
26/04/2016	8	7	8,1	8	18/05/2016	8,9	13	8,5	10
	7,9	7	8,1	8		8,7	10	5,1	3
	8,4	9	7,6	8		9,3	13	7,1	7
	7,8	7	7,8	8		8,9	13	6,8	5
	7,6	7	9,8	12		10,3	19	6,8	6
	7	5	8,4	7		7,6	7	6,5	3
	7,6	6	9,8	11		9,4	13	5,2	2
	7,4	7	8,7	7		9,4	13	8	8
	6,1	4	7,9	5		9	12	6,1	3
	6	4	8,1	9		7,8	7	7,8	7
28/04/2016	8,1	9	7,4	7	25/05/2016	8,9	11	6,8	5
	8,1	10	8,4	9		10,6	22	8,2	8
	7,2	7	8,2	8		7,8	7	8,5	10
	7,3	7	7,7	7		8,4	10	7,5	7
	7,4	6	7,8	8		8,4	11	8,7	9
	7,3	7	8	9		9,8	19	6,3	4
	7,3	6	7,1	6		10,1	18	7,5	7
	7,7	9	7,1	6		9,6	15	7	5
	6,9	5	7,1	5		8,2	9	6,2	2
	8,1	8	8,2	9		10,2	21	8,6	9
02/05/2016	9,5	14	8,2	11	08/06/2016	10,1	16	8,7	11
	8,4	10	7,8	7		9,4	15	10,6	17
	8,9	11	8,1	8		12,1	27	9,6	14
	8,7	13	7,7	7		12,6	31	7,9	6
	8	9	8,5	11		12,2	29	9,6	12
	6,5	5	8,4	10		10,6	18	9	11
	7,7	8	8,8	10		10,9	23	9,9	15
	7,7	9	7,7	7		10,3	16	9,2	11
	7,3	6	7,7	7		10,8	19	10,4	16
	6,9	5	8,8	12		10,4	18	9,7	13
06/05/2016	8,2	11	8,3	9	17/06/2016	11,7	25	9	11
	8	9	8,3	9		12,6	30	9,6	14
	9	12	8,7	9		12,1	26	9,9	15
	7,2	7	8,3	8		11,2	23	9,9	14
	8,9	12	8,3	8		12,5	31	9,2	12
	8	9	7,9	7		11,7	24	9,3	13
	7,7	7	7,8	7		12	27	7,7	7
	7,6	7	7	5		11,7	24	10,5	17
	8	9	7,9	7		13,9	41	9,8	12
	7	5	9,7	14		12,8	17	9,9	15
12/05/2016	7,7	11	9,1	13	21/06/2016	11,9	23	10,9	18
	8,1	8	10,4	16		12,2	27	11,2	19
	7,8	8	8,8	12		13,6	37	11,6	20
	8,7	8	9,5	13		11	22	11,8	23
	8,8	11	8,8	12		12,2	29	9,1	11
	7,8	8	7,6	7		11,5	25	7,5	6
	7,8	8	7,9	9		13	33	12	24
	8,6	10	9,1	12		11,6	21	9,9	13
	8,4	9	8,1	8		9,1	10	11,8	23
	7,6	6	7,4	6		11,8	25		
23/06/2016	11,9	25	11	19	01/07/2016	12,7	38	10,9	18
	14,5	40	10,6	15		12,6	35	11,8	22
	12	25	8,6	8		14,4	51	10,1	16
	12,7	32	8,4	8		13,5	40	10,3	17
	12,3	29	12,3	24		15,3	45	11,1	18
	11,9	26	10,3	13		14,2	47	7,2	8
	9,9	15	10,2	14		14,6	47	6,8	5
	10,6	18	10,7	15		13,2	38	10,8	17
	11,9	29	10,6	17		11,8	29	10	13
	12,4	28	9,7	11		12,3	35	8,6	9
08/07/2016	12,2	29	12,4	27	20/07/2016	12,5	30	12,2	27
	10,9	21	9,5	12		12	27	13	31
	13,2	36	12,5	31		9,3	14	12,7	27
	12,7	33	11	17		11,5	24	12,5	29
	11,1	23	11,4	20		12	26	12,2	27
	10,4	21	13,5	33		12,3	28	10,8	18
	12,2	25	11,9	24		11,2	26	12,2	25
	8,1	9	9,5	13		10,8	27	13,7	32
	11,5	29	11	16		8,9	10	11,1	19
	10,1	18	8,2	8		11,5	24		
04/08/2016	9,6	14	14,9	45		13,3	35	13,7	39
	13,3	35	13,7	39		11	20	14,3	41
	12,6	31	13,4	34		14	46	13	34
	8	8	13,7	36		10,2	16	11	19
	11,5	24	13	31		11,5	24	13	31
	13	27	14	39		10,2	16	14,4	42

