

I.A.M.C.-C.N.R. di Capo Granitola



***Procambarus Clarkii* (Girard 1852): Rapporto tecnico scientifico sulla riproduzione in ambiente controllato e acquisizione dei dati biometrici**

C. Bennici^A, A. Cuttitta^A, A. Nicosia^A, M. Musco^A, M. Torri^B, G. Biondo^A, C. Patti^A, M.V. Di Natale^A, B. De Luca^B, A. Di Maria^B, S. Mazzola^C.

a - Laboratory of Molecular Ecology and Biotechnology, Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 – 91021, Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia;

b - Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), UOS di Capo Granitola, via del Mare 3 - 91021 Torretta Granitola (Campobello di Mazara, Tp), Italia.

c - Istituto per l'Ambiente Marino Costiero del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IAMC-CNR), Calata Porta di Massa, Napoli, Italia.

Sommario

1. Premessa.....	3
2. Descrizione della specie.....	4
3. Materiali e metodi.....	6
3.1 Vasca di comunità.....	6
3.2 Condizionamento dei riproduttori.....	7
3.3 Accoppiamento e deposizione.....	8
3.4 Condizionamento in acquari da incubazione.....	9
4. Dati biometrici.....	11
4.1 Strumentazione.....	11
4.2 Uova.....	11
4.3 Giovanili.....	12
Bibliografia.....	14

1. Premessa

Procambarus Clarkii (Girard 1852) è una delle specie di crostacei di maggiore interesse scientifico-economico.

Le cause che spingono tali interessi sono sicuramente le intrinseche doti adattative della specie, fatte da: strategia riproduttiva vincente, grande adattabilità ad un ampio range di condizioni chimico-fisiche, e non per ultimo un potentissimo sistema immunitario.

Questi aspetti hanno fatto sì che il *P. Clarkii* divenisse oggetto di allevamento per uso edule, esportandolo praticamente in tutta la fascia temperata del globo, e successivamente fonte di studio in campo biomedico.

Stimolati dalla possibilità di utilizzare tale organismo come modello per studi multidisciplinari che spaziano dall'ecologia alla biochimica, e dalla biologia molecolare alla bioacustica, si è deciso di mettere a punto una serie di metodologie da utilizzare per lo studio di questo organismo passando da una delle fasi di vita principali quale la riproduzione.

Lo scopo è ottenere una risposta riproduttiva sincronizzata dell'intero stock di riproduttori, per poter valutare in repliche scientificamente significative le risposte agli studi effettuati sul sistema immunitario e sugli aspetti comportamentali.

A questo si affiancherà la parte delle rilevazioni biometriche nelle varie fasi di vita, che saranno utilizzate come supporto ai successivi studi.

2. Descrizione della specie

P. Clarkii appartiene al Phylum Arthropoda, classe Crustacea, sottoclasse malacostraca.

Detto anche gambero rosso della Louisiana, nei luoghi di origine vive in corpi idrici lentici e lotici caldi ove si è adattato anche a lunghi periodi di disseccamento.

Per questo motivo trova l'ambiente ideale in luoghi anche solo periodicamente allagati come risaie, canali di bonifica e loro ramificazioni; ciò non toglie comunque, che questo gambero non abiti pure in corsi d'acqua perenni anche di grandi dimensioni.

Le temperature ottimali per questa specie si collocano tra i 21 ed i 27 °C, con un blocco della crescita a temperature inferiori ai 12 °C (Ackefors 1999); è pure in grado di sopportare condizioni ambientali estreme come le alte temperature (fino a 35 °C).

Il gambero della Louisiana è inoltre in grado di colonizzare acque salmastre con intervalli di PH compresi fra 5,6 e 10,4.

Grazie alla particolare camera branchiale è in grado di utilizzare sia l'ossigeno disciolto in acqua sia quello atmosferico integrando al bisogno la respirazione acquatica con quella aerea (Huner & Barr 1984); in tal modo *P. Clarkii* può così rimanere in acque calde con temperature di 25 °C, addirittura in anaerobiosi totale fino a 12 ore, lo stesso accade in acque più fredde con valori inferiori a 10 °C, dove sopravvive senza apparenti problemi per alcune settimane.

P. Clarkii è una delle specie più invasive al mondo. Alcune caratteristiche del suo ciclo vitale, politropismo, rapidità di crescita, fecondità ed elevata resistenza alle malattie, rendono la sua coltivazione ed il suo allevamento fattibili.

