



LIFE10 NAT/IT/000239 "RARITY"

Eradicate invasive Louisiana red swamp  
and preserve native white clawed crayfish  
in Friuli Venezia Giulia

# **Az. A2**

## **2nd Scientific report with bibliography**





## ACTION A.2 Set up of methods and tools for collecting *P. clarkii*

### A.2.1 Selecting the best practices to manage invasive NICS

#### Report scientifico

Aquiloni L<sup>2</sup>, Manfrin C<sup>1</sup>, Antcheva N<sup>1</sup>, Borgogna M<sup>1</sup>,  
De Moro G<sup>1</sup>, Edomi P<sup>1</sup>, Florian F<sup>1</sup>, Gerdol M<sup>1</sup>,  
Inghilesi AF<sup>2</sup>, Marson L<sup>1</sup>, Pallavicini A<sup>1</sup>, Paoletti S<sup>1</sup>,  
Piazza F<sup>1</sup>, Giulianini PG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze della Vita, Università degli Studi di Trieste, Trieste (Italy)

<sup>2</sup>Dipartimento di Biologia Evoluzionistica, Università degli Studi di Firenze, Firenze (Italy)



## SOMMARIO

A.2.1.1	Tecnica SMRT “Tecnica del rilascio di maschi sterilizzati”	3
	La tecnica di sterilizzazione dei maschi e rilascio in natura Sterile Male Release Technique - SMRT	3
	Lo stato delle conoscenze sulla SMRT per il controllo di <i>Procambarus clarkii</i>	3
	Obiettivi per l’implementazione della tecnica	4
	Comportamento sessuale in un contesto sociale in <i>P. clarkii</i>	4
	Quantificazione della sterilità e delle possibili alterazioni comportamentali indotte su maschi di <i>P. clarkii</i> a diverse dosi irraggianti	7
	ANALISI PER VALUTARE IL DANNO TESTICOLARE	8
	Contenuto di DNA in citofluorimetria a flusso	8
	Analisi comportamentale e output riproduttivo dei maschi irradiati	9
	Analisi morfometrica e citologica del danno testicolare	12
	Prospettive e conclusioni sull’applicabilità della tecnica SMRT	17
A.2.1.2	Esche con feromoni sessuali	19
	Messa a punto di esche contenenti molecole attrattive specie-specifiche	19
	Creazione di una libreria di espressione in phage-display	21
	Selezione della libreria su antennule di esemplari maschi di <i>P. clarkii</i>	23
	Matrici di alginato per la diffusione lenta delle molecole in acqua	26
	Prospettive e conclusioni sull’applicabilità delle esche feromonal	28
A.2.1.3	Esche ormonali per ridurre la fecondità di <i>P. clarkii</i>	30
	Esche ormonali contenenti l’ormone gonado-inibitorio	30
	Matrici per la somministrazione orale dell’ormone gonado-inibitorio	30
	Preparazione dell’esca per veicolare il GIH	31
	Ottimizzazione delle esche	33
	Esperimenti per verificare la funzionalità della somministrazione orale di ormoni peptidici	34
	Dimostrazione del ruolo dell’ormone gonado-inibitorio in <i>P. clarkii</i> mediante iRNA	37
	Caratterizzazione del GIH di <i>P. clarkii</i>	39
	Sintesi chimica in fase solida di neuro-peptidi peduncolari del gambero rosso della Louisiana	40
	Prospettive e conclusioni sull’applicabilità di esche ormonali	44
	Bibliografia	45



### A.2.1.1 Tecnica SMRT “Tecnica del rilascio di maschi sterilizzati”

#### **La tecnica di sterilizzazione dei maschi e rilascio in natura *Sterile Male Release Technique* - SMRT**

Questa tecnica per il controllo di popolazione prevede il rilascio nell'ambiente di maschi sterili ma sessualmente attivi, ovvero in grado di competere con i maschi non trattati per l'accoppiamento e mostrare un display comportamentale di tipo selvatico. Già utilizzata con successo a partire dagli anni '50 per il controllo degli insetti invasivi (Knipling, 1960; Curtis, 1985), questa tecnica presenta un' elevata potenzialità di applicazione anche per la gestione di popolazioni invasive di Crostacei Decapodi. La SMRT è infatti sicura ed accettabile sia dal punto di vista ecologico, poiché agisce solo sulla specie bersaglio senza alterare gli equilibri del bioma presente, sia dal punto di vista della salute umana (Holdich *et al.*, 1999; Lodge *et al.*, 2006). Inoltre, è compatibile con altre tecniche di controllo, non risulta particolarmente dispendiosa e non richiede tempi lunghi di applicazione, in quanto più animali possono essere trattati nello stesso momento. Diversamente dalle tecniche di controllo tradizionali, come il trappolaggio intensivo, l'efficacia della SMRT aumenta quando la densità degli individui è bassa in quanto, dato un certo numero di maschi sterili rilasciati, la loro probabilità di accoppiamento con le femmine aumenta al diminuire della dimensione della popolazione.

#### **Lo stato delle conoscenze sulla SMRT per il controllo di *Procambarus clarkii***

La possibilità di applicare questa tecnica per il controllo dei Crostacei invasivi è stata recentemente esplorata utilizzando proprio *P. clarkii* come specie di indagine. Attraverso un'indagine della letteratura è emerso che le radiazioni ionizzanti costituiscono il metodo più efficace per indurre sterilità nei maschi adulti di questa specie garantendo, al contempo, i requisiti di sicurezza ambientale. La sterilizzazione attraverso radiazioni era già utilizzata, con finalità completamente diverse, per animali di interesse commerciale come *Penaeus japonicus* per il quale sono stati utilizzati raggi X (Sellars e Preston, 2005) e su *Palaemonetes pugio* (Rees, 1962) e su *Macrobrachium rosenbergii* (Lee, 2000) per il quale sono stati utilizzati raggi gamma ma non erano mai state condotte indagini esaustive circa i protocolli da utilizzare per il trattamento irraggiante e i metodi di quantificazione del danno a livello istologico e comportamentale. Con la finalità di produrre animali sterili per la SMRT è basilare avere questo tipo di informazioni e assicurarsi che gli animali, oltre ad essere sterili, mantengano adeguati display comportamentali per riuscire ad accoppiarsi con le femmine. Per questo motivo, è stata condotta un'indagine per la messa a punto di tali protocolli utilizzando una dose irraggiante “prudente” (pari a 20 Gy), ovvero in grado di produrre danni sensibili alle gonadi senza però uccidere gli animali. Questo ha consentito di quantificare il danno arrecato producendo dei protocolli di indagine necessari per rendere comparabili gli effetti prodotti a diverso dosaggio. La sterilità indotta con 20 Gy di dose irraggiante su maschi adulti di *P. clarkii* è pari al 43%, la sterilità è permanente (ovvero le gonadi non sono in grado di rigenerare tessuto germinale funzionale nella successiva stagione





riproduttiva) mentre il comportamento sessuale non viene significativamente alterato (Aquiloni *et al.*, 2009). Studi comportamentali sulla scelta sessuale femminile hanno dimostrato una preferenza per maschi dominanti (Aquiloni *et al.*, 2008) di grandi dimensioni (Aquiloni e Gherardi, 2008) suggerendo quindi le caratteristiche morfologiche da considerare per la selezione dei maschi da trattare. Più recentemente, il rilascio in natura di maschi con queste caratteristiche e trattati con 20 Gy ha determinato una riduzione significativa delle classi di taglia giovanili nella stagione successiva (Cecchinelli *et al.*, 2010), dimostrando la grande potenzialità di questa tecnica per il controllo di *P. clarkii*.

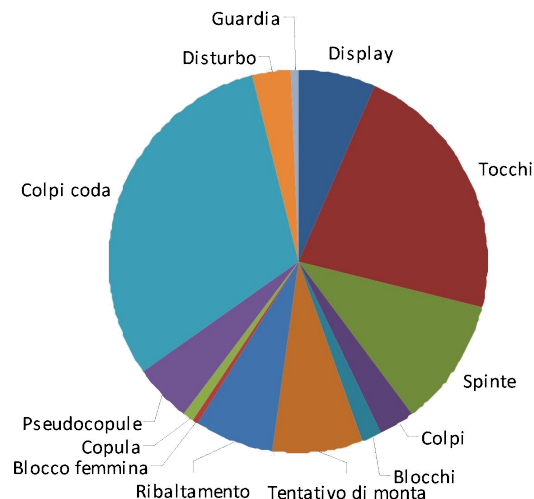
### **Obiettivi per l'implementazione della tecnica**

Dato che una femmina che si accoppia con un maschio sterile deporrà uova destinate a degenerare, il successo riproduttivo di una popolazione sarà tanto più ridotto quanto (1) maggiore sarà la probabilità che in natura una femmina scelga un maschio sterile come partner e (2) quanto maggiore sarà il livello di sterilità raggiunto dal maschio. Per implementare la tecnica sono stati quindi condotti alcune analisi comportamentali sia per valutare quanto la preferenza femminile per i maschi di grandi dimensioni e dominanti (già dimostrata con esperimenti di scelta binaria - Aquiloni e Gherardi, 2008; Aquiloni *et al.*, 2008) fosse espressa anche in un contesto sociale più vicino alla situazione naturale (Analisi 1) sia per individuare la dose di trattamento più efficace, ovvero quella in grado di garantire la maggiore sterilità maschile senza produrre significative alterazioni comportamentali (Analisi 2).

### **Analisi 1 - Comportamento sessuale in un contesto sociale in *P. clarkii***

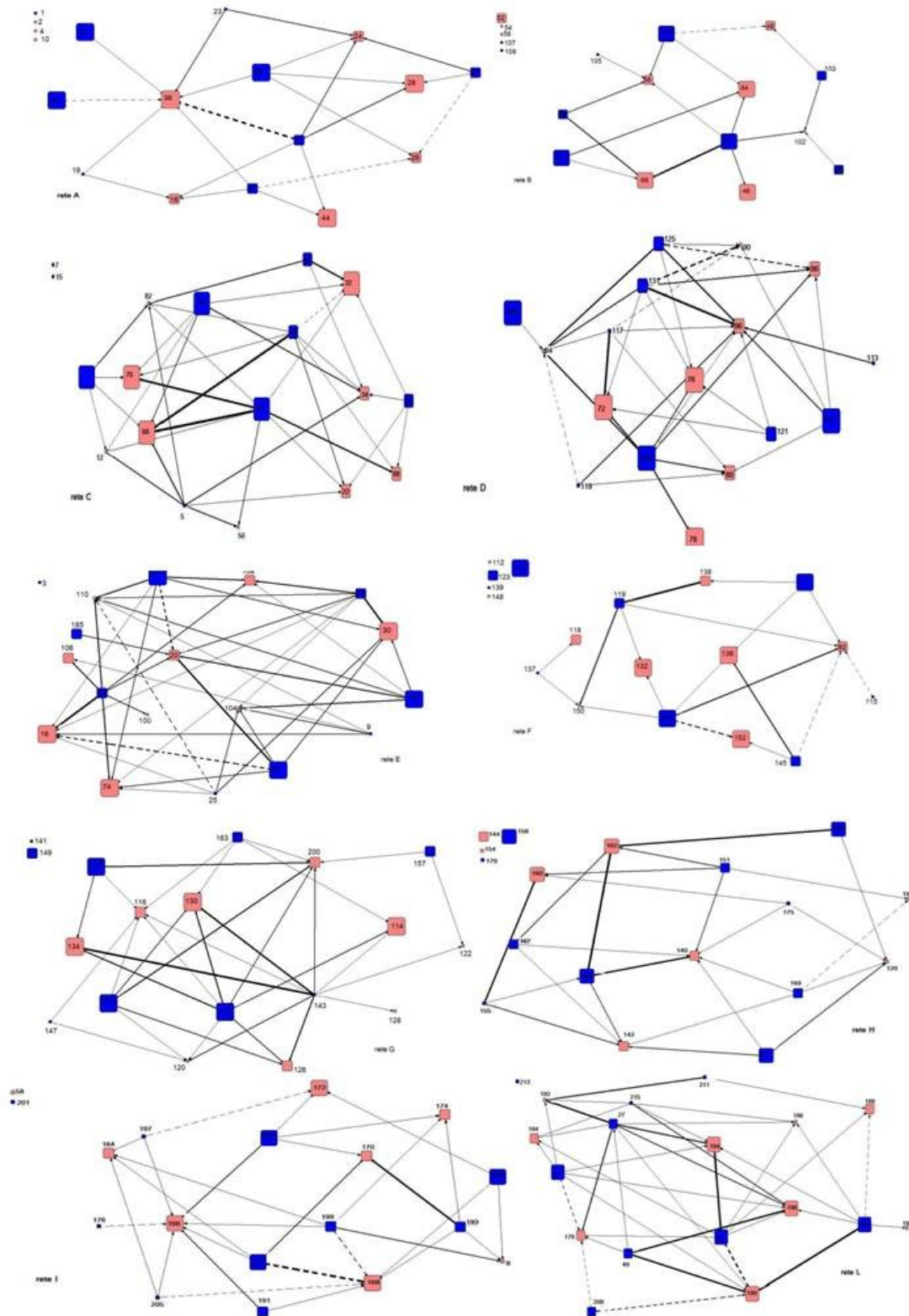
Esperimenti di scelta binaria hanno evidenziato che entrambi i sessi scelgono il partner di maggiori dimensioni (Aquiloni e Gherardi, 2008) e, a parità di dimensioni, le femmine scelgono il maschio dominante (Aquiloni *et al.*, 2008). L'obiettivo di questa indagine è stato quello di analizzare se questa preferenza si mantiene anche in un contesto sociale, dove altri fattori, legati all'interazione tra più individui, potrebbero influenzare la scelta femminile. I risultati hanno importanti ricadute applicative per la SMRT in quanto indicano i maschi più idonei da sottoporre al trattamento sterilizzante, ovvero quei maschi in grado di conquistare il maggior numero di femmine per l'accoppiamento. Gli animali sperimentali sono stati pescati nel Lago Trasimeno (Umbria) con bertovelli. Una volta identificato il sesso e misurata la lunghezza del cefalotorace (CL), sono stati marcati individualmente e isolati in acquari per una settimana, in modo da eliminare l'esperienza sociale pregressa (Hemsworth *et al.*, 2007). Sono stati costituiti 10 gruppi, a sex ratio bilanciata, di 18 individui ripartiti in tre classi di taglia (piccoli: CL=35-40 mm; medi: CL=40-45 mm; grandi: CL=45-50 mm). Le dimensioni dei maschi di taglia grande erano analoghe a quelle preferite dalle femmine durante gli esperimenti di scelta binaria (Aquiloni e Gherardi, 2008) e le densità scelte per la rete (20 ind/m<sup>2</sup>) sono comparabili a quelle presenti in natura (Gherardi *et al.*, 1999). Gli animali sono stati posizionati in una vasca contenente 40 l di acqua e mantenuti per 5 min entro contenitori opachi per acclimatarsi alle condizioni sperimentali. I gruppi sono stati osservati dalle ore 10 alle ore 11.

Tutti i comportamenti e le interazioni sono state filmate e quindi annotate. Le interazioni tra i membri di ogni gruppo sono state visualizzati utilizzando il software *NetDraw 2.123* (Borgatti, 2002). Il 44% dei comportamenti osservati nel contesto sociale sono di tipo aggressivo (*display* di minaccia, tocchi, spinte, colpi e blocchi), il 31% sono azioni di fuga e il 21% sono interazioni sessuali (tentativo di monta, ribaltamento, blocco della femmina, copula e pseudo-copula). Le attività di disturbo alla copula (3%) e la guardia alle coppie eterosessuali (1%) – comportamenti mai osservati in precedenza – sono meno frequenti (Fig. 1).



**Fig. 1 Interazioni comportamentali rilevate in una rete sociale.** I gruppi erano costituiti da individui di tre classi di taglia (piccola, media e grande) a sex ratio bilanciata e in densità comparabili a quelle presenti in natura (20 ind/m<sup>2</sup>).