Date	Diploid batch		Triploid batch		Date	Diploid batch		Triploid batch	
	TL (cm)	W (g)	TL (cm)	W (g)		TL (cm)	W (g)	TL (cm)	W (g)
07/09/2016	13,6	41	13,6	38	19/12/2016	21	130	21,1	103
	12,2	33	14,3	45		21,9	175	14,4	35
	13,1	36	14,6	47		24,1	214	15,8	42
	14,8	35	14,2	42		18,2	98	19,5	99
	12,6	34	14	33		24	225	17,7	69
	14,8	56	14	41		18,4	100	12,8	26
	14,2	48	11,8	24		21,9	183	14,4	38
	14,6	51	13,5	39		16,5	90	20,6	106
	13,1	38	13,9	36		19,3	110	20,5	113
	12,1	28	15,5	53		18,3	104	15,1	52
22/09/2016	14,9	54	16,5	70	30/01/2017	25,5	283	19,1	99
	11,8	27	19,5	104		19,7	144	21,1	120
	10,1	19	13,3	34		22,9	222	17,2	63
	16,1	59	13,5	35		25,5	259	19	91
	15	57	16,9	74		26,3	298	23,5	163
	12,5	32	16,5	61		23,1	197	25,9	206
	10	16	15,6	56		24,7	247	21	136
	16,3	69	16,8	69		23,9	203	21,4	119
	11,8	31	17	70		25,5	272	20,4	118
	12,8	37	17,4	73		22,9	216	17,5	64
17/10/2016	17,4	93	18,2	89	24/02/2017	21,2	167	15,4	47
	16,1	77	19,7	107		23,1	227	19,2	82
	13,5	44	15,4	50		24,8	243	17,6	69
	15,2	63	12,5	41		17,9	82	23,2	143
	13,5	51	18,5	89		17,8	83	23,1	147
	15,4	62	17,5	65		22,8	203	17,8	75
	18,5	115	16,8	71		21,4	158	18,5	77
	14,8	63	20	63		21,5	174	24,4	171
	18	109	18,3	77		26,7	268	25,9	195
	17	83	14	37		23,6	230	22,9	137
25/10/2016	18,1	95	21,3	128	24/03/2017	28	331	25,2	184
	21	146	20,8	127		24,5	251	30,2	368
	19,4	124	16,5	53		26,8	255	26,4	216
	17,7	90	16,3	58		27,3	430	25,9	169
	20,3	138	20,8	108		24,9	256	25,5	187
	19,4	114	16,9	77		22,8	233	25,4	170
	18,1	94	17,1	59		28,3	370	26	204
	19,1	110	20	96		30,3	397	27,8	215
	16,4	85	14,9	48		27,8	445	26,3	219
	16	79	17,4	72		30,5	477	29,9	335
02/11/2016	17,7	85	18,5	93	28/04/2017	31,6	440	27,3	211
	15,9	59	16,5	59		31,5	478	27,6	229
	16,7	76	19,4	97		26,5	250	31,3	347
	15,9	61	16,3	52		29	419	28,7	270
	18	90	12,9	32		30,3	508	26,7	223
	20,5	152	17,6	55		26,3	210	27,4	245
	17,3	90	17,9	70		29,6	455	26,1	194
	15,9	48	18,1	68		32,4	581	32	323
	19,5	114	17,6	74		28,6	370	27,1	240
	15,4	61	18	73		29,7	427	28,6	262
11/11/2016	21	140	16	51					
	12,3	31	15,9	49					
	14,7	77	14,1	41					
	18,2	93	16	47					
	18	94	16,5	50					
	15,2	83	17,3	75					
	17,1	84	16,1	55					
	19,4	105	16,5	53					
	16,3	80	17,9	73					
	11,4	25	17,7	78					
25/11/2016	19,6	139	16,7	55					
	18	96	18,5	77					
	16,9	81	17,8	75					
	18,4	101	16,1	50					
	18,5	123	16	57					
	18,8	111	11,3	19					
	18,3	91	19	85					
	15,1	67	19,4	106					
	18,3	102	19,3	95					
	18,3	97	20	114					

Supplementary Table 2. Two-way ANOVA results for *O. mykiss* fresh weight with the water temperature at the day of sampling and type of ploidy as factors.

	Factor	df	F	p	% of total variation
Fresh weight	temperature	5, 108	90.37	<0.0001	10.46
	ploidy	1, 108	50.35	<0.0001	66.30
	interaction	5, 108	14.26	<0.0001	7.39

Supplementary Table 3. Two-way ANOVA results for *O. mykiss* peripheral blood leukocytes (thrombocytes, lymphocytes, monocytes, and neutrophils) with water temperature at the day of sampling and type of ploidy as factors.