E' anche noto come "gambero killer", in quanto portatore sano di alcune gravi malattie, tra cui la peste del gambero. Originario degli Stati Uniti centro meridionali e del Messico nord-orientale.

Questo gambero è oggi presente in tutti i continenti tranne che in Oceania e ai poli.

Questa diffusione è da attribuirsi ad eventi di natura antropica, quali introduzioni volontarie e accidentali.

Figura 1

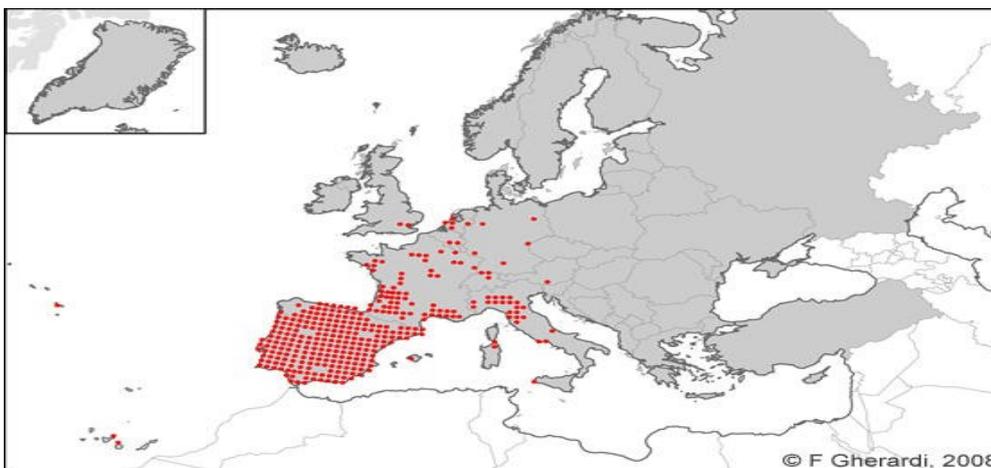


Figura 1: Distribuzione di *P. Clarkii* in Europa

P. Clarkii ha un impatto negativo sulla fauna indigena, l'organizzazione e la funzione degli ecosistemi e causa danni strutturali ai territori colonizzati, infatti essendo una specie onnivora e vorace, nei torrenti e stagni dove si diffonde, provoca un notevole danno per l'equilibrio degli ecosistemi, mangiando uova di pesci, di anfibi e di insetti acquatici.

I danni provocati da questo organismo sono anche di natura strutturale agli argini dei fiumi nei quali scava profonde tane che vanno ad indebolirne la struttura.

Il tutto è amplificato dalla vincente strategia riproduttiva che prevede lunghe cure parentali da parte della madre e dalla scarsa presenza di predatori naturali oltre alla già citata velocità di accrescimento.

I sessi sono separati ed è presente un evidente dimorfismo sessuale evidenziato dalla maggiore dimensione del primo paio di chele nei maschi e dalla presenza in questi ultimi di due paia di pleopodi modificati che hanno il compito di trasferire le spermatofore nella femmina.