Circa il 40% delle femmine che copulano lo fanno con almeno due maschi diversi mentre solo il 3% dei maschi riesce a copulare con due femmine (come evidenziato nell'analisi di rete in Fig. 2). Le femmine e i maschi che copulano più spesso appartengono alle classi di taglia medio-grande (CL femmine:  $44.74 \pm 1.06$  mm; CL maschi:  $44.04 \pm 0.78$  mm). La durata di due copule successive non risulta significativamente diversa (prima:  $537.12 \pm 99.98$  s; seconda:  $461 \pm 1114.99$  s; t test per dati appaiati:  $t=0.527$ ;  $df=7$ ,  $P=0.615$ ). Circa l'89% delle copule subisce  $11 \pm 2.9$  eventi di disturbo ad opera di altri maschi, i quali montano sulla coppia in copula e tentano di separarla con le chele. Però, solo il 17% degli eventi di disturbo determina l'interruzione della copula; di conseguenza, la durata media della copula di coppie disturbate ( $543.5 \pm 72.62$  s) non risulta diversa da quella di coppie che non lo sono ( $399 \pm 88.7$  s;  $t=0.979$ ,  $df=26$ ,  $P=0.337$ ). A conferma dell'influenza del contesto sociale nelle interazioni sessuali, l'analisi evidenzia una diversa durata dei vari tipi di interazione tra le reti (GLM,  $F=5.854$ ,  $df=33$ ,  $P<0.0001$ ) (Fig. 2). La durata delle interazioni sessuali differisce in modo significativo in relazione sia all'intensità dell'interazione (GLM,  $F=346.954$ ,  $df=4$ ,  $P<0.0001$ ), con la copula che presenta una durata maggiore delle altre, sia tra reti (GLM,  $F=12.561$ ,  $df=9$ ,  $P<0.0001$ ) dove la durata complessiva del tempo dedicato alle interazioni sessuali cambia.



**Fig. 2 Visualizzazioni delle reti sociali dei 10 gruppi considerati.** Ogni nodo indica un individuo maschio (quadrato blu) o femmina (quadrato rosa). La dimensione dei quadrati indica la classe di taglia dell'individuo (piccola, media e grande) mentre il diverso spessore delle frecce di collegamento tra



nodi indica la quantità di interazioni avvenute tra due individui. La copula è rappresentata da una linea tratteggiata tra due individui. Gli individui che non partecipano alle interazioni sono rappresentati da nodi separati dagli altri in alto a sinistra.

Maschi e femmine interagiscono con partner di dimensioni simili (GLM,  $F=0.636$ ,  $df=4$ ,  $P=0.637$ ), anche se in modo variabile tra reti (GLM,  $F=1.941$ ,  $df=9$ ,  $P=0.044$ ). La differenza di taglia tra i due partner non ha effetto sulla durata della copula (correlazione di Pearson:  $r=0.52$ ,  $N=28$ ,  $P=0.792$ ). In generale, in ogni tipo di interazione si evidenzia un appaiamento per taglia, costante tra reti (GLM,  $F=0.648$ ,  $df=33$ ,  $P=0.938$ ).

I risultati evidenziano quanto il contesto sociale possa effettivamente influire sulla dinamica sessuale in *P. clarkii*. A supporto di quanto emerso da esperimenti di scelta binaria, anche nel gruppo la taglia è un fattore oggetto di scelta: gli animali tendono ad appaiarsi per taglie simili anche se sono gli individui di dimensioni medio-grandi ad accoppiarsi più spesso. Da un punto di vista applicativo, la presenza di accoppiamenti poligami dovrà essere tenuta in considerazione nella stima del numero di maschi sterili da rilasciare per il controllo delle popolazioni invasive.

## **Analisi 2 - Quantificazione della sterilità e delle possibili alterazioni comportamentali indotte su maschi di *P. clarkii* a diverse dosi irraggianti**

Gli animali sperimentali (circa 300 tra maschi e femmine adulti di *P. clarkii*) provengono dalla zona delle Cascine di Tavola e del Lago Ombrone (Prato) e dall'oasi delle Querciola a Sesto Fiorentino (FI). Sono stati pescati con bertovelli tra maggio e giugno, ovvero prima dell'inizio della stagione riproduttiva. Come evidenziato in Aquiloni *et al.* (2009), questa accortezza offre il duplice vantaggio di irraggiare le gonadi degli animali nel momento di maggiore radiosensibilità (con cellule in meiosi per la produzione di spermatozoi da utilizzare nella imminente stagione riproduttiva) e di raccogliere individui con una bassa probabilità di essersi accoppiati prima delle osservazioni comportamentali. Gli individui, una volta pescati, sono stati trasportati in laboratorio e divisi per sesso in vasche (120 x 60 cm; acqua 15 cm) dotate di rifugi artificiali. Gli animali sono stati marcati individualmente sul cefalotorace con un pennarello resistente all'acqua; contemporaneamente alla marcatura a ciascun animale è stata misurata la lunghezza del cefalotorace con un calibro (accuratezza 0.1 mm). La misura del cefalotorace ci ha permesso, successivamente, di accoppiare gli animali secondo un criterio che prevede il minimo scarto possibile tra la misura del maschio e quella della femmina. Dopo la marcatura, gli animali di entrambi i sessi sono stati immediatamente isolati in acquari individuali (dimensioni: 26 x 16 cm; acqua 5 cm) per eliminare l'esperienza sociale pregressa prima delle osservazioni comportamentali (Hemsworth *et al.*, 2007). I maschi scelti per la sterilizzazione (ovvero gli individui di medio-grande taglia e sessualmente maturi, vedi analisi 1) sono suddivisi in 4 gruppi sperimentali di 30 individui ciascuno, corrispondenti alle tre dosi irraggianti scelte per l'indagine (20, 40 e 60 Gy) e al controllo. L'irraggiamento è stato eseguito il 3 Luglio 2013 presso il reparto di radiobiologia dell'ospedale di Careggi (Firenze). Gli animali durante il



trattamento sono stati mantenuti in una vasca in plexiglas (h:17x29x36 cm; acqua 10 cm) coperta con una lastra, anch'essa in plexiglas, di 2 cm di spessore. Il campo di irraggiamento (40x30 cm) era maggiore della dimensione della vasca e il fuoco si trovava a un metro dal centro della vasca. Variando i tempi di esposizione è stato possibile raggiungere il dosaggio richiesto e, in particolare, sono stati necessari 10, 35 e 45 minuti per erogare, rispettivamente, 20, 40 e 60 Gy. I controlli hanno subito lo stesso trasporto e le stesse manipolazioni dei gruppi trattati al fine di provocare gli stessi livelli di stress nei 4 gruppi di indagine per non alterare la quantificazione degli effetti dell'irraggiamento. Gli animali sperimentali sono stati nuovamente messi negli acquari di isolamento in attesa delle analisi morfometriche e citologiche (UNITS), citofluorimetriche (UNIFI) e dei test comportamentali (UNIFI).

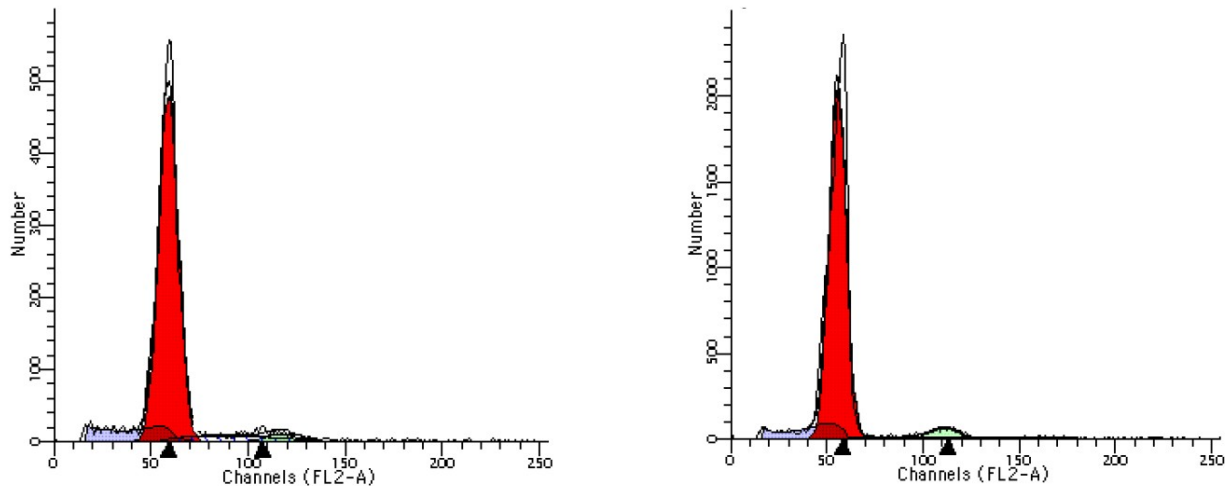
## **ANALISI PER VALUTARE IL DANNO TESTICOLARE**

### **Contenuto di DNA in citofluorimetria a flusso**

L'applicazione della citofluorimetria all'analisi del contenuto di DNA permette di ricavare parametri che si riferiscono alla percentuale di cellule nelle varie fasi del ciclo e in particolare l'aliquota di cellule in fase di sintesi del DNA; essi misurano la durata del ciclo cellulare, delle sue fasi, la frazione complessiva di cellule proliferanti, la velocità di proliferazione e la morte cellulare. Questo tipo di analisi, utilizzato per la prima volta nei Decapodi, ci ha permesso di misurare l'attività proliferativa delle gonadi in *P. clarkii* e, quindi, di quantificare con buona approssimazione l'effetto dell'irraggiamento sulla produzione di spermatozoi. Il Laboratorio di Biologia Cellulare e Radiobiologia dell'Università di Firenze, presso il quale è stata effettuata l'analisi, ha in dotazione un citofluorimetro a flusso FACScan Becton Dickinson con un laser ad argon di 15 mWatt di potenza, raffreddato ad aria. Il laser ad argon ha una riga di emissione principale nel blu (488 nm) e una nel verde (515 nm). Tra i fluorocromi (coloranti fluorescenti con bande di emissione a lunghezza d'onda note) per il DNA vi sono quelli intercalanti delle basi, che si legano al DNA stechiometricamente e la quantità di fluorescenza da loro emessa e rilevata dal citofluorimetro è proporzionale al colorante legato e, quindi, al contenuto di DNA della cellula. Per l'analisi abbiamo utilizzato lo ioduro di propidio (PI) che presenta la banda di emissione migliore per lo strumento. I campioni sono ottenuti allestendo una sospensione cellulare monodispersa a partire dal campione delle gonadi estratto da ogni animale. A tale scopo il tessuto è disaggregato in un tampone PBS a pH 7.6. La sospensione ottenuta è filtrata attraverso una membrana di nylon con pori di diametro di 50 µm in grado di trattenere gli aggregati cellulari e, successivamente, si calcola la concentrazione di cellule mediante conteggio in camera di Bürker, dopo adeguata diluizione e colorazione con Trypan Blue. La sospensione è centrifugata e il pellet è liberato dal sovrantante per eliminare i detriti cellulari e sottoposto al trattamento con tre soluzioni (una con tripsina suina che prepara al legame con lo ioduro di propidio, una con inibitore della tripsina e ribonucleasi A per eliminare le molecole di RNA e, infine, una con lo ioduro di propidio). L'analisi del ciclo è effettuata da una work-station collegata al citofluorimetro, costituita da un PC Apple Macintosh Power Mac G4, dotato del sistema operativo Mac OS X. L'analisi della distribuzione delle cellule nelle



fasi del ciclo cellulare è eseguita con il software ModFit™ (Verity Software House) che consente di valutare sospensioni in cui sono presenti più di due cloni non diploidi. Lo strumento rappresenta la distribuzione delle cellule nelle varie fasi del ciclo tramite un istogramma di distribuzione di frequenza, ottenuto in funzione della fluorescenza emessa e, quindi, del contenuto di DNA. L'analisi condotta per ogni trattamento e per il controllo ha rilevato una totale assenza di tessuto proliferativo già a 20 Gy come evidenziato dall'istogramma di frequenza (Fig. 3).



**Fig. 3. Citofluorimetria a flusso.** Istogramma di frequenza dei valori di fluorescenza rilevati nell'epatopancreas (a sinistra) e nelle gonadi (a destra) di gamberi irradiati a 20 Gy.

Nella lettura del grafico tipico di una popolazione diploide si rileva la presenza di due picchi, in corrispondenza di valori di fluorescenza uno doppio dell'altro, relativi rispettivamente alle cellule in fase  $G_2/M$  e a quelle in  $G_0/G_1$ . La porzione di grafico compresa tra i due picchi è relativa alle cellule in fase S, che presentano livelli di fluorescenza continui, crescenti e intermedi. Il parametro che esprime la qualità degli istogrammi è il coefficiente di variazione (CV) del picco  $G_0/G_1$ , che si ricava dal rapporto percentuale tra la deviazione standard e il valore medio del contenuto di DNA del picco. CV è indice della dispersione dei valori d'intensità di fluorescenza che può essere dovuta a imprecisioni nel sistema di misura, a inconvenienti legati all'allestimento dei campioni o alla variabilità intrinseca della popolazione stessa. Il grado di ploidia della popolazione esaminata si ricava dal confronto con uno standard diploide di riferimento ed è calcolato come il rapporto tra il canale modale di fluorescenza del picco  $G_0/G_1$  della popolazione in esame e quello del picco  $G_0/G_1$  dello standard di riferimento diploide. Il parametro che si ottiene è il DNA Index (DI), sulla base del quale si assegna il grado di ploidia delle cellule del campione.

#### **Analisi comportamentale e output riproduttivo dei maschi irradiati**

Nessuno dei gruppi sperimentali ha mostrato sensibili alterazioni della



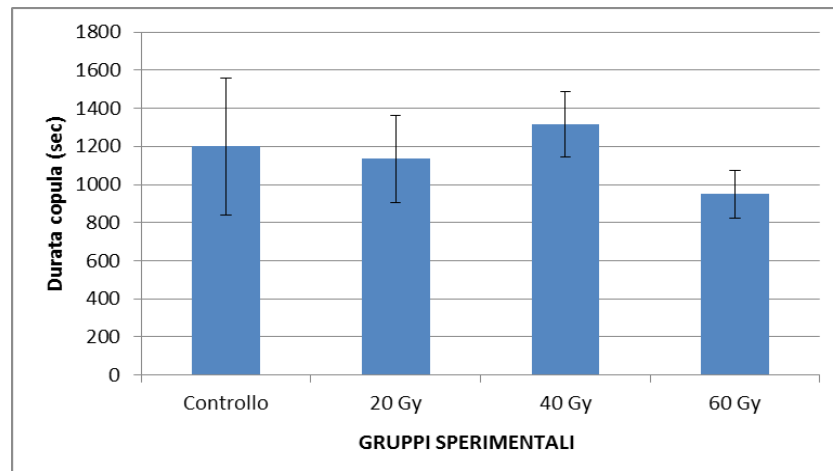
motilità, dell'appetenza e del comportamento in seguito al trattamento. Sono stati quindi formate coppie di animali appaiando i maschi sperimentali e di controllo con femmine in modo da minimizzare la loro differenza di taglia (vedi analisi 1) per le successive osservazioni comportamentali. Sono state formate 23 coppie di controllo e 18, 22 e 21 per i trattamenti a dose crescenti. Dopo un periodo di acclimatazione nella vasca sperimentale la coppia è stata lasciata libera di interagire per 30 minuti durante i quali venivano registrati i comportamenti chiave per l'analisi della capacità riproduttiva. In particolare:

- il tempo di latenza (ovvero, il tempo intercorso tra la rimozione del separatore e la prima interazione);
- le interazioni divise per tipo indicante una diversa motivazione all'accoppiamento;
- la durata di ogni interazione;
- il genere che termina e/o inizia l'interazione;
- la durata della copula.

