



LA NEWSLETTER RARITY

Eccoci all'ottavo numero della Newsletter RARITY, ricco di informazioni ed aggiornamenti riguardo le attività del progetto RARITY e di curiosità sui gamberi di acqua dolce. Ci auguriamo possano essere di vostro interesse.

Chi volesse ricevere la newsletter regolarmente potrà farne richiesta seguendo la facile procedura disponibile alla pagina www.life-rarity.eu/pagine/newsletter.htm.

IMPORTANTE RISULTATO dell'attività di divulgazione RARITY: il 21 agosto 2013 COMUNI, PRO LOCO E SAGRE DEL GAMBERO DI FIUME HANNO SOTTOSCRITTO UN SIGNIFICATIVO PROTOCOLLO DI INTESA - Le principali sagre del gambero che si svolgono ogni estate in Friuli Venezia Giulia (Amaro, Orcenico, Remanzacco e Saletto di Morsano al Tagliamento), le Pro Loco che le organizzano e le gestiscono e le rispettive amministrazioni comunali, hanno sottoscritto un documento che impegna le Parti citate e lo staff RARITY in azioni di divulgazione dei temi RARITY, di ricerca di sinergie e coordinamento delle iniziative che hanno per oggetto il gambero di fiume e di promozione di attività che ne possano favorire la protezione e la valorizzazione. Punto qualificante del protocollo, inoltre, è che le sagre citate non utilizzeranno quale prodotto edibile nell'ambito delle rispettive manifestazioni specie aliene o aliene invasive commercializzate come prodotto vivo quali il "gambero turco" *Astacus leptodactylus*, gamberi dei generi *Astacus* e *Pacifastacus*, gamberi americani appartenenti ai generi *Procambarus* e *Orconectes* e gamberi australiani del genere *Cherax*. Il protocollo è stato firmato dalle Parti presso la piccola avannotteria ETP per la produzione di giovanili di gambero di fiume nativo (*Austropotamobius pallipes*) ai fini del del ripopolamento, ad Amaro (Udine), località Mulino Rainis.

Questo numero della newsletter RARITY è interamente dedicato alle tecniche di contenimento di *P.clarkii* mediante pratiche che prevedono l'uso di maschi sterili che competono con quelli fertili, e l'utilizzo di esche a base di feromoni che risultano attrattivi per i maschi in fase riproduttiva o di ormoni in grado di interferire con il normale sviluppo riproduttivo.

Elenco dei contenuti

Aquiloni L, Giovannelli F, Inghilesi A. (Università di Firenze, Dipartimento di Biologia Evoluzionistica 'Leo Pardi') – Come controllare le popolazioni invasive di Gambero della Louisiana? Qualche speranza grazie alla tecnica di radiosterilizzazione dei maschi.

Piazza F. (Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste) – Il controllo del gambero invasivo *Procambarus clarkii*; sterilizzazione massiva con somministrazione di alimenti modificati con tecniche molecolari (Alginato +GIH).

Here is the eighth number of the RARITY Newsletter, full with information and updates about the activities of RARITYproject and curiosity about the cray fishes. We hope it may be of interest.

Anyone wishing to receive the quarterly newsletter may follow the easy steps procedure available at the address: www.life-rarity.eu/pagine/newsletter.htm.

IMPORTANT RESULT of RARITY dissemination activity: MUNICIPALITIES, "PRO LOCO" AND "SAGRE DEL GAMBERO DI FIUME" (CRAYFISH FESTIVALS) HAVE SUBSCRIBED A SIGNIFICANT AGREEMENT - The main crayfish festivals which take place on summers in Friuli Venezia Giulia (Amaro, Orcenico, Remanzacco and Saletto di Morsano al Tagliamento), the "Pro Loco" which organize and manage these festivals, and their respective municipalities, have subscribed a document which commits the above mentioned subjects and the RARITY staff to promote and carry out actions for the dissemination of the RARITY issues, will search for synergies and coordination of initiatives dealing with the freshwater crayfish and the protection of the native species *Austropotamobius pallipes*. Furthermore, all festivals will not use as edible products within their feasts alien or invasive alien species traded as live product such as the "Turkish crayfish" *Astacus leptodactylus*, crayfish of the genera *Astacus* and *Pacifastacus*, American crayfish of the genera *Procambarus* and *Orconectes* and Australian crayfish of the genus *Cherax*. The agreement will be signed by the involved subjects at the small ETP hatchery for the production of *A. pallipes* juveniles (for restocking purposes) in Amaro (Udine), locality Mulino Rainis.

The eighth issue of the newsletter is dedicated to the techniques of containment of *P.clarkii* through practices involving the use of sterile males which compete with those fertile, and the use of pheromone-based lures that are attractive for males in reproductive phase or hormones that interfere with their normal reproductive development.

List of contents

Aquiloni L, Giovannelli F, Inghilesi A. (Department of Evolutionary Biology 'Leo Pardi', University of Florence) – How to control the invasive populations of the red swamp crayfish? Some hopes thanks to the technique of x-ray sterilization of males.

Piazza F. (Department of Life Sciences, University of Trieste) – Control of the invasive crayfish *Procambarus clarkii*: mass sterilisation through oral delivery of molecularly modified food (Alginate+GIH).



COME CONTROLLARE LE POPOLAZIONI INVASIVE DI GAMBERO DELLA LOUISIANA? QUALCHE SPERANZA GRAZIE ALLA TECNICA DI RADIO-STERILIZZAZIONE DEI MASCHI

Il gambero rosso della Louisiana, *Procambarus clarkii*, è un esempio paradigmatico di specie invasiva presente ormai in molti corpi idrici europei. Una lunga lista di Autori ha dimostrato la capacità invasiva di questa specie (Gherardi, 2006) e numerosi studi ne hanno quantificato l'impatto a vari livelli (Gherardi, 2007). In presenza di popolazioni stabili di *P. clarkii*, gli interventi di controllo/eradicazione rappresentano una priorità ambientale (Holdich et al., 1999), ma ogni tentativo di gestione è risultato essere un "flop". Per la precisione, nell'ultimo decennio nessuno degli svariati tentativi di contenere la diffusione di questa e di altre specie invasive di gambero (attraverso: rimozione manuale, Peay & Hiley, 2001; trappolaggio, Frutiger et al., 1999; pesci predatori, Blake & Hart, 1995; feromoni sessuali, Stebbing et al., 2003; e pesticidi naturali, Peay et al., 2006) è stato decisivo. Solo l'adozione di un approccio integrato (ovvero la combinazione di trappolaggio e pesci predatori) contro *Orconectes rusticus* nella regione dei Grandi Laghi sembra aver raggiunto qualche risultato (Hein et al., 2007). In ogni caso, è chiara la necessità di nuove, innovative e più efficaci tecniche per la gestione dei gamberi invasivi.