	Factor	df	F	p	% of total variation
Neutrophils	temperature	4, 85	2.10	0.088	7.915
	ploidy	1, 85	5.17	0.026	4.876
	interaction	4, 85	1.73	0.151	6.518
Monocytes	temperature	4, 90	3.55	0.009	13.41
	ploidy	1, 90	0.99	0.321	0.941
	interaction	4, 90	0.13	0.971	0.492
Lymphocytes	temperature	4, 90	4.752	0.002	14.47
	ploidy	1, 90	3.52	0.064	2.679
	interaction	4, 90	4.713	0.002	14.35
Thrombocytes	temperature	4, 90	6.29	0.0002	18.24
	ploidy	1, 90	3.56	0.062	2.583
	interaction	4, 90	4.79	0.002	13.90

Supplementary Table 4. Two-way ANOVA results for *O. mykiss* immunological parameters (antiprotease, lysozyme and peroxidase activities) with water temperature and type of ploidy as factors.

	Factor	df	F	p	% of total variation
Antiprotease activity	temperature	5, 89	32.33	<0.0001	59.05
	ploidy	1, 89	7.576	0.007	2.767
	interaction	5, 89	1.864	0.109	3.405
Lysozyme activity	temperature	5, 95	5.323	0.0002	21.51
	ploidy	1, 95	0.747	0.390	0.604
	interaction	5, 95	0.427	0.829	1.725
Peroxidase activity	temperature	5, 98	16.28	<0.0001	47.77
	ploidy	1, 98	1.372	0.244	0.704
	interaction	5, 98	3.194	0.010	8.193

Supplementary Table 5. Two-way ANOVA testing for the effects of temperature variation and type of ploidy (D vs T), and their interaction in the biochemical biomarkers in the liver tissue of rainbow trout

	Biomarker	Factor	df	F	p	% of total variation
Oxidative stress	CAT	temperature	5, 100	51.29	< 0.0001	70.25
		ploidy	1, 100	0.33	0.569	0.089
		interaction	5, 100	1.20	0.314	1.646
	GST	temperature	5, 99	4.65	0.0007	17.37
		ploidy	1, 99	2.52	0.116	1.884
		interaction	5, 99	1.85	0.110	6.913
	TG	temperature	5, 93	10.74	< 0.0001	32.15
		ploidy	1, 93	18.71	< 0.0001	11.21
		interaction	5, 93	0.62	0.688	1.842
	LPO	temperature	5, 95	21.03	< 0.0001	50.44
		ploidy	1, 95	0.08	0.775	0.039
		interaction	5, 95	1.02	0.409	2.451
Cellular energy allocation	Sugars	temperature	5, 100	45.18	< 0.0001	60.68
		ploidy	1, 100	12.89	0.0005	3.463
		interaction	5, 100	5.654	0.0001	7.594
	Lipids	temperature	5, 96	30.37	< 0.0001	58.91
		ploidy	1, 96	8.279	0.005	3.212
		interaction	5, 96	0.782	0.565	1.517
	Proteins	temperature	5, 95	5.027	0.0004	18.08
		ploidy	1, 95	7.788	0.007	5.602
		interaction	5, 95	1.972	0.090	7.093
	Ea	temperature	5, 88	43.68	< 0.0001	68.32
		ploidy	1, 88	1.801	0.183	0.563
		interaction	5, 88	2.029	0.082	3.174
	Ec	temperature	5, 98	27.69	< 0.0001	56.01
		ploidy	1, 98	0.413	0.522	0.167
		interaction	5, 98	1.749	0.131	3.538
	CEA	temperature	5, 85	31.86	< 0.0001	61.58
		ploidy	1, 85	3.45	0.067	1.334
		interaction	5, 85	2.406	0.043	4.651

Table 6. Two-way ANOVA testing for the effects of temperature variation, type of ploidy and their interaction in the energy budget in the muscle tissue of rainbow trout

Biomarker	Factor	df	F	p	% of total variation
Sugars	temperature	5, 95	6.108	< 0.0001	18.1
	ploidy	1, 95	2.334	0.130	1.383
	interaction	5, 95	7.706	< 0.0001	22.83
Lipids	temperature	5, 92	95.57	< 0.0001	82.95
	ploidy	1, 92	2.046	0.156	0.355
	interaction	5, 92	7.517	< 0.0001	6.525
Proteins	temperature	5, 96	3.309	0.008	12.21
	ploidy	1, 96	22.26	< 0.0001	16.43
	interaction	5, 96	0.2626	0.932	0.969
Ea	temperature	5, 86	86.45	< 0.0001	82.44
	ploidy	1, 86	3.774	0.055	0.720
	interaction	5, 86	5.576	0.0002	5.317
Ec	temperature	5, 96	23.97	< 0.0001	50.79
	ploidy	1, 96	7.7	0.006	3.262
	interaction	5, 96	2.639	0.028	5.59
CEA	temperature	5, 79	12.34	< 0.0001	37.79
	ploidy	1, 79	0.7243	0.397	0.444
	interaction	5, 79	4.431	0.001	13.57