Dopo tre giorni le coppie venivano separate: il maschio era destinato alle analisi istologiche e citofluorimetriche mentre la femmina rimaneva nell'acquario fino alla schiusa delle eventuali uova prodotte, controllando quotidianamente lo stato riproduttivo e registrando:

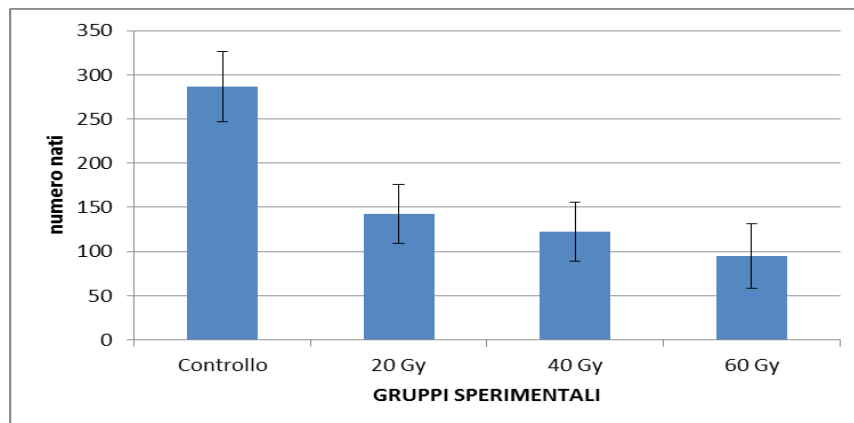
- il giorno di deposizione delle uova;
- stima della dimensione della covata;
- numero dei piccoli dopo un paio di settimane dalla schiusa.

I risultati ottenuti indicano che i maschi trattati non manifestano significative alterazioni comportamentali. Nessuna differenza significativa per i tempi di latenza che rimangono simili tra gruppi sperimentali ( $F=0.7059$ ,  $df=39.99$ ,  $p=0.5542$ ). Si registra una significativa riduzione del numero delle interazioni nel trattamento a 20 Gy ( $F=4.127$ ,  $df=44.28$ ,  $p=0.01153$ : Tukey test:  $C=40=60 > 20$ ) ma questo non determina una minore capacità di accoppiamento. Infatti, oltre l'80% dei maschi di ogni trattamento, in modo del tutto analogo ai controlli, riesce a copulare con la femmina assegnata e la durata della copula è simile in tutti i gruppi sperimentali ( $F=0.9445$ ,  $df=35.83$ ,  $p=0.4294$ ), anche se nel gruppo 60 si nota un lieve decremento (Fig. 4). Alcuni maschi riescono a copulare una seconda volta nel corso delle osservazioni sperimentali. I numeri, in questo caso, sono troppo bassi per poter fare analisi statistiche ma si rileva la presenza di una seconda copula nel controllo e nel trattamento a 20 Gy, due con maschi 40 Gy e ben tre con i maschi 60Gy.



**Fig. 4. Durata dell'accoppiamento tra i diversi gruppi sperimentali.** Nessuna differenza significativa ma un lieve decremento nei maschi trattati a 60 Gy.

L'irraggiamento ha determinato una significativa riduzione nel numero delle nascite in tutti i trattamenti rispetto al controllo ( $F=4.523$ ,  $df=35.47$ ,  $p=0.0087$ ; Tukey test:  $C > 20=40=60$ , Fig. 5). Inoltre, si osserva una tendenza alla diminuzione del numero di nuovi nati all'aumentare della dose utilizzata registrando, rispettivamente, il 50%, 43% e 33% di giovani in meno.



**Fig. 5. Numero nati in coppie con maschio di diversi gruppi sperimentali.** I nati da maschi di controllo sono in numero significativamente maggiore rispetto agli altri gruppi sperimentali. Il trattamento ha prodotto un abbattimento delle nascite, rispettivamente, del 50%, 43% e 33% all'aumentare della dose irraggiante.

Dal confronto dei dati di Aquiloni *et al.* (2009) in cui il trattamento a 20 Gy aveva determinato una riduzione del numero delle nascite pari al 43%, notiamo che per avere lo stesso effetto è stato utilizzato un dosaggio doppio. Ciò evidenzia come la radiosensibilità dei maschi di *P. clarkii* sia molto variabile, come già riportato in letteratura per altre specie. A parità di dosaggio, infatti, l'effetto delle radiazioni è influenzato da:

- fattori fisici: temperatura (Barbosa, 1976), irradiazione cronica o frazionata (Mayas, 1975; Tamhankar e Shantharam, 2001) e atmosfere





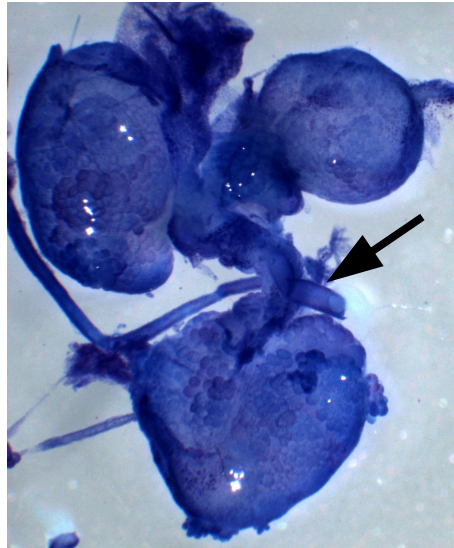
modificate (Ohinata *et al.*, 1977; Fisher, 1997);

- fattori biologici: condizioni alimentari, peso e sesso (Carpenter e Gross, 1989; Mansour, 2003; Hallman, 2003);
- fattori umani: procedure seguite per trasportare gli animali e per sottoporli alle radiazioni (Hooper, 1989; Fisher, 1997), modalità di allevamento, metodi per la valutazione di fertilità e fecondità, analisi statistica, interpretazione dei dati.

Inoltre, nel caso in cui l'organo bersaglio sia costituito dalle gonadi, buona parte della variabilità può essere spiegata anche dal diverso stadio dello sviluppo gonadico raggiunto al momento dell'irraggiamento. Le cellule appartenenti agli stadi precoci della spermatogenesi (spermatociti e spermatogoni) sono più radiosensibili se confrontate con le cellule in stadi più avanzati (spermatidi e spermatozoi) proprio per la presenza di DNA in forma decondensata. La massima espressione degli effetti delle radiazioni si raggiunge quando le gonadi sono in una fase precoce del ciclo di produzione spermatica, fase che varia da popolazione a popolazione in relazione alle condizioni climatiche presenti nel sito.

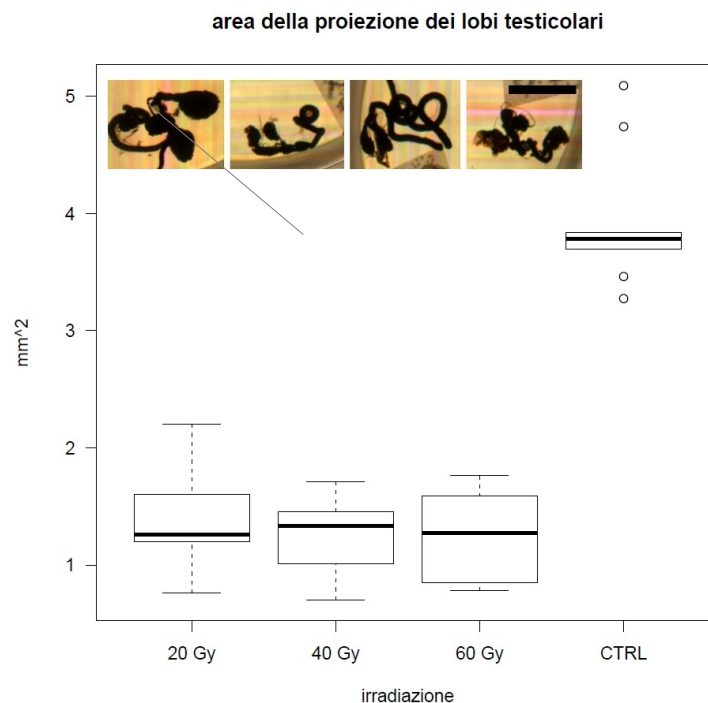
### **Analisi morfometrica e citologica del danno testicolare**

5 maschi per ogni gruppo sperimentale e 5 di controllo sono stati sacrificati dopo 30 giorni dall'irraggiamento per valutare il danno a livello istologico. I testicoli sono stati disecati, fissati in 2.5% glutaraldeide, 1% paraformaldeide, 7.5% acido picrico saturo, saccarosio 0.4 M in tampone fosfato salino (PBS, pH=7.4). I campioni sono stati successivamente post-fissati in tetrossido di osmio, disidratati in serie ascendenti di alcoli e inclusi, via ossido di propilene, in resina epossidica Embed812/Araldite502. Sezioni semifini sono state tagliate con un ultramicrotomo Pabisch Top Ultra 150, colorate con blu di toluidina e osservate con un microscopio Olympus BX50. Per l'analisi ultrstrutturale le sezioni sono state contrastate con citrato di piombo e acetato di uranile e osservate con un microscopio Philips TEM 208. Per la microscopia elettronica a scansione, i campioni in alcool 100° sono stati disidratati al punto critico e metallizzati con oro prima dell'osservazione. Il testicolo di *P. clarkii* è impari e trilobato, con 2 lobi cefalici e 1 caudale, i cui tubuli collettori si uniscono alla base in un peducolo comune tripartito da cui emergono i vasi deferenti (Word e Hobbs, 1958). Il vaso deferente destro è ben sviluppato mentre il sinistro si presenta molto più sottile e atrofico. La struttura di ogni singolo lobulo si presenta acinare e assomiglia ad un grappolo d'uva dove i chicchi rappresentano gli acini e il grappolo rappresenta i protubuli (distali) e i tubuli collettori (prossimali) (Fig. 6).



**Fig. 6. Testicolo di *P. clarkii*.** Struttura del testicolo a fresco colorato con blu di toluidina. L'emergenza del vaso deferente destro è indicata con la freccia.

Il confronto delle proiezioni delle aree massime dei lobi testicolari degli animali di controllo e degli animali irradiati a 20, 40 e 60 Gy evidenzia una differenza altamente significativa tra i 4 gruppi (Kruskal-Wallis test: chi-squared = 22.2556, df = 3, p = 5.771e-05). Il confronto a coppie con la correzione di Bonferroni mette in luce che il gruppo di controllo presenta dei lobi testicolari significativamente più grandi rispetto a tutte e 3 le dosi di irraggiamento (p<0.0001) ma i lobi degli animali irradiati non differiscono tra di loro (Fig.7).



**Fig. 7. Aree massime dei lobi testicolari di *P. clarkii* dopo 30 giorni dall'irraggiamento.** Boxplot delle misure delle proiezioni delle aree massime dei lobi testicolari nei gruppi sperimentali. Inserto: testicoli e vasi deferenti di

un maschio di controllo, e di maschi dopo irraggiamento a 20, 40, e 60 Gy, postfissati in tetrossido di osmio e inclusi in resina epossidica (da sinistra verso destra, barra di calibrazione = 5mm).

L'analisi al microscopio elettronico a scansione conferma che la grandezza dei testicoli degli animali irradiati alle 3 dosi è minore rispetto agli animali di controllo. Inoltre fratture di lobi testicolari lungo il piano sagittale mediale evidenziano una perdita dell'organizzazione acinare del testicolo. Negli animali di controllo gli acini sono ben distinguibili e di dimensioni maggiori (Fig. 8A) rispetto a quelli dei lobi testicolari degli animali irradiati in cui si presentano più compatti e fusi tra di loro a causa dei fenomeni di necrosi e di rimaneggiamento cellulare indotti dalle radiazioni.

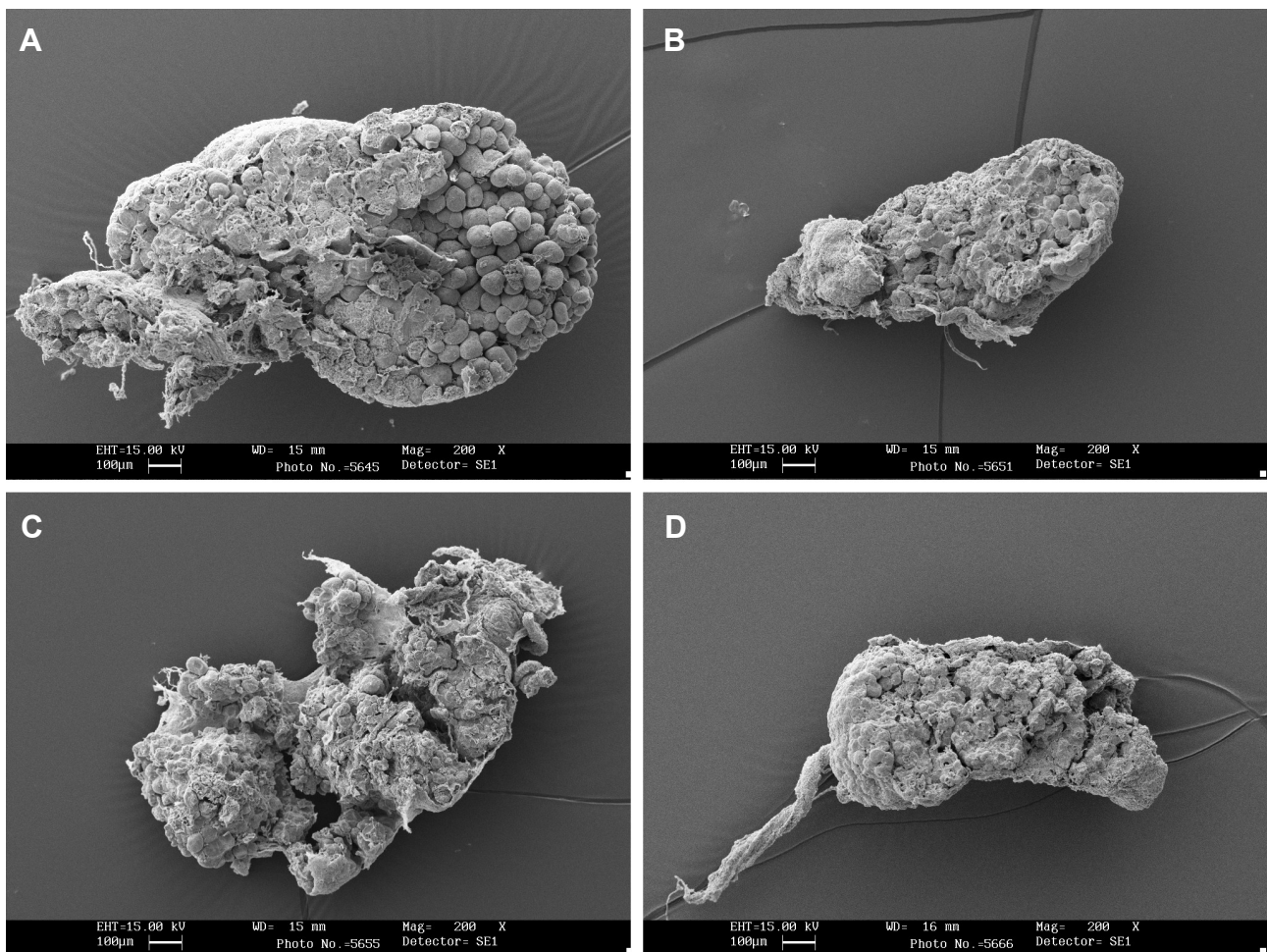
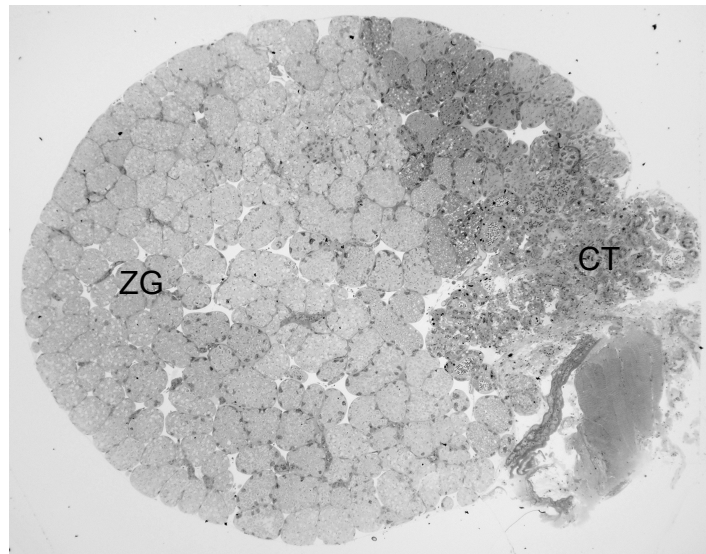


Fig. 8. Vista generale al microscopio elettronico a scansione di lobi testicolari fratturati lungo il piano sagittale mediale di: A – controllo; B – animale irradiato con 20 Gy; C – 40 Gy; D: - 60 Gy.