Figura 1. Acceleratore lineare e modalità di mantenimento dei gamberi durante l'irraggiamento presso il Dipartimento di Fisiopatologia clinica dell'Università di Firenze dove gli animali erano singolarmente intubati in cilindri di acetato (sopra) e presso il reparto di Radioterapia dell'Ospedale di Reggio Emilia dove gli animali erano invece tenuti ad elevate densità in vasche con acqua coperte da plexiglas (a destra).

La tecnica di sterilizzazione dei maschi e rilascio (SMRT, dall'inglese *Sterile Male Release Technique*) si basa sulla sterilizzazione, mediante raggi X, e il rilascio in natura di un elevato numero di maschi in grado di accoppiarsi con le femmine selvatiche che, conseguentemente, deporranno uova non fecondate. Questa tecnica è altamente specie-specifica e non causa alcuna contaminazione ambientale o impatto, diversamente dall'uso di biocidi o altri prodotti chimici. Inoltre, dato che gli individui sterili cercano attivamente un partner per accoppiarsi, questa tecnica offre l'ulteriore vantaggio di assicurare un controllo efficace anche a basse

densità (es. durante i primi stadi di colonizzazione delle popolazioni invasive), quando altri metodi tradizionali densità-dipendenti falliscono (es. l'efficacia del trappolaggio è molto bassa in piccole popolazioni). Fino a pochi anni fa, le informazioni riguardanti l'uso di radiazioni ionizzanti per la sterilizzazione di decapodi erano molto scarse e provenivano da studi volti a prevenire accoppiamenti non autorizzati (su femmine di *Palaemonetes pugio*, Rees, 1962; su giovani di *Macrobrachium rosenbergii*, Lee, 2000; e su maschi di *Penaeus japonicus*, Sellars & Preston, 2005). Comunque questa tecnica aveva avuto successo nel controllo di insetti dannosi (es. Knippling, 1960; Curtis, 1985) e poteva essere potenzialmente applicabile, con le opportune modifiche, anche nel caso di gamberi invasivi.

Da diversi anni, le potenzialità di questa tecnica per la gestione di gamberi invasivi vengono investigate dal nostro gruppo di ricerca con risultati incoraggianti (Aquiloni et al., 2009; Cecchinelli et al., 2010). Abbiamo scoperto che *P. clarkii* diventa parzialmente sterile utilizzando elevate dosi di radiazioni ionizzanti. Per far questo, ci serviamo di un acceleratore lineare per impiego clinico, riutilizzando un generatore di fascio elettronico già utilizzato per la terapia nell'uomo, altrimenti smaltito. È importante notare che i trattamenti vengono effettuati solo quando la strumentazione per la radioterapia non è necessaria a scopi umani, motivo per cui questa fase può avere una durata variabile. Diversamente dalla castrazione chimica, l'uso di raggi X per ottenere animali sterili rispetta tutti i requisiti per la sicurezza ambientale e la salute umana indicati in letteratura (Holdich et al., 1999). Gli individui trattati non sono radioattivi, perciò possono essere maneggiati (o anche mangiati) in tutta sicurezza o possono essere rilasciati in natura senza alcun pericolo per



l'ambiente. Nel corso di questi anni, abbiamo dimostrato che la sterilizzazione non altera né la sopravvivenza né il comportamento riproduttivo dei maschi di *P. clarkii*, ma abbatte sensibilmente il loro successo riproduttivo riducendo del 43% circa il numero di nati (Aquiloni et al., 2009). Questa riduzione, insieme alla naturale elevata mortalità dei piccoli in questa specie, contribuisce al controllo della densità di popolazione. Abbiamo anche ottimizzato le procedure di sterilizzazione in modo da consentire il trattamento di più individui insieme, con il conseguente contenimento di costi e tempo. Per lo stesso motivo, lo sforzo della sterilizzazione deve essere ristretto ai soli maschi di grandi dimensioni (= i dominanti). Infatti, attraverso osservazioni sul comportamento riproduttivo di questa specie, abbiamo dimostrato che le femmine di *P. clarkii* scelgono preferenzialmente questi maschi (Aquiloni & Gherardi, 2008; Aquiloni et al., 2008) in un sistema di accoppiamento poliginico, con pochi maschi dominanti che monopolizzano la

maggior parte delle femmine (Gherardi, 2002). Quindi, il successo della SMRT aumenta sterilizzando i maschi dominanti. Inoltre, come recentemente dimostrato in un lavoro sul campo (Cecchinelli et al., 2010), la dimensione della popolazione diminuisce nelle successive stagioni riproduttive attraverso l'applicazione del trappolaggio e della SMRT. Un approccio integrato con queste due tecniche combinate è infatti da preferire per il suo effetto sinergico: il trappolaggio determina una immediata riduzione della popolazione e, nello stesso tempo, aumenta la probabilità dei maschi sterili di accoppiarsi con le poche femmine rimaste. Studi di laboratorio hanno anche dimostrato che i danni ai testicoli e ai tessuti gonadici dovuti al trattamento permangono per almeno un anno (Aquiloni et al., 2009), compromettendo quindi con buona probabilità anche la successiva stagione riproduttiva.

Nonostante siano necessari monitoraggi a lungo termine (almeno di 5 anni) per verificare l'assenza di processi compensatori densità dipendenti (ovvero, un aumento della crescita o della capacità riproduttiva degli individui a basse densità di popolazione, Rose et al., 2001), processi che potrebbero ovviamente controbilanciare la riduzione del numero di nascite ottenuta con la SMRT (Jones et al., 2003), le scoperte di questi ultimi anni suggeriscono che il rilascio di un sufficiente numero di maschi sterili può effettivamente ridurre la dimensione della popolazione invasiva e che l'effetto della loro sterilità può rimanere per più di una stagione riproduttiva (Aquiloni et al., 2009). La modellazione matematica contribuirà a stabilire un appropriato numero di maschi sterili da rilasciare in relazione al contesto di applicazione e alla densità di popolazione iniziale, ma questa tecnica innovativa è pronta per essere applicata alla gestione delle popolazioni del gambero invasivo.