Figura 2

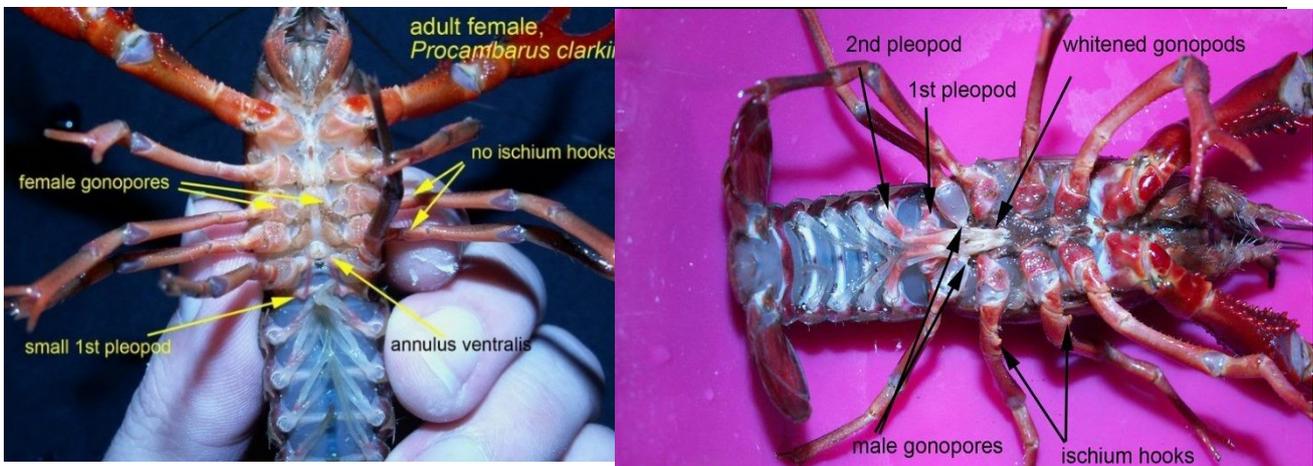


Figura 2: Differenze anatomiche dell'apparato riproduttore esterno tra femmine e maschi

3. Materiali e metodi

3.1 Allestimento della vasca di comunità

E' stata allestita una vasca in vetroresina delle seguenti dimensioni:

Lunghezza 4 m.

Larghezza 1 m.

Altezza 1 m.

Figura 3



Figura 3: Vasca di comunità

Nella stessa è stata inserita acqua proveniente dalla rete idrica comunale per una altezza totale di 25 cm per un volume complessivo di 1 m³.

L'acqua è stata trattata con biocondizionatore ad uso acquariologico allo scopo di renderla dal punto di vista chimico-biologico adatta alla vita degli ospiti, le dosi utilizzate sono quelle consigliate dall'azienda fornitrice.

E' stato allestito un adeguato sistema di areazione composto da una pompa soffiante a membrane, due tubi in silicone da 5 mm di diametro e due pietre porose cilindriche da 1 cm di diametro per 10 cm di lunghezza.

A distanza di una settimana sono stati analizzati i principali parametri chimico fisici al fine di definire se l'acqua nello stato delle cose si trovasse nelle condizioni ideali ad ospitare i *P. Clarkii*.

La tabella di seguito riporta i parametri controllati con i rispettivi valori riscontrati.

NO ₂	NO ₃	O ₂	PH	dGH	KH	C°
0.2 mg/l	21 mg/l	7 mg/l	7.8	8	6	22

Tabella 1 – Valori chimico fisici dell'acqua di stabulazione

Si è valutato che le condizioni chimico fisiche fossero più che soddisfacenti per ospitare una popolazione di 100 esemplari adulti di *P. Clarkii*, i quali avrebbero avuto una densità di 1 esemplare per 10 litri d'acqua o 1 esemplare per 40 cm² considerando che la specie vive a stretto contatto con il fondale e si distacca da esso solo per rari e rapidi spostamenti.

Nella vasca sono state inserite delle tegole in terracotta e dei pezzi di tubo in PVC, utilizzati dagli animali come ricoveri diurni.

3.2 Condizionamento dei riproduttori

Si è deciso di impostare un rapporto numerico maschio femmina 1:2 inserendo di fatto 34 maschi e 66 femmine.

I riproduttori sono stati acquistati da un allevamento estensivo, effettuato in un bacino idrico artificiale di medio-grandi dimensioni (160-190 m³).

Da ricerche bibliografiche si è appreso che:

il fotoperiodo non ha alcuna influenza sull'induzione ormonale nelle femmine e nei giovanili di *P. Clarkii*, mentre ne ha l'esposizione ad una temperatura superiore ai 18 C° ed un PH compreso fra 7 e 8 (Guitierrez-Yurrita, 1997)

Ci è apparso chiaro che la regolazione della temperatura e la possibilità di gestione della stessa da parte nostra era un punto cardine per la riuscita della riproduzione del crostaceo.

Pu essendo la temperatura dell'acqua della nostra vasca 22±2 C° complici le miti temperature di fine estate presenti nel laboratorio dove è stata allestita la vasca di comunità, ci siamo muniti di 2 termoriscaldatori in acciaio inox da 200 watt ciascuno per poter mantenere la temperatura costantemente sopra i 21 C° durante tutto il nostro esperimento.

All'arrivo i crostacei sono stati posti in due contenitori in plastica e separati per sesso.

E' stato effettuato un controllo visivo sulle femmine, ricercando soggetti con uova deposte. Il controllo è risultato negativo su tutte le 66 femmine controllate.