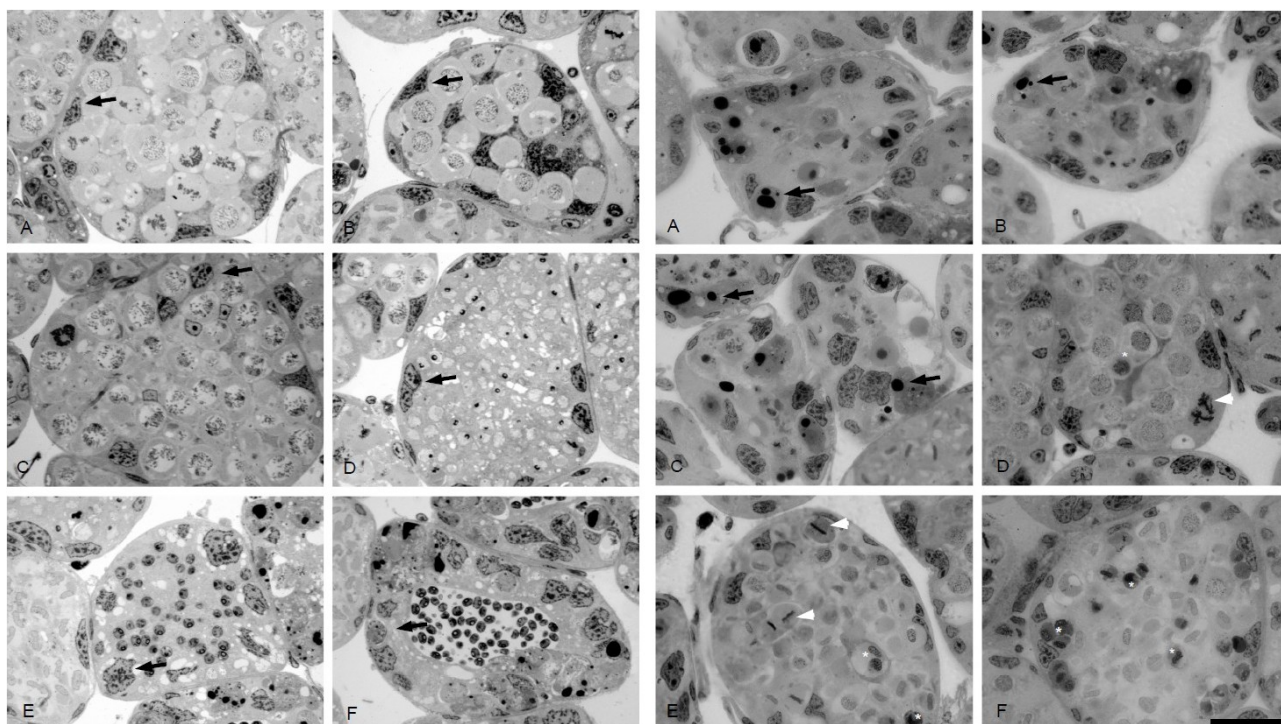
Per indagare con maggior dettaglio i danni a livello della spermatogenesi sono stati allestiti preparati per microscopia ottica ed elettronica. In un lobo testicolare normale in sezione sagittale si evidenzia una maturazione graduale degli acini a partire dalla zona distale germinativa (ZG), con

progressivo aumento delle diametro, a quella prossimale contenente il peduncolo testicolare formato dal raggruppamento dei dotti collettori (CT), in cui gli acini maturi versano gli spermatozoi neoformati (Fig. 9). Ad ingrandimenti maggiori si possono osservare tutti gli stadi della spermatogenesi che vengono illustrati nella Fig. 10 e che ricalcano quanto già descritto in letteratura per altri Decapodi (Erkan *et al.*, 2009a; Erkan *et al.*, 2009b; Rotllant *et al.*, 2012; Word e Hobbs, 1958). Gli acini di animali di controllo sono delimitati da una lamina basale e al loro interno presentano cellule di supporto (del Sertoli) e cellule germinali a vari stadi di maturazione: spermatociti I (A e B), spermatociti II (C), spermatidi precoci e maturi (D ed E) e spermatozoi (F) (Fig. 10).



**Fig. 9.** Sezione semifine (1 $\mu$ m – blu di toluidina) sagittale mediale di un lobo testicolare di un animale di controllo.

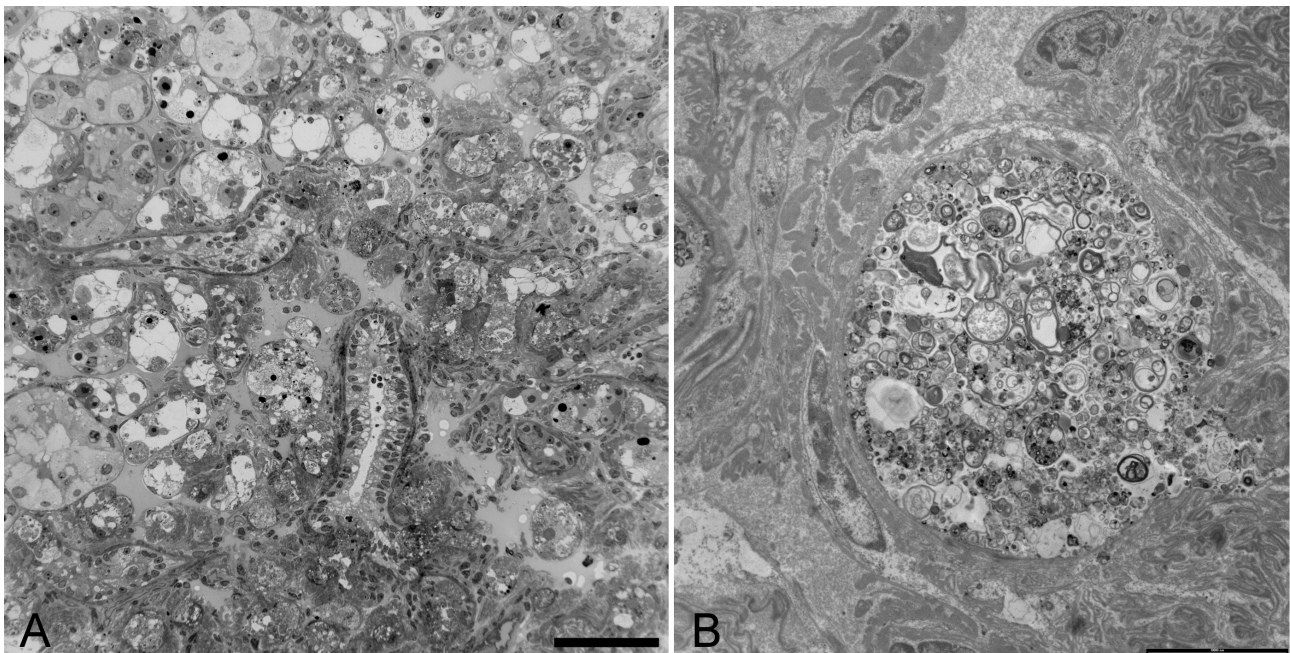




**Fig. 10 (a sinistra).** Sezioni semifini ( $1\mu\text{m}$  – blu di toluidina) di acini testicolari di un animale di controllo a vari stadi di maturazione. Nel lume degli acini sono presenti spermatoцитi I (A e B), spermatoцитi II, spermatidi (D e E) e spermatoцитi maturi. Alcune cellule di Sertoli sono evidenziate con la freccia.

**Fig. 11 (a destra).** Sezioni semifini ( $1\mu\text{m}$  – blu di toluidina) di acini testicolari di un animale irradiato con 20 Gy. Sono visibili cellule di Sertoli con micronuclei (frecce - in necrosi) e le cellule germinali con divisioni meiotiche anomale (punte di freccia) e cromosomi addensati (asterischi). Barra di calibrazione =  $20\mu\text{m}$ .

Gli acini testicolari di animali irradiati con 20 Gy presentano un gradiente di maturazione meno chiaro e molti acini contenenti cellule germinali e di supporto fortemente vacuolizzate con quadri evidenti di necrosi cellulare. Gli acini evidenziano cellule germinali in riassorbimento e molte cellule in avanzato stadio di necrosi che mostrano fino a 3 micronuclei facilmente individuabili per l'intensa colorazione scura (Fig. 11A, B e C). La presenza di micronuclei è correlata ad una fase avanzata di necrosi primaria, in cui la cromatina, che dapprima si condensa, viene poi dispersa nel citosol. All'interno degli acini sono presenti cellule germinali con cromatina addensata insieme a quadri che evidenziano divisioni meiotiche anomale, in quanto i cromosomi rimangono "intrappolati" nel fuso meiotico (Fig. 11D, E e F). A 60 Gy la necrosi delle cellule germinali e di supporto è diffusa lungo tutto il lobo testicolare. Non è più possibile apprezzare quadri di maturazione della spermatogenesi perché gli acini contengono solo cellule con ampie vacuolizzazioni, cromatina addensata e ampi aree di rimaneggiamento membranario (Fig. 12A). L'analisi ultrastrutturale evidenzia un aumento della componente connettivale al di fuori degli acini e all'interno figure residuali di autofagia indicanti uno stadio di necrosi avanzata. Non sono evidenziabili nuclei di cellule vitali (Fig. 12B).



**Fig. 12. Sezioni di lobi testicolari dopo irradiazione con 60 Gy.** A - Sezione semifine (1µm – blu di toluidina). Il danno necrotico è diffuso a tutto il tessuto testicolare. Barra di calibrazione = 100 µm. B - Sezione fine (120nm – citrato di piombo, acetato di uranile). Barra di calibrazione = 10 µm. È visibile un acino contenente esclusivamente figure residuali di processi necrotici.

### **Prospettive e conclusioni sull'applicabilità della tecnica SMRT**

Dall'analisi dell'output riproduttivo e dei danni citologici delle gonadi è evidente come la capacità riproduttiva sia compromessa già a 20 Gy senza un incremento sensibile dell'effetto a dosi crescenti, anche se il danno del



tessuto germinale a 60 Gy è pressoché totale. Visto che il comportamento dei maschi non viene alterato con dosi più elevate, suggeriamo quindi di utilizzare un irraggiamento di 40 Gy che, come evidenziato dall'analisi citofluorimetrica è in grado di annullare completamente la proliferazione cellulare. Data la grande variabilità inter-individuale nella risposta alle radiazioni, che dipende dallo stadio di maturazione delle gonadi, riteniamo più opportuno individuare il periodo ottimale in cui sottoporre i maschi al trattamento piuttosto che utilizzare dosi più elevate. Il periodo di trattamento deve essere individuato caso per caso perché dipende dal contesto ambientale della popolazione bersaglio. Come dimostrato con l'applicazione della SMRT nel sito di Casette (vedi report relativo), questa tecnica autocida non necessita di una assidua (e costosa) attività sul territorio e non causa alcun tipo di impatto sul sito di intervento, diversamente dagli altri metodi tradizionalmente utilizzati per il controllo di Decapodi invasivi (meccanici e chimici). Altro importante fattore da considerare è la possibilità di utilizzare questa tecnica contemporaneamente ad altre più tradizionali, come il trappolaggio intensivo, previa marcatura degli animali prima del rilascio per consentirne il riconoscimento in caso di cattura e il loro immediato rilascio nel sito. Come infatti già dimostrato nell'ambito del progetto RARITY, il trappolaggio intensivo è complementare alla SMRT in quanto consente, da un lato, il reperimento degli animali da trattare e, dall'altro, rimuovendo tutti i maschi non sterili, aumenta la probabilità di accoppiamento delle femmine con i maschi trattati. La sterilizzazione e il rilascio dei maschi trattati possono essere realizzate in un unico giorno ripetendo tale attività con frequenza, al massimo, annuale. L'onere, nel caso d'impiego della SMRT, è quindi sostanzialmente rappresentato dal costo delle operazioni di sterilizzazione dei maschi (costo molto variabile in relazione al numero degli animali trattati e all'istituto che effettua il servizio di irraggiamento). La SMRT potrebbe quindi costituire, dal punto di vista economico e gestionale, la metodica meno impegnativa per il controllo del gambero rosso. Per una corretta applicazione deve però essere stimato il numero di maschi sterili da rilasciare in relazione alla densità e alla struttura di popolazione di partenza, tenendo anche nella dovuta considerazione le caratteristiche del sito di intervento (eventuale presenza di microhabitat a diversa densità di popolazione, punti di ingresso/uscita degli animali, etc.). Inoltre, per ottimizzare l'effetto dell'irraggiamento sarà opportuno catturare gli esemplari prima dell'inizio della stagione riproduttiva, quando le gonadi sono in uno stadio precoce della spermiogenesi. Per la metodica da seguire per l'applicazione della SMRT si rimanda ai relativi protocolli applicativi.