Laura Aquiloni*, Francesca Giovannelli & Alberto F. Inghilesi

Department of Evolutionary Biology 'Leo Pardi'
University of Florence
*e-mail: laura.aquiloni@unifi.it

HOW TO CONTROL THE INVASIVE POPULATIONS OF THE RED SWAMP CRAYFISH? SOME HOPES THANKS TO THE TECHNIQUE OF X-RAY STERILIZATION OF MALES

The red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, is a paradigmatic invader of many European water bodies. A long list of Authors has demonstrated the invasiveness of this species (Gherardi, 2006) and several studies have quantified its multilevel impact (Gherardi, 2007). After the establishment of *P. clarkii* populations, their control/eradication is felt as an environmental priority (Holdich et al., 1999), but any attempt to manage them has resulted to be a flop.

To be precise, none of the several attempts made to contain the spread of this and other invasive crayfish in the last decade (by: manual removal, Peay & Hiley, 2001; trapping, Frutiger et al., 1999; fish predators, Blake & Hart, 1995; sexual pheromones, Stebbing et al., 2003; and natural pesticides, Peay et al., 2006) has been definitive. Only the adoption of a multiple approach (i.e. the combination of trapping and bio-control with fish predators) against *Orconectes rusticus* in the Great Lakes seemed to achieve some results (Hein et al., 2007). In any case, it is clear the need of new, innovative and more efficacious techniques for managing invasive crayfish.

The Sterile Male Release Technique (SMRT) is based on sterilizing by X-ray radiations and releasing large numbers of males to mate wild females, who will then produce non-fertilized eggs. This technique is highly species-specific and causes no environmental contamination or non-target impacts, differently from the use of biocides or other chemicals. Moreover, since sterile specimens actively seek a mate, this technique offers the additional advantage to assure an efficacious control also at low density (e.g. early stages of colonization of invasive populations), when other traditional density-dependent techniques fail (e.g. the trap ability is very low in small populations). Since few years ago, the information about the use of

ionizing irradiation to sterilize decapods was scanty and came from studies aimed to prevent unlicensed breeding (on *Palaemonetes pugio* females, Rees, 1962; on *Macrobrachium rosenbergii* juveniles, Lee, 2000; and *Penaeus japonicus* males, Sellars & Preston, 2005). However, this technique has been successful in the control of insect pests (e.g. Knippling, 1960; Curtis, 1985) and it could be potentially applicable, with appropriate adaptations, also in the case of invasive crayfish.



Figure 1. Linear accelerator and maintenance of the crayfish during the irradiation at the Department of Clinical Physiopathology of the Florence University, where the animals were individually intubated in cylinders of acetate (above) and at the Department of Oncology in the Reggio Emilia Hospital, where the animals were maintained with water at high densities in tanks covered with Plexiglas (below).



Since several years, the potential of this technique for the management of invasive crayfish has been investigated by our research group with encouraging results (Aquiloni et al., 2009; Cecchinelli et al., 2010). We found that *P. clarkii* becomes partially sterile using a high dose of ionizing irradiation. To do this, we serve

of a clinical linear accelerator re-utilizing the electron beam generator already used for human therapy, otherwise disposed (Fig. 1). It is important to note that the treatments are carried out only when the radiotherapy equipment is not necessary for human purposes, so this phase could have a variable duration. Unlike chemical sterilization, the use of X-rays meets all the environmental safety and human health requirements as listed in the literature (Holdich et al., 1999). The treated individuals are not radioactive, so they can be handled (or even eaten) in complete security or they can be released in nature without any danger for the environment. During these years, we have showed that the sterilization does not alter either the survival or the mating ability of *P. clarkii* males, but affected their reproductive success by reducing by about 43% the number of hatchlings (Aquiloni et al., 2009). This reduction, together with the natural mortality of *P. clarkii* new-borns, contributes to control the density of population. We also improved the sterilization procedures in order to treat many individuals together, with a containment of costs and time. For the same purpose, the sterilization effort could be restricted only at larger (=dominant) males. In fact, through ethological observations, we demonstrated that *P. clarkii* females preferentially select these males (Aquiloni & Gherardi, 2008; Aquiloni et al., 2008) in a polygynous mating system, with few dominant males that monopolize most matings (Gherardi, 2002). So, the success of the SMRT is higher when the dominant males are sterile. Moreover, as recently demonstrated in a field study (Cecchinelli et al., 2010), the population size decreases in the subsequent reproductive season by the combination of trapping and release of sterile males. A multiple approach with trapping and SMRT in combination has to be preferred for its synergistic effect: the trapping immediately reduces the population size and, at the same time, increases the probability of sterile males to mate with the few remaining females. Laboratory studies have also shown that the damages we recorded in the testes and in their tissue due to the treatment lasted for at least one year (Aquiloni et al., 2009), likely affecting the subsequent reproductive season.

Although long-term field monitoring (at least 5 years) are necessary to verify the absence of compensatory density-dependent processes (i.e. an augmented growth or reproduction of the survived individuals at low density, Rose et al., 2001) that might obviously offset the reduced number of offspring obtained by SMRT (Jones et al., 2003), the findings of these last years suggest that the release of a sufficient number of irradiated males can actually decrease the size of the invasive population and that their reduced fertility might persist for more than one reproductive season (Aquiloni et al., 2009). The mathematical modelling will contribute to establish the appropriate number of sterile males to release in relation to the context of application and to the initial population density, but this innovative technique is ready to be applied for managing invasive *P. clarkii* populations.

Bibliografia/References

Aquiloni L. & Gherardi F. (2008) Mutual mate choice in crayfish: large body size is selected by both sexes, virginity by males only. *Journal of Zoology*, 274, 171–179.

Aquiloni L., Becciolini A., Trunfio C., Berti R. & Gherardi F. (2009). Managing invasive crayfish: use of X-ray sterilization of males. *Freshwater Biology*, 54: 10510-1519.