Data le abitudini alimentari della specie è stata programmata una dieta composta da mangime commerciale specifico per gamberi alternata a verdura e pesce fresco.

3.3 Accoppiamento e deposizione

Già dopo pochi giorni dal loro inserimento nella vasca di comunità sono cominciati gli accoppiamenti.

Figura 4



Figura 4: *P. Clarkii* in accoppiamento

Le spermatofore vengono depositate dal maschio in un ricettacolo seminale (annulus ventralis) sull'estremità posteriore del settimo sternite toracico della femmina.

Questa struttura e il suo contenuto vengono persi quando le femmine mutano alla fine della stagione riproduttiva, impedendo così alle spermatofore di essere conservate per anni. (Scalici e Gherardi 2006)

La deposizione è avvenuta circa un mese dopo come riscontrato in bibliografia, alla deposizione delle uova gli spermatozoi vengono rilasciati dalla dissoluzione delle spermatofore dell'annulus ventralis, fecondando le uova esternamente. (Scalici e Gherardi 2006)

Figura 5



Figura 5: Femmina con uova

3.4 Condizionamento in acquari da incubazione

Per evitare episodi di cannibalismo e di predazione delle uova, data l'aggressività mostrata dalla specie nei confronti dei simili in ambienti circoscritti, si è deciso di porre le femmine ovigere singolarmente in acquari di vetro della capacità di quattro litri forniti di filtro biologico.

Il filtro è stato caricato con canalicchi in vetro sinterizzato ad alta porosità, e lana di perlon.

Figura 6



Figura 6: Sistema di acquari utilizzati

Per evitare stressanti cambiamenti dei valori fisico-chimici dell'acqua, per riempire gli acquari è stata utilizzata acqua prelevandola dalla vasca di comunità.

Gli acquari sono inoltre stati dotati ognuno di un rifugio fatto da un pezzo di tubo in PVC.

Qui gli animali sono stati mantenuti ad una temperatura di 23 ± 1 C° somministrando la stessa dieta fornitagli nella vasca di comunità.

Per mantenere buone condizioni della qualità dell'acqua, parziali cambi sono stati effettuati nell'ordine del 25% rispetto al volume totale con cadenza settimanale. A questo si è aggiunta una pulizia del fondo degli avanzi di cibo effettuata ogni giorno.

Le prime schiuse sono state rilevate a circa 30 giorni dalla deposizione delle uova.

Figura 7



Figura 7: Femmina con giovanili

Le giovani larve, avvenuta la schiusa, sono rimaste in stretta dipendenza con la madre per quasi tre mesi, distaccandosi dai pleopodi della stessa solo quando veniva somministrata la razione di cibo giornaliera.

Finito di alimentarsi tornavano ad attaccarsi alla madre che ha costantemente provveduto alla loro ossigenazione tramite il movimento ritmico dei pleopodi.

Durante il periodo di cura sia delle uova che dei giovanili, le madri hanno mostrato un atteggiamento aggressivo verso qualunque oggetto venisse avvicinato durante le operazioni di pulizia o somministrazione del cibo.

Dopo circa tre mesi si è deciso di interrompere il rapporto di dipendenza tra la madre e i giovanili, avendo questi raggiunto una dimensione tale che non gli permetteva più di essere ospitati fra i pleopodi della stessa. Già dopo ventiquattro ore abbiamo osservato l'inizio di episodi di cannibalismo da parte dei soggetti di taglia maggiore nei confronti dei fratelli più piccoli.

Si è deciso allora di separare per taglia in diversi acquari i soggetti, aumentando anche il numero di rifugi per evitare la competizione degli spazi e la razione di cibo è passata da un'unica giornaliera a tre al giorno aumentando di conseguenza anche la dose totale.

Anche questi accorgimenti non hanno evitato gli episodi di cannibalismo.

Si è visto infatti come pur avendo a disposizione cibo in abbondanze che nella maggior parte delle volte avanzava e veniva aspirato durante le operazioni di pulizia del fondo effettuate giornalmente tramite un tubicino in silicone, i soggetti più forti sottomettevano e quindi uccidevano i consimili.

Le azioni di cannibalismo sono cessate solo dopo aver spostato gli animali in numero di 10 unità in una vasca in vetro più grande del volume complessivo di 65 lt.