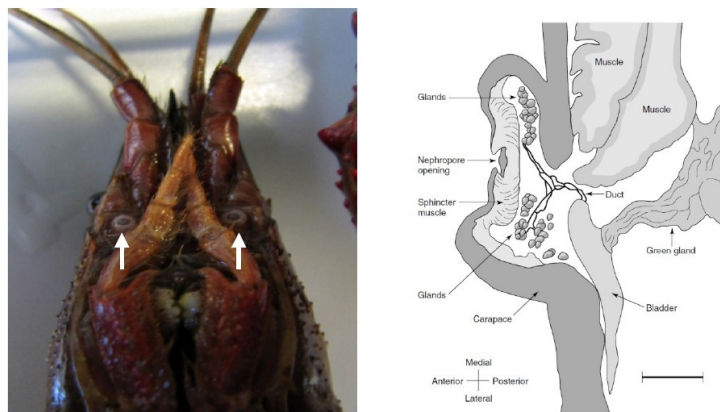
### A.2.1.2 Esche con feromoni sessuali

#### **Messa a punto di esche contenenti molecole attrattive specie-specifiche**

La comunicazione chimica per mezzo di sostanze presenti in determinati fluidi biologici è il mezzo più antico di trasmissione di informazioni tra esseri viventi, attraverso il quale gli individui si scambiano messaggi estremamente precisi che hanno effetti sul comportamento e sulla fisiologia delle specie (Liley, 1982). Diffondendosi nell'aria, nel terreno o nell'acqua, le sostanze chimiche rilasciate sono in grado di portare un messaggio persistente anche a grande distanza evitando molte barriere ambientali. Nell'ambito della stessa specie la comunicazione chimica avviene principalmente attraverso il rilascio di particolari molecole, dette feromoni che sono miscele di sostanze rilasciate dagli individui nell'ambiente circostante (Corkum e Belanger, 2007). I feromoni agiscono su tutte le principali funzioni degli organismi: sulla riproduzione, per il riconoscimento della specie e del sesso, per il richiamo degli individui maturi e per la sincronizzazione riproduttiva (Atema e Voigt, 1995; Belanger e Moore, 2006; Bushmann e Atema, 1994, 1997; Corkum e Belanger, 2007; Dunham e Oh, 1992; Stebbing *et al.* 2003), sullo sviluppo per l'accelerazione della crescita e il differenziamento embrionale, sulle cure parentali, sul rilevamento di segnali d'allarme e di predatori per la difesa del gruppo (Hazlett, 1990, 1994; Keller e Moore, 1999; Schneider e Moore, 2000; Willman *et al.*, 1994), sulla determinazione dei confini del territorio, sulla struttura sociale (Bergman *et al.*, 2003; Schneider *et al.*, 2001), sull'acquisizione di cibo e l'orientamento (Kraus-Epley e Moore, 2002). Un particolare tipo di feromone, comunemente chiamato "feromone sessuale", che è in realtà una complessa miscela di composti chimici denominata anche "bouquet", è caratteristico per ogni specie. In questo composto è presente una molecola principale, che è responsabile del potere attrattivo, legata ad altre molecole accessorie che "completano" la miscela, caratterizzandola in particolare riguardo alla volatilità o alla solubilità in acqua. Finora i feromoni sessuali sono stati individuati in una grande varietà di organismi, e sono studiati anche per la possibilità di interagire con le dinamiche riproduttive di organismi invasivi o infestanti, e ridurre così l'impatto. Soltanto negli insetti questi feromoni sono stati identificati in più di 1500 specie, che possiedono organi specializzati posti nelle antenne per rilevarne la presenza. Nei rappresentanti di questo taxon, i feromoni sessuali sono generalmente prodotti da ghiandole esocrine in entrambi i sessi. Negli ultimi anni, i feromoni scoperti negli insetti hanno consentito il controllo e l'eliminazione di alcune specie dannose o invasive, attraverso lo sviluppo di esche feromoniche specie-specifiche. Queste esche sono utilizzate in vari modi: per catture-campione di monitoraggio delle aree agricole, valutando la quantità di insetti dannosi presenti; per la cattura massiva degli organismi invasivi, riducendo e se possibile eliminando la popolazione; per ridurre l'accoppiamento, e questo si ottiene principalmente in due modi: con la tecnica del "disorientamento", rilasciando una nube di feromone sintetico, inducendo una sorta di saturazione del messaggio, che porta i maschi a non cercare più le femmine in fase di richiamo (Miller *et al.*, 2006), o con la "distrazione sessuale" che consiste nel rilasciare, attraverso femmine sintetiche posizionate nel campo,



quantità di feromone di poco superiori a quelle emesse dalle femmine in periodo riproduttivo, inducendo i maschi a seguire false scie odorose, ignorando le femmine (Maini, 2007). Anche nei Crostacei i feromoni sono studiati da diversi anni, anche se la loro composizione chimica non è stata ancora determinata. Come in molti altri gruppi, anche in questi animali è stato osservato che i feromoni sono utilizzati dalle femmine sessualmente mature per attrarre i maschi (Stebbing *et al.* 2003) tanto che essi, stimolati da queste sostanze, mostrano moduli comportamentali riproduttivi anche in assenza della femmina (Gleeson *et al.*, 1987). Queste sostanze, nei Decapodi, vengono rilasciate con l'urina e vengono prodotte nelle ghiandole a rosetta associate alla ghiandola verde in Crostacei Decapodi (da Bushmann e Atema, 1996).



**Fig.13.** Foto dei nefropori di *P. clarkii* e schema delle ghiandole a rosetta associate alla ghiandola verde in Crostacei Decapodi (da Bushmann e Atema, 1996).

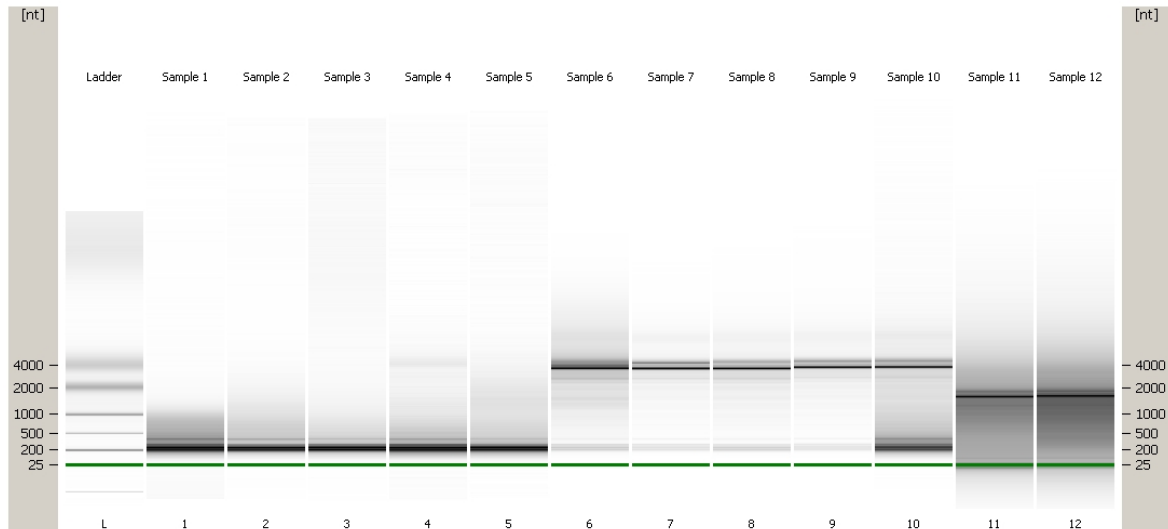
In questi test si è osservato che i maschi sono ugualmente attratti sia da femmine sessualmente mature, sia da elementi estranei trattati con l'urina delle stesse femmine, come spugne, pietre, e persino altri maschi (Ekerholm and Hallberg, 2005). In ogni caso è stato dimostrato che l'urina è rilasciata quasi esclusivamente durante le interazioni sociali (Bergman e Moore, 2005, Breithaupt e Eger, 2002; Schneider *et al.* 2001). È stato anche osservato che il ruolo dei feromoni nelle comunicazioni chimiche tra Crostacei è diverso tra i maschi e le femmine, in quanto le femmine hanno bisogno sia di stimoli chimici che fisici per ridurre l'aggressività nei confronti dei maschi, mentre ai maschi basta solo percepire che la femmina è ricettiva tramite stimoli chimici (Aquiloni *et al.*, 2009). Sia i maschi che le femmine manifestano un atteggiamento di sottomissione se è presente "l'odore" di individui della stessa specie ma di sesso opposto (Ameyaw-akumfi e Hazlett, 1975; Dunham e Oh, 1992); invece "l'odore" proveniente da un individuo dello stesso sesso ha



come risultato il mantenimento della postura aggressiva. Altri esperimenti hanno dimostrato che i maschi risultano responsivi a queste molecole durante la stagione riproduttiva e che questa periodicità nella ricettività potrebbe essere sotto controllo ormonale (Gleeson *et al.*, 1984). Oltre alla specie-specificità le esche feromonalmente avrebbero il vantaggio di catturare selettivamente maschi più giovani con numerose stagioni riproduttive ancora davanti (Stebbing *et al.*, 2003; Aquiloni e Gherardi, 2010). Vista l'impossibilità di reperire in letteratura la metodica per isolare i feromoni sessuali di Decapodi, non essendoci a tutt'oggi nemmeno un feromone sessuale caratterizzato, dopo consultazione con esperti internazionali (Jelle Atema, Boston University) si è deciso di partire dai peptidi sintetizzati dalle ghiandole a rosetta associate alla vescica urinaria. A partire dall'RNA messaggero presente nei tessuti di femmine di *P. clarkii* in fase riproduttiva e altamente ricettive si è costruita una libreria fagica di espressione che ha i seguenti vantaggi: 1- produrre fagi che espongono sulla superficie i peptidi codificati dalle sequenze di partenza; 2- contenere al loro interno il materiale genetico codificante per il peptide di interesse. Con questa metodica è possibile sintetizzare in laboratorio gli stessi peptidi prodotti dalle femmine sessualmente mature, isolare quelle di interesse e, infine, sintetizzare queste molecole in grande quantità per l'allestimento di esche feromonalmente specie-specifiche. "I metodi di controllo dovrebbero essere accettabili da un punto di vista sociale, culturale ed etico; efficienti; non inquinanti; non dovrebbero avere effetti sulla flora/fauna locale e sulla salute e sul benessere degli uomini, degli animali domestici e delle coltivazioni" (Stebbing *et al.*, 2003) e il sistema di esche specie-specifiche a feromoni li rispetterebbe tutti. Inoltre questa nuova metodologia potrebbe ridurre drasticamente gli sforzi impiegati per il contenimento delle specie invasive e consentire di abbattere i costi di gestione, che attualmente sono altissimi.

### **Creazione di una libreria di espressione in phage-display**

Per la creazione della libreria siamo partiti da tessuti di femmine di *P. clarkii* in periodo riproduttivo (testate attraverso esperimenti comportamentali dall'Università di Firenze). Da 12 esemplari, anestetizzati in ghiaccio, sono state estratte le ghiandole a rosetta, associate alla ghiandola verde e al nefroporo, sede di produzione dei feromoni (Breithaupt *et al.*, 1999). I tessuti, mantenuti in Trizol, sono stati omogeneizzati con un Dremel 300 e l'RNA totale è stato estratto con il RNeasy lysis buffer e purificato con fenolo/cloroformio. 1  $\mu$ L di ogni campione sono stati analizzati con il Bioanalyzer (Agilent) ed è emerso che 4 campioni risultavano di qualità nettamente superiore rispetto agli altri (campioni 6, 7, 8, 9 - Fig. 14).

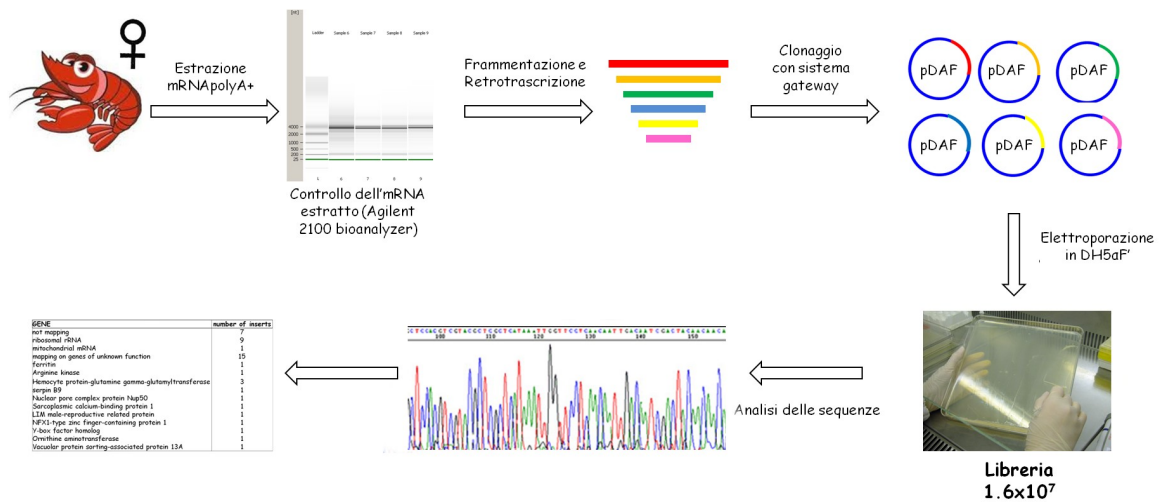


**Fig. 14.** Analisi mediante Bioanalyzer dei 12 campioni di RNA totale estratto da ghiandole a rosetta di femmine di *P. clarkii* in fase riproduttiva.

Essi sono stati quantificati con il Qubit e riuniti in 2 pool: il pool n.1 comprendente i campioni 6 e 7 (le femmine presentavano gastroliti, indice di muta imminente) e il pool n.2 comprendente i campioni 8 e 9.

	campione	ng/μL	Totale su 100 μL
Pool 1	6	5376	537
	7	2120	212
Pool 2	8	1523	152
	9	1310	131

Si è deciso di costruire la libreria utilizzando i campioni del pool n.2 considerati più adeguati per l'individuazione di possibili feromoni. Dall'RNA totale è stato estratto l'RNA messaggero con il kit Dynabeads direct kit. Dopo la quantificazione con Qubit è emerso che vi erano a disposizione 344 ng per la costruzione della libreria (Fig. 15).



**Fig. 15.** Schema della costruzione della libreria di feromoni sessuali di *P. clarkii*.

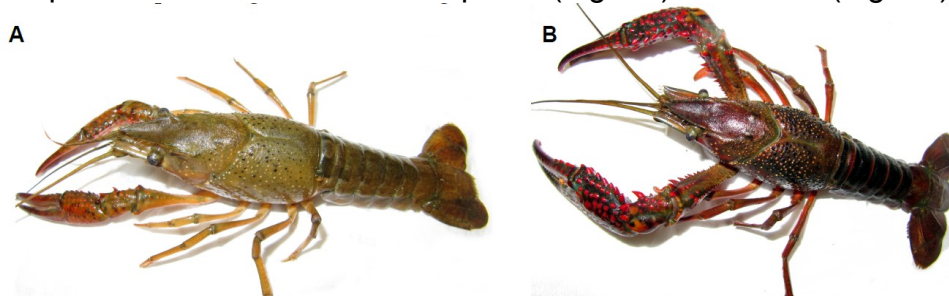
Circa 50 ng di RNA messaggero sono stati frammentati al calore, al fine di ottenere frammenti in grado di codificare piccoli peptidi (250-500bp). I frammenti così ottenuti sono stati retrotrascritti, amplificati e successivamente clonati, prima nel vettore pDONR221 e successivamente nel vettore pDAF, in accordo con il sistema di clonaggio proposto dal metodo gateway. Dopo elettroporazione in cellule elettro-competenti DH5 $\alpha$ F' è stata ottenuta una libreria di  $1.6 \times 10^7$  cloni. Per verificare la qualità della libreria, abbiamo sequenziato alcuni cloni scelti casualmente. L'analisi delle sequenze ha evidenziato che tutti i cloni contengono cDNA di *P. clarkii* e che la libreria non risulta contaminata da DNA estraneo (Fig. 16).

GENE	number of inserts
not mapping	7
ribosomal rRNA	9
mitochondrial mRNA	1
mapping on genes of unknown function	15
ferritin	1
Arginine kinase	1
Hemocyte protein-glutamine gamma-glutamyltransferase	3
serpin B9	1
Nuclear pore complex protein Nup50	1
Sarcoplasmic calcium-binding protein 1	1
LIM male-reproductive related protein	1
NFX1-type zinc finger-containing protein 1	1
Y-box factor homolog	1
Ornithine aminotransferase	1
Vacuolar protein sorting-associated protein 13A	1

**Fig. 16.** Sequenze analizzate per similarità attraverso BlastN contro il Db annotato mediante BlastP contro SwissProt.

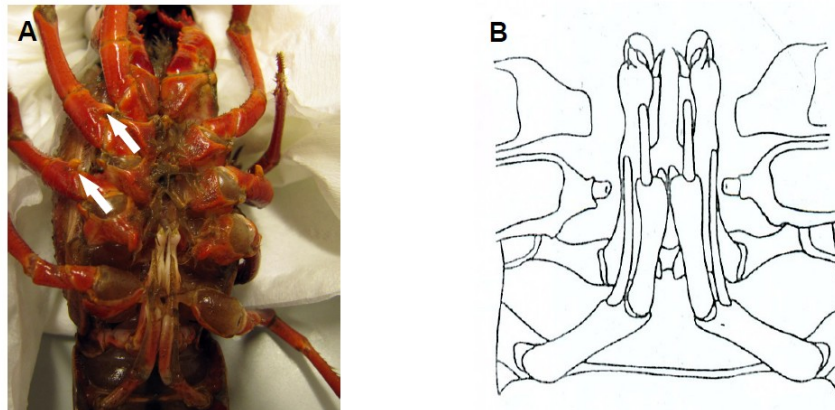
#### Selezione della libreria su antennule di esemplari maschi di *P. clarkii*

Le selezioni sono state condotte su antennule di esemplari maschi di *P. clarkii* in fase riproduttiva ovvero con morfotipo F1 (Fig. 17) e stadio E (Fig. 18).