Aquiloni L., Buřič M. & Gherardi F. (2008) Crayfish females eavesdrop on fighting males before choosing the dominant mate. *Current Biology*, 18, 462–463.

Blake M.A. & Hart P.J.B. (1995) The vulnerability of juvenile signal crayfish to perch and eel predation. *Freshwater Biology*, 33, 233–244.

Cecchinelli E., Aquiloni L., Orioli G., Gherardi F. (2010). L'uso della SMRT (Sterile Male Release Technique) e di Pyblast per il controllo del gambero invasivo *Procambarus clarkii* nel Consorzio della Bonifica Parmigiana Moglia-Secchia, Consorzio di Bonifica Parmigiana-Moglia-Secchia (Reggio Emilia).

Curtis C.F. (1985) Genetic control of insect pests: growth industry or lead balloon? *Biological Journal of the Linnean Society*, 26, 359–374.

Frutiger A., Borner S., Büsser T., Eggen R., Müller R., Müller S. & Wasmer H.R. (1999) How to control unwanted populations of *Procambarus clarkii* in Central Europe? *Freshwater Crayfish*, 12, 714–726.

Gherardi F. (2002) Behaviour. In: *Biology of freshwater crayfish* (Ed. D.M. Holdich), pp. 258–290. Blackwell Science, Cambridge.

Gherardi F. (2006) Crayfish invading Europe: the case study of *Procambarus clarkii*. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, 39, 175–191.

Gherardi F. (2007) Understanding the impact of invasive crayfish. In: *Biological invaders in inland waters: profiles, distribution, and threats* (Ed. F. Gherardi), pp. 507-542. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Hein C.L., Vander Zanden M.J. & Magnuson J.J. (2007) Intensive trapping and increased fish predation cause massive population decline of an invasive crayfish. *Freshwater Biology*, 56, 1134–1146.

Holdich D.M., Gydemo R. & Rogers W.D. (1999) A review of possible methods for controlling nuisance populations of alien crayfish. In: *Crayfish in Europe as alien species. How to make the best of a bad situation?* (Eds F. Gherardi & D.M. Holdich), pp. 245–270. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.

Jones M.L., Bergstedt R.A., Twohey M.B., Fodale M.F., Cuddy D.W. & Slade J.W. (2003) Compensatory mechanisms in Great Lakes sea lamprey populations: implications for alternative control strategies. *Journal of Great Lakes Research*, 29, 13–129.

Knipling E.F. (1960) Eradication of screw-worm fly. *Scientific American*, 203, 54–61.

Lee N. (2000) Effects of cobalt-60 gamma irradiation on the Malaysian prawn *Macrobrachium rosenbergii*. PhD Thesis, Louisiana State University, USA.

Peay S. & Hiley P.D. (2001) Eradication of Alien Crayfish. Phase II. Environment Agency Technical Report W1-037/TR1, Environment Agency, Bristol, U.K.

Peay S., Hiley P.D., Collen P. & Martin I. (2006) Biocide treatment of ponds in Scotland to eradicate signal crayfish. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 380-381, 1363–1379.

Rees G.H. (1962) Effects of gamma radiation on two decapod crustaceans, *Palaemonetes pugio* and *Uca pugnax*. *Chesapeake Science*, 3, 29–34.

Rose K.A., Cowan Jr. J.H., Winemiller K.O., Myers R.A. & Hilborn R. (2001) Compensatory density dependence in fish populations: Importance, controversy, understanding and prognosis. *Fish & Fisheries*, 2, 293–327.

Sellers M.J. & Preston N.P. (2005) Sexual sterilisation of harvest-size *Penaeus japonicus* (Bate) using ionising irradiation. *Aquaculture Research*, 36, 1144–1147.

Stebbing P.D., Watson G.J., Bentley M.G., Fraser D., Jennings R., Rushton S.P. & Sibley P.J. (2003) Reducing the threat: the potential use of pheromones to control invasive signal crayfish. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 370-371, 219–224.

Federica Piazza

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste
e-mail: fedang83@alice.it

**IL CONTROLLO DEL GAMBERO INVASIVO
PROCAMBARUS CLARKII; STERILIZZAZIONE MASSIVA
CON SOMMINISTRAZIONE DI ALIMENTI MODIFICATI
CON TECNICHE MOLECOLARI (ALGINATO+GIH).**

Il gambero d'acqua dolce *Procambarus clarkii*, originario del sud degli Stati Uniti, ma ormai diffuso in tutta Europa, è considerato una specie aliena altamente invasiva e dannosa. Con questo progetto si intendono sviluppare nuove metodologie per eradicarlo. Tra quelle che stiamo attualmente testando c'è l'utilizzo dell'**ormone gonado inibitorio (GIH)** che dovrebbe permettere di rendere sterili gli individui di questa specie. Il GIH è un neuropeptide prodotto dal complesso *organo X - ghiandola del seno*, localizzato nei peduncoli oculari del crostaceo. Questo ormone appartiene alla famiglia dell'ormone iperglicemico (CHH) che è suddiviso in due sottoclassi quella del CHH in senso stretto e quella dove ci sono il GIH, il MIH e il MOIH. La funzione principale del GIH è quella di inibire la vitellogenesi nelle femmine e lo sviluppo dei testicoli nei maschi, fattori fondamentali per il controllo della specie. Uno degli obiettivi dello studio è proprio la sintesi della molecola GIH, che sarà in seguito inserita in nanoparticelle, e quindi introdotta nell'alimentazione degli esemplari investigati. In seguito si valuterà l'assorbimento al fine della sterilizzazione degli individui.

Come veicolo per la somministrazione dell'ormone attraverso il cibo si è pensato di utilizzare l'alginate, sostanza comunemente usata nell'industria alimentare come addensante, emulsionante e stabilizzante, in quanto non è tossico ed è biodegradabile quando somministrato per via orale. Il prodotto è inoltre molto utilizzato nella cosiddetta "cucina molecolare", ad esempio per creare il caviale finto (Fig. 1).