Qui sono stati mantenuti fino al raggiungimento della taglia $4,5 \pm 0,5$ cm che è corrisposto con la possibilità di differenziarne il sesso.

4. Dati biometrici

4.1 Strumentazione

Rilevamenti biometrici sono stati effettuati in *P. Clarkii* durante tutte le sue fasi vitali.

La strumentazione utilizzati per effettuare le misurazioni è di seguito elencata:

- Stereoscopio Zeiss modello discovery V 20
- Ittiometro al millimetro
- Software per l'elaborazione delle immagini Axio Vision Rel. 4.8

4.2 Uova

Alcune uova sono state prelevate utilizzando forbici e pinzette, prelevando anche l'involucro chitinoso utilizzato dalle femmine per far aderire le stesse ai pleopodi.

A quattro giorni dalla deposizione ci si è accorti che le uova assumevano il caratteristico color petrolio tipico delle uova feconde.

Solo in due esemplari su 15 posti negli acquari alcune uova hanno assunto una colorazione arancio giallastra, sintomo della non vitalità di queste uova.

Le cause della morte degli embrioni sono molteplici e possono essere ricondotte a stress da manipolazione con lesione della membrana esterna delle uova o attacco delle stesse da parte di miceti o batteri.

Le uova in questione sono state asportate dalla madre la quale durante il periodo di maturazione degli embrioni si preoccupa di ossigenare i grappoli costantemente tramite il movimento dei pleopodi, e di tenere il grappolo pulito asportando eventuali embrioni morti che potrebbero essere causa del propagarsi di infezioni batteriche o proliferazioni fungine.

Si è proceduto alla raccolta di queste uova e alla loro osservazione al microscopio ottico.

Figura 8

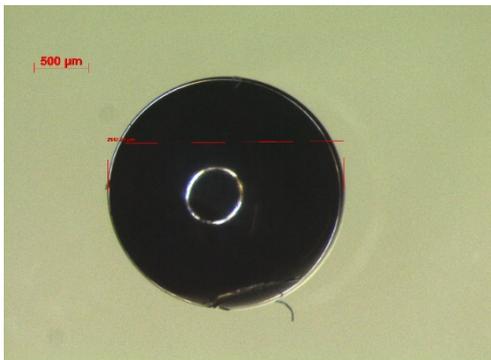


Figura 8: Embrione a 4 giorni dalla deposizione

Figura 9



Figura 9: Embrione non vitale

4.3 Giovanili

Le larve ad un giorno dalla schiusa sono state asportate tramite pinzette e posti in piattelli di vetro contenenti acqua per poter essere osservati e fotografati in vivo.

Le misure sono state effettuate grazie alla funzione presente nel programma Axio vision in dotazione al microscopio Discovery. V20 della Zeiss.

Le misurazioni effettuate sono state la lunghezza totale e la lunghezza del carapace.

Total length: dalla punta del rostro al margine inferiore del telson.

Carapace length: dalla punta del rostro al margine inferiore del cefalotorace. (G. La Porta, G. Pedicello 2006)

Figura 10



Figura 10: Giovanile a un giorno dalla schiusa

Nel momento della separazione dei giovanili dalla madre si è effettuata la misurazione della lunghezza totale utilizzando un Ittiometro in millimetri.

Figura 11



Figura 11: Giovanile a novanta giorni dalla schiusa

BIBLIOGRAFIA

- Hackefors H., 1999 – The positive effects of established crayfish introductions in Europe. *Crustacean issue*, 11:281-292.
- Huner J. V. & Barr J. E., 1984 – *Red Swamp Crayfish: Biology and Exploitation*. Louisiana Sea Grant College Program, Baton Rouge, Louisiana: 136 pp.
- Guitierrez-Yurrita, P. J. & Montes, C. 1997 – El cangrejo americano es una especie clave en la ecología de la marisma dulce del Parque Nacional de Dorróna. *Zones Humides i Mediterranies* . (RED-HUM), 1 (Noviembre): 11-12
- Scalici M. & Gherardi F, 2007. Structure and dynamics of an invasive population of the red swamp crayfish (*Procambarus Clarkii*) in a Mediterranean wetland. *HYDROBIOLOGIA* 583: 309-319 (1.964)
- G. La Porta, G. Pedicillo and M. Lorenzoni, *Biology of Procambarus Clarkii in lake Trasimeno*. Bull. Fr. Peche PISCIC. 380-381:1155-1168