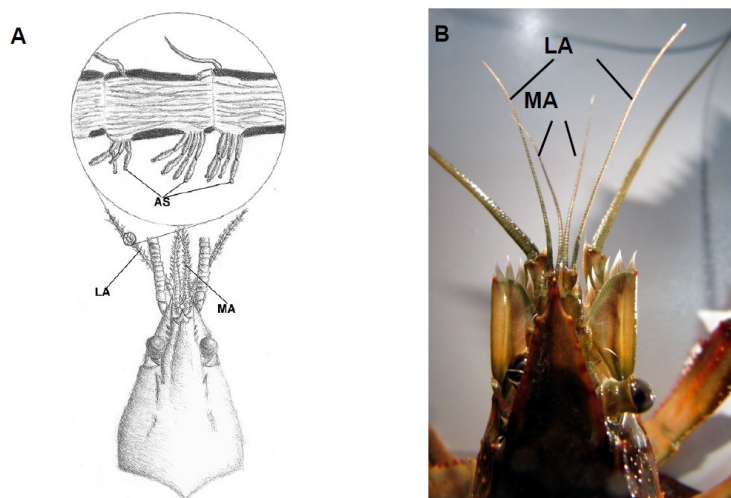
**Fig. 17.** Morfotipi F2 non riproduttivo (A) e F1 riproduttivo (B) di maschi adulti di *P. clarkii*.

Sono state scelte le antennule in quanto sede dei recettori per i feromoni sessuali (Carr *et al.*, 1987). Nei Crostacei Decapodi le antennule sono l'organo olfattivo che ha un ruolo chiave nella ricerca di cibo, nel comportamento legato all'accoppiamento e nelle interazioni sociali. L'antennula bifida è composta da un flagello mediale e da uno laterale (Montecclaro *et al.*, 2010).



**Fig. 18.** **A-** visione ventrale di un maschio in stadio E con secondo e terzo paio di pereopodi che presentano le caratteristiche spine (freccie). **B-** disegno schematico (da Taketomi *et al.*, 1996) del petasma (gonopodio) di un maschio allo stadio E.

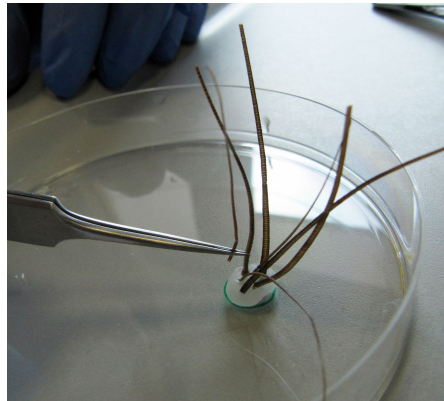
Il flagello laterale che porta i chemorecettori (estetaschi, Fig. 19), viene usato per la ricerca di cibo (Laverack, 1988, Atema 1995; Giri e Dunham, 1999; Steullet *et al.*, 2001; Steullet *et al.*, 2002), per captare i feromoni sessuali (Ameyaw-akumfi e Hazlett, 1975; Gleeson, 1982; Kamio *et al.*, 2005) e le molecole di comunicazione sociale. In particolare in *P. clarkii* il flagello laterale delle antennule presenta, sulla superficie ventrale, sia setole che estetaschi. Esperimenti comportamentali hanno dimostrato che il flagello laterale media la percezione degli odori di cibo (Giri e Dunham, 1999) e la discriminazione del sesso (Ameyaw-akumfi e Hazlett, 1975; Dunham e Oh, 1992). Per quanto riguarda il ruolo del flagello mediano non è ancora chiaro, ma esemplari di *P. clarkii* con solo questo flagello (dopo ablazione di quelli laterali) perdono la capacità di localizzare il cibo a grandi distanze (Giri e Dunham, 1999).



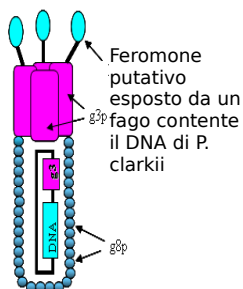


**Fig. 19. A-** Schema rappresentante le antenne laterali (LA), le antenne mediane (MA) e gli estetaschi (AS) (da Corkum e Belanger, 2007). **B-** Visione dorsale della parte cefalica di un maschio di *P. clarkii* con le antenne mediane (MA) e laterali (LA).

Per ogni selezione sono state utilizzati 3 esemplari maschi, anestetizzati in ghiaccio per 45 minuti. Ad ogni esemplare è stata prelevata l'antennula destra tagliata alla base. Le antenne così ottenute sono state inserite in un immunotubo e fissate alla base con paraffina (Fig. 20).

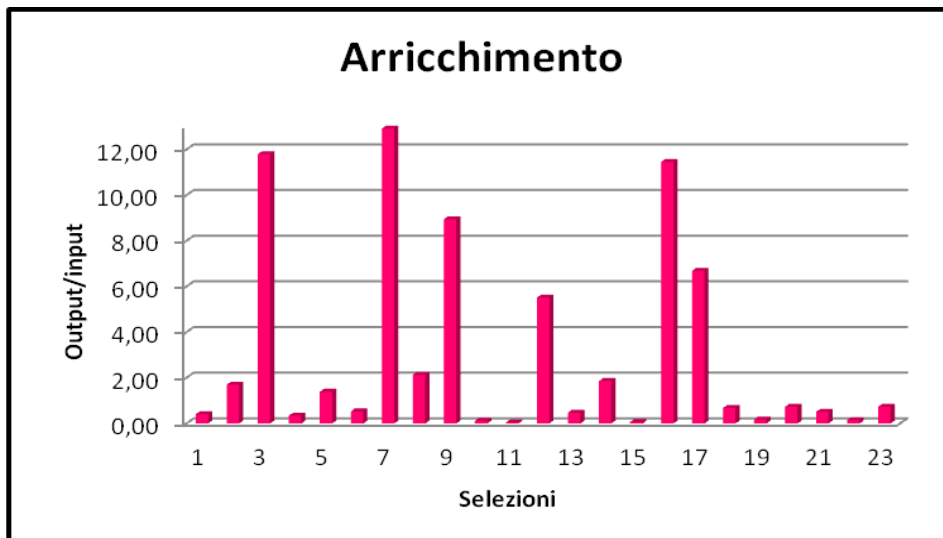


**Fig. 20.** Preparazione delle antenne per la selezione.



I batteriofagi sono dei virus che infettano i batteri trasferendo il proprio genoma all'interno della cellula ospite e facendo in modo che esso venga replicato assieme al genoma batterico. I cloni di cellule infettate possono crescere per lunghi periodi in modo perfettamente normale secernendo fagi nel terreno di coltura. La libreria ottenuta, quindi, è una collezione di fagi ognuno dei quali esprime un peptide (feromone putativo) diverso. I fagi possono essere selezionati attraverso il loro legame specifico con i recettori presenti sulle antenne. Alla fine della selezione, la libreria risulta composta (arricchita) da una

prevalente frazione di fagi che legano i recettori, mentre gli altri fagi vengono eliminati tramite lavaggi sempre più selettivi. Sono state allestite 23 selezioni di cui 21 su antenne, 1 su zampa e 1 su antenna, queste ultime considerate come controlli negativi (Fig. 21).

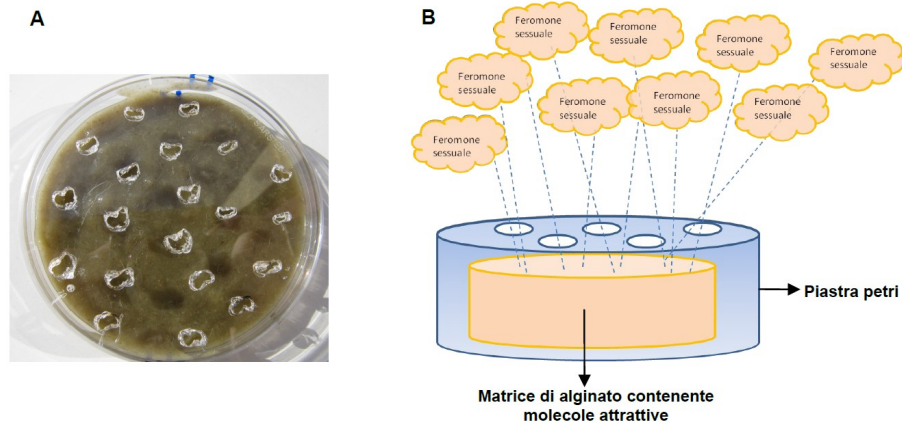


**Fig. 21.** Rappresentazione grafica dell'arricchimento delle selezioni come rapporto tra il numero delle colonie di fagi dopo l'interazione su antennule/zampe/antenne e il numero delle colonie iniziali. Gli istogrammi 1 e 2 si riferiscono ai campioni di controllo.

Le librerie selezionate sono state raccolte e utilizzate per la produzione di fagi specifici che sono stati poi quantificati e liofilizzati. Le 21 selezioni saranno valutate per la loro capacità attrattiva su maschi maturi di *P. clarkii* durante la stagione riproduttiva 2014.

#### **Matrici di alginato per la diffusione lenta delle molecole in acqua**

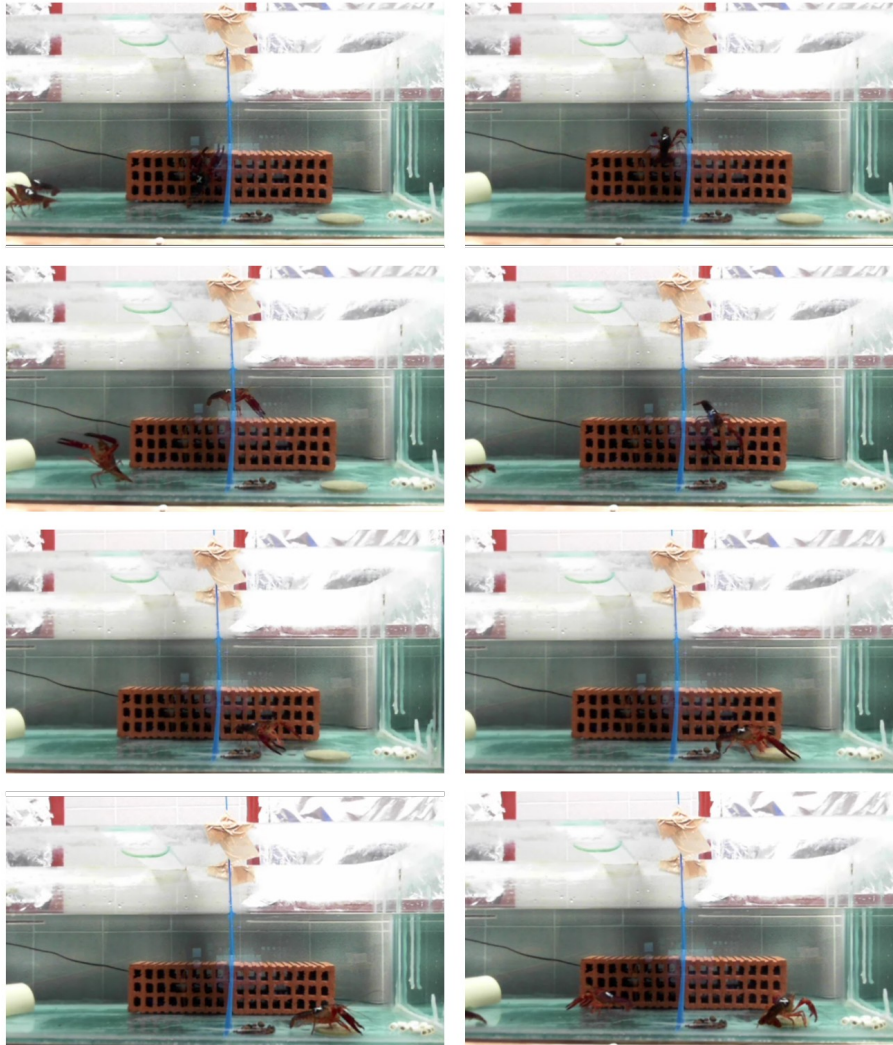
Individuate le molecole attrattive per i maschi è necessario inserirle in una matrice di gel che ne permetta un rilascio graduale per diverse ore in acqua per massimizzare le catture. Si è deciso di usare una matrice di alginato per la sua particolare proprietà di gelificare (Smidsrod e Skjak-Braek, 1990) in presenza di cloruro di calcio. L'alginato risulta molto versatile come sostanza per l'immobilizzazione di tutti i materiali biologicamente attivi, come proteine, acidi nucleici, cellule ed altro, permettendone la protezione e un rilascio controllato (Smidsrod e Skjak-Braek, 1990). La messa a punto dell'esca è avvenuta attraverso differenti formulazioni. Non avendo a disposizione i pool fagici attrattivi è stato usato un omogenato di mangime per la validazione del sistema. La composizione finale dell'esca è alginato al 2%, mangime omogeneizzato in acqua distillata con carbonato di calcio 20 mM e acido gluconico  $\delta$ -lattone 40 mM; la soluzione così composta è colata in una piastra petri di 8,5 cm di diametro (Fig. 22). Sul coperchio della piastra sono praticati dei fori di 4-5 mm in modo tale che, una volta immersa in acqua, possa rilasciare le molecole attrattive. La matrice viene fatta solidificare per 24 ore e successivamente si conserva sigillata a 4°C (Fig. 22).



**Fig. 22. A-** Esca di alginato e mangime completata. **B-** rappresentazione schematica dell'esca.

É stato allestito un acquario (dimensioni 115x40x39 cm) riempito per 2/3 con acqua a 24°C in cui è stato inserito un divisorio di plastica azzurro che presentava un'unica apertura di 9x4 cm ad un'altezza di circa 15 cm dal fondo dell'acquario. Infine per permettere il passaggio dei gamberi, attraverso l'apertura, sono stati posti ai due lati del divisorio due mattoni forati. Per ogni esperimento sono stati usati 5 esemplari maschi, posizionati sul lato destro dell'acquario. Nel lato sinistro sono state poste 3 piastre petri contenenti l'esca di alginato con cibo omogeneizzato 2 esche neutre contenenti sassolini e cilindretti di ceramica. Una volta inseriti esche e gamberi sono state eseguite le riprese attraverso una telecamera ad alta definizione, connessa ad un computer per 4 ore. Sono state eseguite 4 repliche dell'esperimento con gamberi differenti. Tutti i gamberi hanno raggiunto l'esca tra il 4° e il 33° minuto dall'inizio dell'esperimento ignorando totalmente le due esche neutre (Fig. 23). É stato inoltre osservato che se i gamberi uscivano dalla zona con l'esca entro un arco temporale medio di 32 minuti rientravano, attratti nuovamente dal cibo. Viene così confermata la capacità della matrice di alginato di rilasciare molecole attrattive per almeno 4 ore.





**Fig. 23.** Varie fasi di passaggio di un gambero attraverso l'apertura in direzione dell'esca di alginato.

### **Prospettive e conclusioni sull'applicabilità delle esche feromonal**

Le potenzialità di esche specie-specifiche per maschi maturi in stagione riproduttiva sono duplici: impatto minimo sulla flora/fauna locale dovuto esclusivamente al disturbo della collocazione delle trappole e gestione del trappolaggio intensivo molto semplificata perché non viene richiesta la cernita degli animali presenti in nassa, fondamentale invece con le esche trofiche. Nonostante la mancanza di riferimenti bibliografici, è stata usata una tecnica di biologia molecolare che ha permesso di ottenere una libreria contenente milioni di piccoli peptidi a partire dai tessuti responsabili della produzione di feromoni sessuali nelle femmine mature. Questi peptidi sono stati selezionati attraverso il legame specifico con i recettori delle antenne di maschi in fase riproduttiva e le 21 selezioni sono in attesa di essere saggiate per la loro attrattività con esperimenti comportamentali. Questa metodologia permette di isolare nel medesimo tempo la molecola di interesse e l'acido nucleico che la codifica; le molecole di interesse individuate possono perciò essere prodotte in grande quantità. Parallelamente è stata messa a punto una matrice di



alginato che permetterà di inglobare le molecole attrattive per un rilascio graduale e prolungato in acqua per massimizzare la capacità attirante.