Fig. 1 cucina molecolare: capsule di finto caviale arancione

Gli alginati sono polisaccaridi estratti dalle alghe marine brune (es. *Laminaria hyperborea* e *Ascophyllum nodosum*) che si trovano nelle acque poco profonde di zone temperate. Nelle varie specie di alghe, la sostanza è presente sotto forma di sali di calcio, magnesio e sodio, e costituisce più del 40% del peso secco dell'alga. Abbiamo deciso di utilizzare l'alginate per la sua particolare proprietà di gelificare (Smidsrød e Skjak-Braek, 1990) in presenza di cloruro (sale) di calcio, per cui se è "gocciolato" da una siringa tende a formare delle strutture sferiche. Queste capsule hanno una consistenza sufficiente per consentire di includervi qualsiasi molecola (Marsich et al., 2008); il nostro obiettivo è di inserire il GIH nelle sferule, che assunte da *P. clarkii* ne dovrebbero consentire la sterilizzazione. Attualmente, infatti, il nostro laboratorio sta testando questo sistema di incapsulazione per generare del cibo per i crostacei contenente l'ormone (Rajeshkumar et al. 2009; Romalde et al., 2004). Per rendere il prodotto appetibile per i gamberi, esso va mescolato con una sostanza-esca. Abbiamo eseguito dei test con mangimi omogeneizzati e con il fegato di bue, osservando che le sfere vengono mangiate in entrambi i casi. In seguito abbiamo scelto di utilizzare soltanto il mangime omogeneizzato, in quanto è un prodotto commerciale di facile reperibilità, ed inoltre è stato osservato che facilita l'affondamento delle capsule nell'acqua (Fig. 2).



Fig. 2 cucina molecolare: capsule di finto caviale arancione

Alla soluzione di alginato e mangime abbiamo incluso, per ora, l'insulina e l'ormone iperglicemico, CHH, che ci permetteranno di verificare la funzionalità del sistema. Le prime prove sono state fatte incapsulando soltanto l'insulina, in quanto è meno costosa del CHH, ma gli è molto simile per peso e punto isoelettrico. I test sono stati eseguiti a diversi pH (5-7-8) per vedere se questo fattore può influire sull'efficienza dell'alginate come sistema di incapsulamento (Coccia et al. 2011). Dalle successive analisi è risultata un'efficienza di incapsulazione del 60% e un loading (quantità di insulina nella formulazione) dello 0,072% per capsula, considerata sufficiente. Questi dati quindi ci forniscono una conferma della funzionalità del sistema. Le soluzioni di alginato e molecole sono poi inserite in un particolare strumento (Fig. 3)



Fig. 3 Generatore elettronico di perline.

che, con un ago di 0,9 mm, ci consente di creare delle micro sfere. Queste sono a loro volta incluse in una nuova matrice di alginato e mangime che crea una seconda capsula, per aumentare la protezione dell'ormone. Così strutturato, l'alginate può attraversare lo stomaco, mantenendo al suo interno le molecole, per poi sciogliersi nell'intestino, rilasciando le sostanze inglobate.

Una volta formate le capsule contenenti l'ormone, si passa alla successiva fase della sperimentazione, cioè alla verifica del reale assorbimento negli esemplari di laboratorio. Quattro o cinque capsule per crostaceo sono quindi somministrate a diversi esemplari di *P. clarkii*, mantenendo ogni gambero isolato in una vaschetta. Attratti dalla sostanza-esca, in breve tempo i gamberi si nutrono, e dopo poco possiamo iniziare i prelievi di una piccola quantità di emolinfa. I prelievi ci permettono di verificare se l'insulina o il CHH sono stati effettivamente assorbiti dai gamberi. I crostacei non producono l'insulina, quindi per questa sostanza sono sufficienti dei semplici test di presenza/assenza. Per il CHH, invece, si misurano i valori di glicemia, in quanto l'ormone iperglicemico tende ad alzarla. A causa del lento assorbimento dell'ormone, questo prelievo continua ad ogni ora per 12 ore.

Il gruppo dei gamberi di studio è confrontato con due gruppi di controllo: ad uno stesso numero di esemplari, rispetto a quelli trattati con l'ormone, si somministra cibo non trattato, come "controllo negativo". Per ottenere dei "controlli positivi", invece, l'ormone è direttamente iniettato, di norma ad un numero inferiore di esemplari, garantendo un completo assorbimento. L'analisi di quest'ultimo gruppo ci consente di verificare che il nostro ormone sia effettivamente presente nella soluzione di partenza. Una volta ottenuti i dati di riferimento, essi ci permettono di valutare, nel gruppo cui è stato somministrato l'ormone attraverso il cibo, l'eventuale perdita di concentrazione prima che il CHH raggiunga l'intestino. In caso di assorbimento troppo basso è sufficiente aumentare la concentrazione di partenza, fino ad ottenere un risultato ottimale. Una volta messo a punto il sistema e raccolti infine tutti i dati, si può passare ad inserire nella capsule di alginato il GIH, che ci porta al risultato di rendere sterili gli esemplari. Lo sviluppo di questo nuovo metodo consentirà di abbassare notevolmente i costi per la lotta a questa specie invasiva, che attualmente sono altissimi, e di ridurre drasticamente il numero degli esemplari di *P. clarkii* presenti in Friuli Venezia-Giulia.

Federica Piazza

Department of Life Sciences, University of Trieste
e-mail: fedang83@alice.it

CONTROL OF THE INVASIVE CRAYFISH *PROCAMBARUS CLARKII*: MASS STERILISATION THROUGH ORAL DELIVERY OF MOLECULARLY MODIFIED FOOD (ALGINATE+GIH).

The red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, native to the Southern United States and now present in the whole Europe, represents a highly invasive and dangerous alien species, which this project aims at eradicating through the development of a new methodology. Among the systems under investigation, this study focuses on the application of the gonad-inhibiting hormone (GIH), which is deemed able to sterilise crayfishes. The GIH is a neuropeptide released by the X-organ/sinus gland complex, situated in the optic ganglia of crustaceans. This hormone belongs to the hyperglycaemic hormone family, which includes two sub-groups: one comprising CHHs, in strict meaning, and the other with GIHs, MIHs and MOIHs. GIH's main role is inhibiting vitellogenesis in females and gonad maturation in males, proving fundamental in the control of species. Therefore, in order to perform the sterilisation process, this study concentrates on the synthesization of the GIH molecule; in this way, GIH can be inserted in nanoparticles, added to the diet of the crustaceans, and its absorption can be monitored properly.

Alginate was selected as carrier for the oral delivery of hormones through food. Alginate is a substance generally used in the food industry as thickener, emulsifier and stabiliser for it is not toxic and is biodegradable if administered orally; moreover, it is used in the so-called "molecular cuisine", for instance to create caviar-like spheres (Fig. 1). Alginate is a polysaccharide extracted from brown seaweeds (e.g., *Laminaria hyperborea* and *Ascophyllum nodosum*) which live in the shallow waters of temperate areas. In all seaweeds of this species, alginate occurs as a mix of calcium, magnesium and sodium salts, accounting for over 40% of their dried weight. Alginate was chosen for its specific gelation property (Smidsrod and Skjak-Braek, 1990) in calcium salt solutions: when alginate is expelled drop by drop from a syringe, it instantly spherifies into beads, whose consistence is such that allows encapsulating every kind of molecule (Marsich *et al.*, 2008). Our laboratory is in fact searching for a method to encapsulate the GIH into the alginate beads and create feed spheres (Rajeshkumar *et al.* 2009; Romalde *et al.*, 2004), which can be delivered orally to *P. clarkii* and thus lead to their sterilisation. In order to make this compound attractive for crayfishes, it requires to be mixed with a bait-substance. After testing the use of homogenised feed and bovine liver and observing that both were eaten by crayfishes, homogenised feed was chosen because it is very common, easy to source, and facilitates capsules to sink into water (Fig. 2).



Fig. 1 Molecular cuisine: orange caviar-like spheres.



Fig. 2 Our capsules: alginate, feed, hormone.

Up to now, the alginate-feed solution has been mixed with insulin and CHH, which allow to assess the functionality of the system under investigation. The first tests were run encapsulating insulin, as it is less expensive than CHH but very similar in terms of weight and isoelectric point. Tests were executed at different pHs (5, 7, 8) in order to verify if the pH factor influences the efficiency of alginate as encapsulator (Coccia *et al.* 2011): analysis showed an efficiency of 60% and a loading (amount of insulin in the formulation) of 0.072% per capsule, which proved sufficient. These data therefore confirmed the system functionality. Subsequently, the alginate-molecule solution is inserted in a specific machine (Fig. 3) which creates microspheres using a needle of 0.9 mm. These microcapsules are encapsulated in another alginate-feed matrix which generates a second capsule, aimed at increasing the hormone protection. Owing to this structure, alginate beads can travel through the stomach retaining the molecules and reach the intestine, where they melt and finally release all substances contained.



Fig. 3 Electronic beads generator.

After creating the hormone capsules, the effective hormone absorption in the crustaceans under investigation is measured: each *P. clarkii* is administered four, five beads and isolated in a box. Crayfishes are attracted by the bait-substance and eat the beads in a short time; afterwards, small quantities of haemolymph are sampled. This procedure enables to assess if insulin or CHH have been absorbed by crayfishes. As crustaceans do not produce insulin, few basic tests are necessary to verify its presence/absence. On the other hand, as CHH tends to increase glycaemia, its presence is verified measuring glycaemic activity. However, due to the slow absorption rate of this hormone, sampling is performed every hour, for 12 hours. The group of analysed crayfishes is then compared to two control groups: a "negative control group", which presents the same number of animals as the group treated with hormones and is administered with untreated feed, and a "positive control group", generally with a smaller number of animals, in which the hormone is directly injected, ensuring its complete absorption. The analysis of the second group allows to assess if the hormone is effectively present in the starting solution. The data thus obtained provide for a basis to analyse the group in which hormones has been delivered through food, and measure the possible concentration loss occurring before CHH reaches the intestine. In the event the absorption level is too low, an increase in the starting concentration is required to achieve an adequate result. When the system is defined and all necessary data gathered, GIH is inserted into the alginate capsules, in order to sterilise crayfishes. The development of this new methodology will lead to a significant reduction in the costs incurred to eradicate this invasive species — which are currently very high — as well as a significant decrease in the number of *P. clarkii* in the region of Friuli Venezia-Giulia.

Bibliografia/References

Coccia E. *et al.*, 2011. Digestive enzymes in the crayfish *Cherax albidus*: polymorphism and partial characterization. *International Journal of Zoology*, vol. 2011, article ID 310371.

Marsich E. *et al.*, 2008. Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: A bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation. *Journal of Biomedical Material Research Part A*, 84, 364–376.

Rajeshkumar S. *et al.*, 2009. Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish & Shellfish Immunology*, vol. 26 pp. 429-437.

Romalde J.L., 2004. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture* 2004, 236, 119-129

Smidsrød O. e Skjak-Braek G.,1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, 8, 71–78.

1, 22 e tutto settembre 2013 RARITY AL CENTRO DIDATTICO NATURALISTICO DI BASOVIZZA (TRIESTE)

RARITY sarà ospite per quasi tutto il mese di settembre 2013 (dal 1° al 25 del mese) del [CDN](#) di Basovizza con acquari col gambero nativo e con quello rosso della Louisiana, materiali informativi e in alcuni momenti con il proprio staff. L'Ente Tutela Pesca del FVG (lead partner di progetto) illustrerà e renderà visibili al pubblico e alle scuole i mezzi utilizzati nello svolgimento di attività sul campo quali la messa a secco di canali e corsi d'acqua ai fini della manutenzione, il rilascio di giovanili di pesci e di gamberi di fiume per la pesca e il ripopolamento, il monitoraggio e la pesca svolti in ambito RARITY. Mezzi ed acquari saranno visibili tutti i giorni dalle 10:00 alle 18:00. In particolare, domenica 1 settembre e domenica 23 settembre tra le 10:00 e le 18:00 (*in orari ancora da definire nel dettaglio*) verranno presentati al pubblico il progetto, le attività RARITY e il film "Alieni tra noi". In queste due occasioni il Dott. Tiziano Scovacricchi (CNR-ISMAR) introdurrà il pubblico ai temi RARITY con una presentazione e la visione del film ai quali seguiranno domande e discussione. Info: CDN, tel. 040.376.3677. e-mail cdn@regione.fvg.it

8 settembre 2013 RARITY ALLA 93ma MANIFESTAZIONE ORNITOLOGICA E AVICUNICOLA DI TRICESIMO (UDINE)

RARITY sarà presente con acquari col gambero nativo e con quello rosso della Louisiana, materiali informativi e il proprio staff.