### A.2.1.3 Esche ormonali per ridurre la fecondità di *P. clarkii*

#### **Esche ormonali contenenti l'ormone gonado-inibitorio**

Con i risparmi di spesa ottenuti dalle 2 precedenti tecniche si è proceduto alla messa a punto di un'ulteriore tecnica innovativa (non prevista originariamente nel progetto) per il controllo numerico del gambero rosso. Il metodo si basa sulla modalità di controllo ormonale della maturità sessuale nei Crostacei Decapodi. Il principale modulatore negativo in questi animali è l'ormone peptidico gonado-inibitorio (GIH) che anche a concentrazioni circolanti molto basse blocca la maturazione finale degli ovari nelle femmine e dei testicoli nei maschi (Giulianini e Edomi, 2006). Recenti lavori dimostrano come i peptidi possano essere veicolati attraverso l'assunzione orale con opportune protezioni che permettono l'assorbimento di una percentuale biologicamente attiva degli stessi nei fluidi corporei dell'animale trattato. Da qui l'idea di mettere a punto delle esche contenenti l'ormone gonado-inibitorio che rilasciate in natura prima della stagione riproduttiva possano diminuire la fecondità delle popolazioni di gambero rosso.

#### **Matrici per la somministrazione orale dell'ormone gonado-inibitorio**

Come veicolo per la somministrazione orale dell'ormone gonado inibitorio-GIH attraverso il cibo si è pensato di utilizzare il chitosano e l'alginato in quanto non sono tossici e sono biodegradabili (Onishi e Machida, 1999; Rao e Sharma, 1997; Aspden *et al.*, 1997). Il chitosano è un polisaccaride lineare ottenuto dalla de-acetilazione della chitina, uno dei polimeri più abbondanti presenti in natura, presente nell'esoscheletro di Insetti e Crostacei. I carapaci di questi organismi sono la principale fonte da cui viene estratta la chitina commerciale (10.000 tonnellate annue) (Varum, 1991). Il chitosano ha particolari proprietà chimiche, essendo un policatione, e biologiche, essendo biocompatibile e biodegradabile. Queste proprietà permettono il suo utilizzo in molti campi come quello agroalimentare, nella cosmetica, nell'industria tessile, nella ricerca farmaceutica per lo sviluppo di *beads* e nanoparticelle per il *drug delivery*, ovvero il rilascio controllato dei farmaci, e nei materiali biomedici per lo sviluppo della pelle artificiale e dei bendaggi per la guarigione delle ferite (Dodane e Vilivalam, 1998). Gli alginati sono polissacaridi estratti dalle alghe marine brune (es. *Laminaria hyperbore* 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'alginato per la sua particolare proprietà di gelificare (Smidsrod 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 (*beads*, Fig. 24).



**Fig. 24.** Sfere ottenute gocciolando l'alginate in cloruro di calcio.

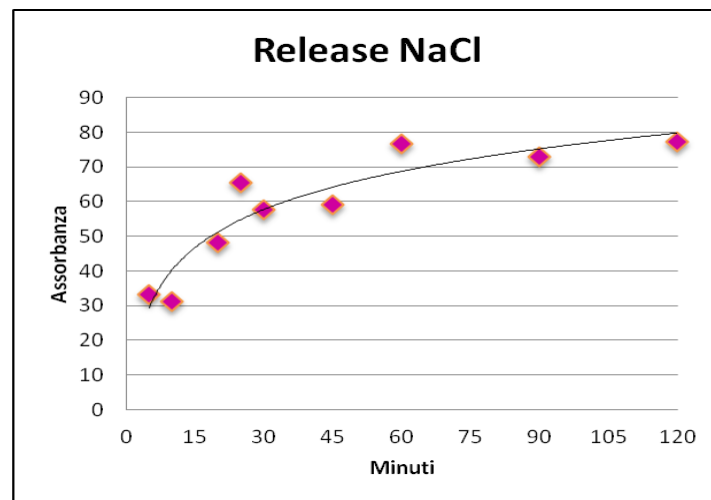
L'alginate risulta molto versatile come sostanza per l'immobilizzazione di tutti i materiali biologicamente attivi, come proteine, acidi nucleici, cellule ed altro, permettendone la protezione e un rilascio controllato (Smidsrod e Skjak-Braek, 1990). Queste *beads* hanno inoltre una consistenza sufficiente per consentire di includervi molecole di varie dimensioni (Marsich *et al.*, 2008). Questo sistema di incapsulazione è già stato utilizzato con successo in pesci e Crostacei Peneidi per somministrare antigeni e DNA per via orale (Romalde *et al.*, 2004; Rajeshkumar *et al.*, 2009; Khimmakthong *et al.*, 2013). Nella prima fase è stato utilizzato un sistema modello costituito da *beads* di alginate contenenti insulina umana, molto simile per peso e punto isoelettrico al GIH. Successivamente le prove sono state effettuate con l'ormone iperglicemizzante dei Crostacei (cHH), invece che con il GIH, in quanto il saggio biologico è estremamente semplice poiché basta rilevare un aumento della glicemia nell'emolinfa per verificarne l'assorbimento.

### **Preparazione dell'esca per veicolare il GIH**

La capacità delle *beads* di alginate di inglobare i peptidi è stata verificata con l'utilizzo di un ormone commerciale con caratteristiche simili (peso molecolare e punto isoelettrico) a quelle del GIH: l'insulina ricombinante umana. Una quantità nota di *beads* (1 g), dopo la preparazione per gocciolamento in cloruro di calcio (50 mM) per mezzo di una siringa (con ago di diametro di 0,5 mm), sono state lavate con acqua deionizzata e mescolate a un volume noto (5 mL) di una soluzione di sodio citrato (0,1 M). È risultata un'efficienza di incapsulazione del 66% e un *loading* (quantità di insulina) dello 0,064% per massa di formulazione, che è un buon valore. Sono stati condotti successivamente delle prove di rilascio per valutare, in condizioni di pH controllato, la cessione di insulina con il procedere del tempo. 300 mg di *beads* sono state lasciate in 5 mL di un buffer salino e a tempi stabiliti (5'-10'-15'-20'-25'-30'-45'-60'-90'-120'), sono stati prelevati 100  $\mu$ L della soluzione con il contemporaneo ripristino del volume iniziale con 100  $\mu$ L di soluzione salina fresca. La soluzione salina usata mima i fluidi interstiziali dei gamberi a diversi pH (5-7-8) (Tab.1). Questo per valutare se il pH influisce sull'efficienza dell'alginate come sistema di incapsulamento (Coccia *et al.*, 2011).

	Buffer	Molarità
Soluzione fisiologica	NaCl (cloruro di sodio)	0.15M
pH 5	AcOH-AcONa (tampone acetato)	0.25M
pH 7	Tris-HCl	0.5M
pH 8	Tris-HCl	0.5M

**Tab. 1.** Soluzioni saline utilizzate per le prove di rilascio di insulina da parte delle beads di alginato.



**Fig. 25.** Rilascio di insulina dalle *beads* di alginato in soluzione fisiologica.

Si è registrato che la quantità di insulina rilasciata dalle *beads* di alginato raggiunge dopo 30 minuti il 55% dell'insulina totale indipendentemente dalle soluzioni saline usate. La velocità di rilascio registrata è eccessiva, considerando il fatto che le esche verrebbero impiegate in natura dove potrebbero rimanere anche ore prima di essere ingerite. Si è deciso quindi di associare all'alginato il chitosano per migliorare l'efficienza di incapsulazione e per ridurre il rilascio dell'ormone peptidico in acqua. Le sfere, in questo caso, sono state prodotte facendo gocciolare l'alginato nella soluzione gelificante, costituita da cloruro di calcio (50 mM) e chitosano (0.3% p/V in tampone acetato 0.25 M). La valutazione del rilascio è stata eseguita mescolando 1 g di *beads* in 5 mL di una soluzione sodio citrato (0,1 M): ne risulta un'efficienza di incapsulazione vicina al 100% e un *loading* dello 0,019% per massa di formulazione (Tab.2), decisamente superiore rispetto a quello delle sfere con solo alginato.

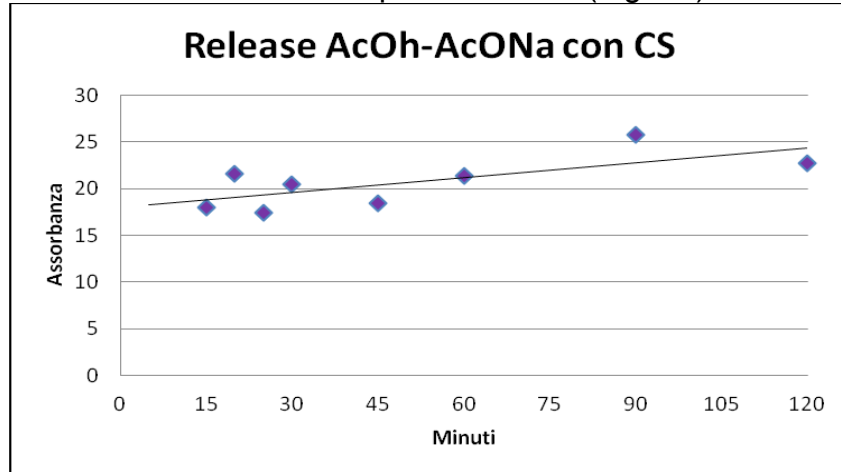
Alginato+Insulina	EE (efficienza)	66%
	<i>loading</i>	0,064
Alginato+Chitosano+Insulina	EE (efficienza)	Circa 100%
	<i>loading</i>	0,019

**Tab. 2** Confronto delle efficienze di incapsulazione e del *loading* tra le sfere con solo alginato e quelle con alginato e chitosano.

Inoltre sono stati ripetuti tutti i test di rilascio sia nella soluzione fisiologica che ai diversi pH (5-7-8); anche in questo caso c'è un miglioramento evidente in



quanto l'insulina viene rilasciata in quantità minori (Fig. 26).

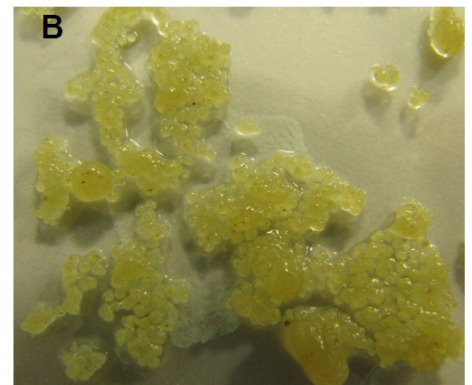


**Fig. 26.** Rilascio di insulina dalle *beads* di alginato/chitosano in soluzione fisiologica.

La quantità massima di insulina rilasciata dalle sfere di alginato rivestite con il chitosano nei vari tamponi non supera il 25% dopo le 2 ore, valori decisamente inferiori rispetto alle *beads* prive di chitosano.

#### Ottimizzazione delle esche

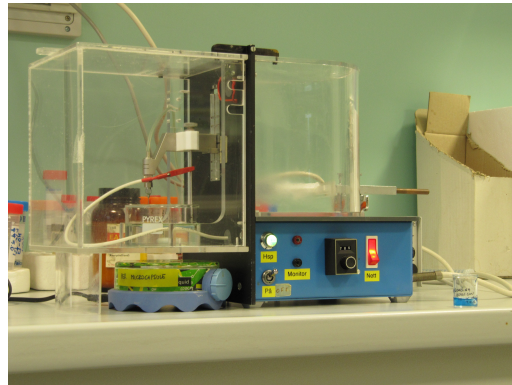
Per rendere appetibili le sfere di alginato/chitosano contenenti gli ormoni, esse sono state mescolate con varie sostanze-esca. Abbiamo preparato esche contenenti sia mangime specifico omogeneizzato (Fig. 26A) che fegato bovino omogeneizzato (Fig. 26B) per valutare quale dei due tipi fosse effettivamente più appetibile per i gamberi.



**Fig. 26. A-** sfere di alginato mescolate a fegato di bue omogeneizzato. **B-** sfere di alginato mescolate a mangime per gamberi omogeneizzato.

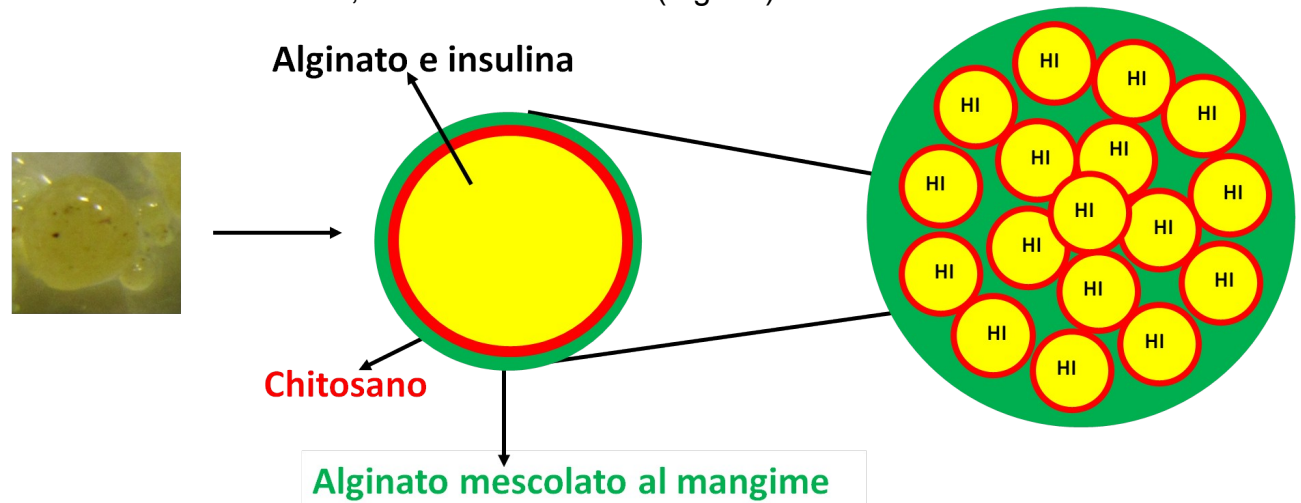
Entrambe le formulazioni vengono mangiate, tuttavia abbiamo scelto di utilizzare il mangime omogeneizzato, in quanto è un prodotto commerciale di facile reperibilità, e facilita l'affondamento delle esche, fattore importante in quanto i gamberi si nutrono solo sul fondale. I gamberi tendono a frammentare le *beads* e, di conseguenza, si è deciso di realizzare delle formulazioni di dimensioni ridotte (microsfere) che possano essere ingerite intere per evitare ulteriore perdita di peptidi nell'acqua. Le microsfere sono

state preparate con un generatore elettrostatico di *beads* (Strand *et al.*, 2002; Fig. 27).



**Fig. 27.** Generatore elettrostatico di microsfere di alginato.

Le microsfere così ottenute vengono lasciate in agitazione, nella soluzione gelificante, per 10 minuti e poi lavate con acqua deionizzata; a questo punto sono poi riunite in gruppi (circa 30 microsfere) che sono a loro volta inclusi in una nuova matrice di alginato (2%), ottenuta per gelificazione *in situ*, in presenza di GDL, carbonato di calcio e mangime omogenizzato in acqua: tale matrice crea una seconda capsula che aumenta la protezione dell'ormone. Così strutturata, la matrice di alginato può attraversare lo stomaco, mantenendo al suo interno le molecole di ormone microincapsulato, per poi sciogliersi nell'intestino medio, rilasciando le sostanze inglobate. La struttura finale delle *beads* sarà quindi caratterizzata da una capsula esterna che include tante microsfere, contenenti l'ormone (Fig. 28).