22 settembre 2013



27 settembre 2013 RARITY AL NEAR (NOTTE DEI RICERCATORI) DI TRIESTE

La notte dei ricercatori - [NEAR](#) (North East Researcher's Night) - consiste in una serie di iniziative che si svolgono a **Padova, Trieste, Udine, Venezia e Verona il 27.IX.2013**. E' promossa dalla CE al fine di far incontrare i ricercatori con il grande pubblico in differenti città europee il 4° venerdì di settembre. Si tratta di un'occasione straordinaria per avvicinare, in modo divertente, il pubblico di ogni età al mondo della ricerca, per aprire uno **spazio di incontro e di dialogo** e per sensibilizzare i giovani alle opportunità offerte da una carriera nel mondo della scienza. I cittadini possono visitare strutture di ricerca solitamente chiuse al pubblico, utilizzare tecnologie avanzate sotto la guida dei ricercatori, partecipare ad esperimenti, concorsi, dimostrazioni e simulazioni e fare festa con i ricercatori. RARITY sarà presente con acquari (col gambero nativo e quello rosso della Louisiana), materiali informativi e il proprio staff. *Approfondimenti a breve su*

http://www.life-rarity.eu/pagine/eventi_news_2013.htm



28-29 settembre 2013 **RARITY AL NEXT (SALONE EUROPEO DELL'INNOVAZIONE E DELLA RICERCA SCIENTIFICA) DI TRIESTE**

RARITY sarà presente in Piazza Unità a Trieste con acquari (col gambero nativo e con quello rosso della Louisiana), materiali informativi e il proprio staff. Leggi la [presentazione](#) dell'evento.



23 e 30 settembre 2013 **RARITY ALL'ISTITUTO TECNICO AGRARIO DI SPILIMBERGO**

Grazie all'interessamento di Paola Zanutel ([Acquario ETP](#) di Ariis) e alla collaborazione della Prof.ssa Angela Sameda, RARITY e [ITAG](#) (Istituto Tecnico Agrario) di Spilimbergo (Pordenone) lavoreranno insieme. Sono infatti previsti due incontri pomeridiani (laboratori, lezioni, proiezione del film RARITY) presso la scuola. In seguito, uno studente ITAG avrà modo di frequentare uno stage di 40 ore presso un impianto ETP per la produzione di giovanili di *Austroptamobius pallipes*, finalizzato all'approfondimento teorico e applicativo dei temi di progetto.

4 ottobre 2013 **ALIENI TRA NOI AL CENTRO VISITE "LA SORGENTE" DI SAVOGNA (UDINE)**

Grazie alla collaborazione con Alessia Elia, RARITY presenta al centro-visite [La Sorgente](#) di Savogna (Udine), nel cuore delle Valli del Natisone, il film "Alieni tra noi". Nel corso della serata si parlerà di specie aliene, invasioni biologiche e biodiversità. I temi e il film RARITY saranno presentati da Tiziano Scovacicchi (CNR-ISMAR) e al termine della proiezione è previsto uno spazio per domande e discussione. Informazioni: Alessia Elia, referente per il centro-visite [La Sorgente](#), e-mail cvsavogna@lasorgentecoop.it, cellulare (+39) 335.108.5127.

11 ottobre 2013 **RARITY ALLA VECCHIA PESCHERIA DI MARANO LAGUNARE (UDINE)**

Grazie alla collaborazione con Daniela Fabrici e Giuseppe Milocco ([Protezione Civile del Friuli Venezia Giulia](#)), RARITY presenta alla Vecchia Pescheria di Marano L. il film "Alieni tra noi". Nel corso della serata si parlerà di specie aliene, invasioni biologiche e biodiversità. I temi e il film RARITY saranno presentati da Tiziano Scovacicchi (CNR-ISMAR) e al termine della proiezione è previsto uno spazio per domande e discussione. Informazioni dettagliate a breve su <http://www.life-rarity.eu>.

14 e 16 ottobre 2013 **ACCREDITATE LE INIZIATIVE DI FORMAZIONE RARITY PER INSEGNANTI DELLA SCUOLA SUPERIORE**

Con [decreto](#) del 2 agosto 2013 l'Ufficio Scolastico Regionale del FVG ha autorizzato l'iniziativa di formazione RARITY rivolta agli insegnanti della scuola superiore (vedi [iniziativa formativa](#) e [allegato 3](#) con i dettagli del programma di attività previste) per l'anno scolastico 2013-2014. Sono quindi benvenute le adesioni e le iscrizioni dei docenti che intendessero partecipare. Il programma di formazione, del tutto gratuito, è previsto per le date di lunedì 14 e mercoledì 16 ottobre 2013, dalle 15:00 alle 18:00, presso l'[Acquario ETP delle specie di acqua dolce](#) di Ariis di Rivignano (Rivignano, Udine). Prenotazioni, richieste, informazioni, contatti: tel. 0432.551.214, email tiziano.scovacicchi@ve.ismar.cnr.it. Modulo di iscrizione e approfondimenti a questa [pagina](#).

12 novembre 2013 **GAMBERI DI FIUME, PROGETTO E MOVIE RARITY ALL'UNIVERSITA' DELLA TERZA ETA' DI CERVIGNANO (UDINE)**

Gamberi di fiume e progetto RARITY: impatto ambientale e minacce alla biodiversità in rapporto alla diffusione del gambero rosso della Louisiana. Introduzione al problema delle invasioni biologiche,

visione del film RARITY *Alieni tra noi* e discussione. Relatore il Dott. Tiziano Scovacicchi (CNR-ISMAR, Venezia). Dalle 15:00 alle 16:30. Info: [Università della Terza Età di Cervignano](#), Presidente Irina Coretti Lorenzutti, email utecittacervignano@gmail.com. Leggi il [programma](#) degli eventi.

Events & News

1, 22 and all September 2013 **RARITY IN THE EDUCATIONAL NATURE CENTRE OF BAZOVICA (TRIESTE)**
RARITY will be guest for almost the entire month of September 2013 (from 1st to 25th of the month) of the Bazovica [CDN](#) with aquariums with native shrimp and the Louisiana red swamp crayfish, informational materials and in a few moments with their staff. The Fisheries Protection Agency of Friuli Venezia Giulia (lead partner of the project) will document and make it visible to the public schools and the means used in carrying out field activities such as the supply of dry canals and waterways for the purposes of maintenance, the release of juvenile fish and crayfish for fishing and restocking, tracking and fishing carried out within the RARITY. Means and aquariums will be visible every day from 10:00 to 18:00. In particular, Sunday September 1 and Sunday, September 23 between 10:00 and 18:00 (times may still be defined in detail) will be presented to the public the project, the activities RARITY and the movie "Aliens among us." On these two occasions Dr. Tiziano Scovacicchi (CNR-ISMAR) will introduce the audience to the subject RARITY with a presentation and the movie to which questions and discussion will follow.

Info: CDN, tel. 040.376.3677, e-mail cdn@regione.fvg.it

8 September 2013 **RARITY AT THE 93rd ORNITHOLOGICAL, POULTRY AND RABBIT-RAISING EXHIBITION (MANIFESTAZIONE ORNITOLOGICA E AVICUNICOLA) IN TRICESIMO (UDINE)**

RARITY will be present with aquaria (containing the native and the Louisiana red swamp crayfish), information materials, and its staff.

22 September 2013



27 September 2013 **RARITY AT NEAR (RESEARCHER'S NIGHT) IN TRIESTE**

The researcher's night - [NEAR](#) (North East Researcher's Night) - will take place in Padua, Trieste, Udine, Venice and Verona on 27.IX.2013. The event is promoted by the EC with the aim to make researchers and the public meet in different European cities on the 4th Friday of September. It is a very special occasion to have fun and to put citizens and research scientists together opening a space for discussion and dissemination, and showing the opportunities offered to young people by a scientific career. During NEAR citizens will be able to visit research facilities which are usually close to public, use the most advanced technologies under the guide of researchers, participate into experiments, attend competitions, exchange ideas and have fun with the world of science. RARITY will be present with aquaria (containing the native and the Louisiana red swamp crayfish), information materials, and its staff. *Additional information soon on* http://www.life-rarity.eu/pagine/eventi_news_2013.htm.



28-29 September 2013 **RARITY AT NEXT (EUROPEAN INNOVATION AND SCIENCE RESEARCH FORUM) IN TRIESTE.**

RARITY will be present with aquaria (containing the native and the Louisiana red swamp crayfish), information materials, and its staff.

Additional information soon on

http://www.life-rarity.eu/pagine/eventi_news_2013.htm.



23 and 30 September 2013 **RARITY AT THE ISTITUTO TECNICO AGRARIO OF SPILIMBERGO** Thanks to interest and care of Paola Zanutel ([ETP Aquarium of Ariis](#)), and to the active collaboration of Prof. Angela Sameda, RARITY and ITAG (Istituto Tecnico Agrario) of Spilimbergo (Pordenone) will work together. Two afternoon meetings (labs, classes, projection of the RARITY movie) will take place at the high school. Later on one [ITAG](#) student will attend an ETP hatchery for the production of juveniles of *Austropotamobius pallipes* during a 40-hour apprenticeship aimed to provide theoretical and practical information and know-how on the RARITY issues.

4 October 2013 **ALIENS AMONG US AT THE VISITOR CENTER "LA SORGENTE" OF SAVOGNA (Udine)**

Thanks to the collaboration with Alessia Elia, RARITY at the visitor center "La Sorgente" of Savogna (Udine), in the heart of the Valleys of Natisone, will present the movie "Aliens among us." During the evening we will talk of alien species, biological invasions and biodiversity. The themes and the RARITY film will be presented by Tiziano Scovacricchi (CNR-ISMAR) and at the end of the screening there will be a space for questions and discussion. Information: Alessia Elia, coordinator for the center-visits La Sorgente, cvsavogna@lasorgentecoop.it e-mail, phone (+39) 335.108.5127.

11 October 2013 **RARITY AT THE "VECCHIA PESCHERIA" DI MARANO LAGUNARE (UDINE)**

Thanks to the collaboration with Daniela Fabrici and Giuseppe Milocco ([Protezione Civile del Friuli Venezia Giulia](#)), RARITY submit to the Vecchia Pescheria of Marano Lagoon the movie "Aliens among us." During the evening we will talk of alien species, biological invasions and biodiversity. The themes and the film will be presented by Tiziano Scovacricchi RARITY (CNR-ISMAR) and at the end of the screening there will be a space for questions and discussion. Date, time and detailed information about the event soon on this [page](#).

14 and 16 October 2013 **OFFICIALLY AUTHORIZED THE RARITY TRAINING INITIATIVES FOR HIGH SCHOOL TEACHERS** By the [decree](#) of eligibility dated August 2, 2013 the "Ufficio Scolastico Regionale del FVG" has authorized the RARITY training initiative for high school teachers (see the training [initiative](#) and the [attachment](#) 3 reporting info and details about the programme of scheduled activities) for the school year 2013-2014. Indications of interest and subscriptions from interested teachers are welcome. The training programme is totally free and it is scheduled to take place on Monday 14 and Wednesday 16 August 2013, from 15:00 to 18:00, at the [Aquarium ETP](#) in Ariis di Rivignano (Rivignano, Udine). Bookings, inquiries, information, contacts: tel. +39 0432.551.214, email tiziano.scovacricchi@ve.ismar.cnr.it. Application form and details on this [page](#).

12 November 2013 **FRESHWATER CRAYFISH, THE RARITY PROJECT AND THE RARITY MOVIE AT THE UNIVERSITY OF THE THIRD AGE OF CERVIGNANO (UDINE)**

Freshwater crayfish and the RARITY project: environmental impact and threats to biodiversity in relation to the diffusion of the Louisiana red swamp crayfish. Introduction to the problem of

biological invasions, vision of the RARITY movie *Aliens among us* and discussion. Speaker: Dr Tiziano Scovacricchi (CNR-ISMAR, Venice). From 15:00 to 16:30. Info: [Università della Terza Età of Cervignano](#), President Irina Coretti Lorenzutti, email utecittacervignano@gmail.com. See the [programme](#) of the event.