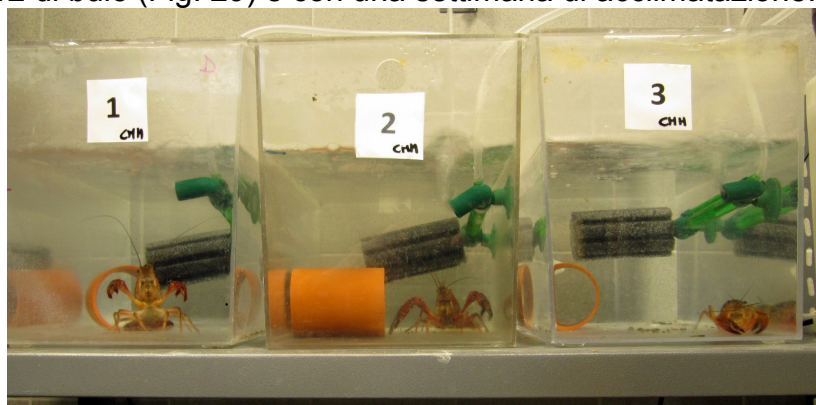


**Fig. 28.** Rappresentazione schematica dell'esca ormonale nella sua formulazione finale.

### Esperimenti per verificare la funzionalità della somministrazione orale di ormoni peptidici

Gli esperimenti sono stati condotti su esemplari maschi di *P. clarkii* provenienti dal canale Brancoletto (Lido di Staranzano, Friuli Venezia Giulia) catturati con l'ausilio di nasse. I gamberi sono stati mantenuti singolarmente in vasche 20x38x25 cm con aerazione continuata a 22°C, con un fotoperiodo di 12 ore

di luce e 12 di buio (Fig. 29) e con una settimana di acclimatazione.



**Fig. 29.** Alcuni gamberi usati per la somministrazione orale di ormoni.

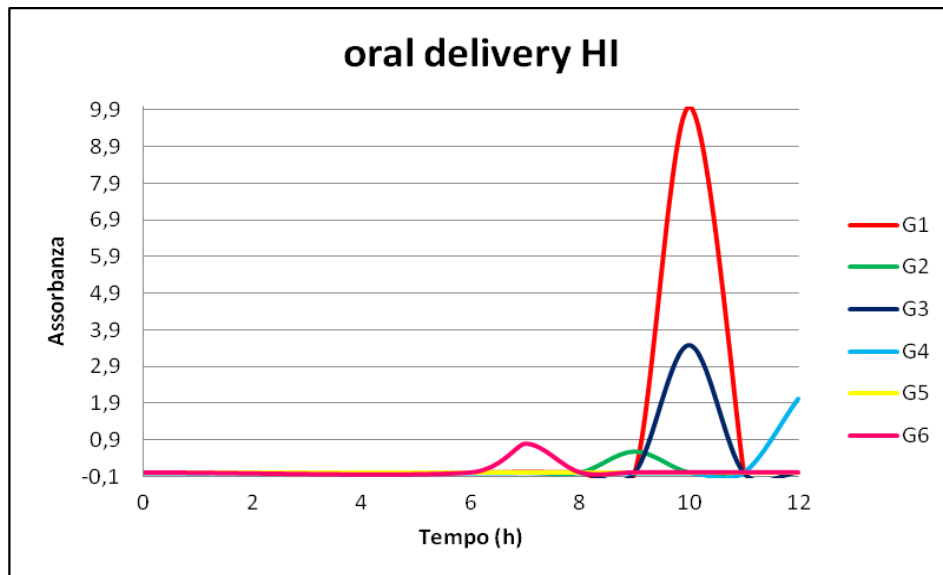
Sono stati utilizzati 6 gamberi, ed ad ognuno sono state somministrate 5 capsule contenenti l'insulina umana: tale molecola esogena non viene prodotta dai Crostacei e la sua presenza in circolo è indice di assorbimento mediante alimentazione. Considerando che la digestione dei gamberi avviene in circa 5 ore, si è deciso di iniziare a prelevare l'emolinfa (Fig. 30) dalla sesta fino alla dodicesima ora dopo la somministrazione, ogni ora.



**Fig.30.** Prelievo dell'emolinfa.

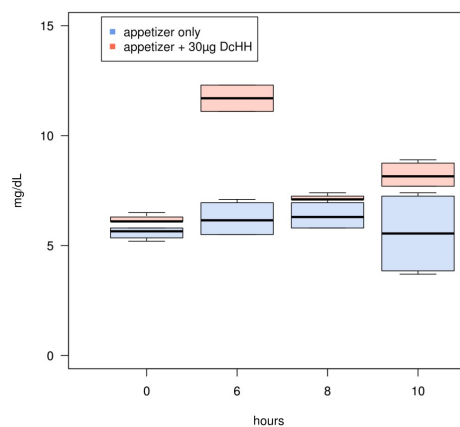
La quantità di insulina assorbita attraverso il canale digerente è stata quantificata mediante il kit Human Insulin ELISA (Life Technology). Dall'analisi è emerso che in 5 gamberi su 6 è presente insulina nell'emolinfa dopo il pasto di esche contenenti questo ormone, il picco di presenza varia nei gamberi sia per quantità che per tempo (Fig. 31).





**Fig. 31.** Presenza di insulina nell'emolinfa dei gamberi nutriti con esche ormonali. Il tempo 0 indica il momento della somministrazione delle esche.

Dimostrata la funzionalità della somministrazione di peptidi mediante esche ormonali abbiamo saggiato la possibilità di somministrare l'ormone iperglicemizzante dei Crostacei (cHH), che appartiene alla stessa famiglia del GIH. Questo ormone è stato scelto poiché il saggio per la determinazione della sua attività biologica è veloce e standardizzato rispetto a quello per il GIH. Nello specifico, per valutare la presenza di quantità bioattive di questo ormone nell'emolinfa è sufficiente misurare i valori di glicemia, che aumentano grazie alla sua funzione iperglicemizzante. Sono stati utilizzati 10 gamberi ependucolati bilateramente (per eliminare la fonte endogena di cHH), suddivisi in 3 gruppi. Al primo gruppo di 4 animali sono state somministrate un totale di 3 esche contenenti 30  $\mu\text{g}$  di cHH sintetico per animale, al secondo gruppo di 4 gamberi 3 esche senza l'ormone e a 2 animali l'ormone è stato iniettato per validare la funzionalità dell'ormone di sintesi. Considerando i tempi di digestione dei gamberi si è deciso di iniziare i prelievi di emolinfa (150  $\mu\text{L}$ ) alla sesta ora: quelli successivi sono stati eseguiti ogni due ore fino alla ventiduesima (Fig. 32).



**Fig. 32.** Andamento temporale della glicemia degli animali nutriti con esche

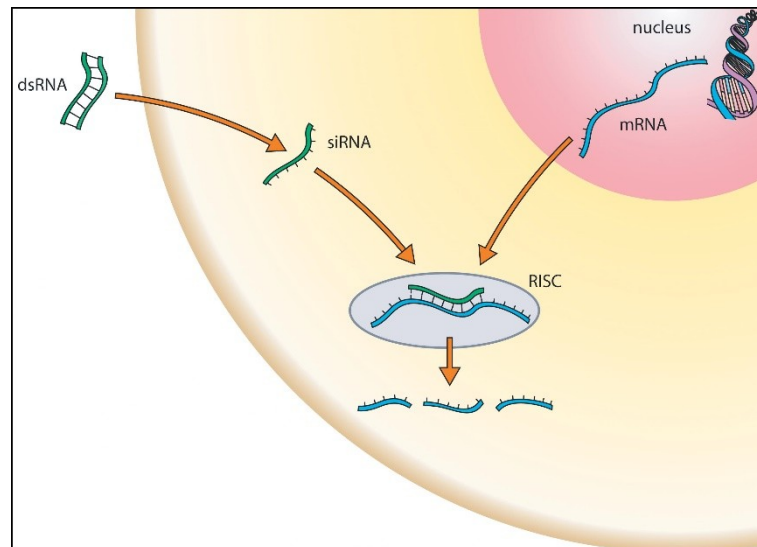


contenenti cHH (rosa) e animali nutriti con le stesse esche ma senza l'ormone (azzurro) nelle prime 10 ore dopo la somministrazione.

Alla 6<sup>a</sup> ora dopo la somministrazione gli animali nutriti con esche ormonali presentavano una glicemia di  $11.7 \pm 0.35$  mg/dL statisticamente più alta rispetto agli animali nutriti con le esche senza l'ormone ( $6.22 \pm 0.42$  mg/dL) (Wilcoxon rank sum test, p-value = 0.02747 ). Viene così dimostrata la funzionalità del sistema delle *beads* di alginato/chitosano per la somministrazione orale di ormoni peptidici specie-specifici in Crostacei Decapodi.

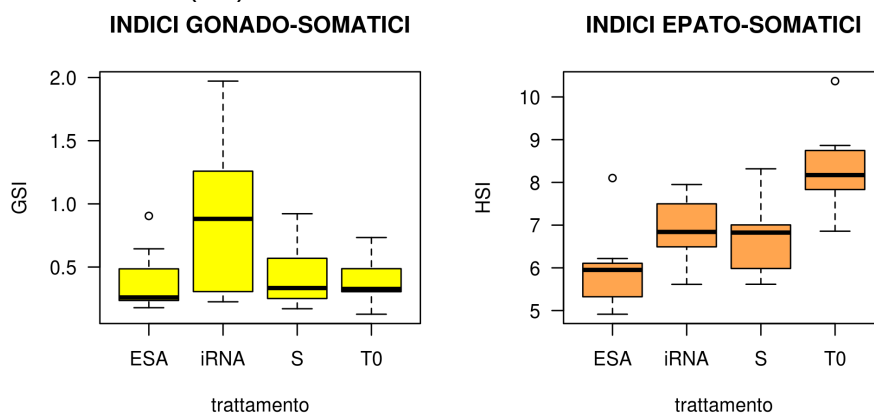
### **Dimostrazione del ruolo dell'ormone gonado-inibitorio in *P. clarkii* mediante iRNA**

Il Gonad (o Vitellogenesis) Inhibiting Hormone (GIH/VIH) è il principale modulatore negativo della crescita ovarica nei Crostacei Decapodi (Edomi *et al.*, 2002), esso fa parte della superfamiglia del cHH (Crustacean Hyperglycemic Hormone). La famiglia del cHH è suddivisa in due subfamiglie sulla base delle loro differenze nella struttura primaria: tipo I che comprende il cHH propriamente detto e il tipo II che comprende il molt-inhibiting hormone (MIH), il mandibular organ inhibiting hormone (MOIH) e il vitellogenesis/gonad-inhibiting hormone (VIH/GIH). Ad oggi il GIH è stato caratterizzato in *Homarus americanus* (De Kleijn *et al.*, 1994), *Homarus gammarus* (Ollivaux *et al.*, 2006), *Nephrops norvegicus* (Edomi *et al.*, 2002), and *Peneus monodon* (Treerattrakool *et al.*, 2008). Il recente utilizzo del RNA interference (RNAi) ha rivoluzionato i test funzionali per i geni di recente scoperta (Dorsett e Tuschi, 2004) applicati su un certo numero di specie di Decapodi (Ventura *et al.*, 2012; Shechter *et al.*, 2008; Meja-Ruiz *et al.*, 2011; Pamuru *et al.*, 2012). Per validare il ruolo inibitorio del GIH sulle gonadi di *P. clarkii* si è proceduto al silenziamento di questo ormone mediante l'iniezione di RNA a doppio filamento (dsRNA) codificante per una porzione del GIH. Tale tecnica, denominata con il termine anglosassone RNA interference (RNAi), si basa su un meccanismo presente in tutti gli organismi viventi, mediante il quale l'espressione genica viene silenziata ad opera di un complesso denominato RISC (Fig. 33). Questo complesso multiproteico è in grado di legare alla propria regione proteica un filamento di RNA (detto *guida*) e di ricercare all'interno della cellula il filamento complementare che viene successivamente degradato. In questo specifico caso sono stati iniettati negli animali doppi filamenti di RNA codificanti per la porzione terminale del GIH facendo quindi sì che i complessi RISC presenti nelle cellule di *P. clarkii* andassero a riconoscere e a degradare gli RNA messaggeri codificanti solo ed esclusivamente per il GIH.



**Fig. 33.** Schema di interferenza di un RNA messaggero (mRNA) mediante somministrazione esterna di un RNA a doppio filamento (dsRNA) (da: [http://it.wikipedia.org/wiki/RNA\\_interference](http://it.wikipedia.org/wiki/RNA_interference)).

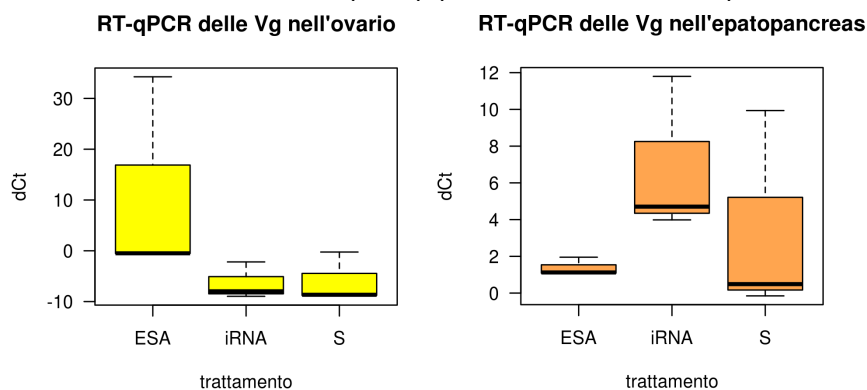
Questa metodica offre il vantaggio di poter osservare in vivo gli effetti del silenziamento di uno specifico trascritto, all'interno di un determinato arco temporale, senza dover sacrificare l'animale e ripristinando poi al termine delle iniezioni la situazione fisiologica iniziale. Al contempo è possibile valutare l'espressione genica di molecole direttamente o indirettamente associate al GIH, al fine di poter studiare anche i pattern molecolari coinvolti nella regolazione e nell'attività di questo neuropeptide. Per validare il ruolo inibitorio del GIH sulle gonadi di *P. clarkii* si è proceduto al silenziamento di questo ormone mediante iniezione di 20 µg/animale di dsRNA, codificante per la regione C -terminale del GIH. Gli animali sperimentali sono stati trattati per 14 giorni con iniezioni a giorni alterni (n=9), un gruppo di controllo è stato iniettato con tampone sterile isotonic (n=8), un terzo gruppo è stato epeduncolato bilateralmente per eliminare la fonte endogena di GIH (n=7). Inoltre, 11 animali sono stati sacrificati all'inizio dell'esperimento per valutare lo stadio di maturità (T0).



**Fig. 34.** Indici Gonado- ed Epato-somatici rilevati nei gruppi sperimentali. ESA: gruppo epeduncolato; iRNA: gruppo iniettato con dsRNA; S: gruppo di

controllo; T0: gruppo valutato all'inizio dell'esperimento.

L'espressione del GIH peduncolare è silenziata, come dimostrato da analisi mediante RT-qPCR. Dopo il trattamento gli animali iniettati con dsRNA presentano un valore medio di indice gonado-somatico (GSI) di  $0.89 \pm 0.19$ , il gruppo di controllo un GSI di  $0.42 \pm 0.09$  e gli animali epeduncolati un GSI di  $0.40 \pm 0.10$ . All'inizio dell'esperimento gli esemplari avevano un GSI di  $0.39 \pm 0.05$  (Fig. 34). L'analisi statistica non ha evidenziato differenze significative tra i GSI dei diversi gruppi a fine trattamento rispetto ai valori iniziali, ma il gruppo trattato con dsRNA presenta una tendenza alla significatività nel confronto con gli animali all'inizio dell'esperimento ( $p=0.11$ ) e 1/3 degli animali ha valori di GSI  $>1.25$ . Inoltre, il T0 mostra valori di GSI molto bassi ( $GSI < 0.4$ ), che rivelano uno stato fisiologico ancora lontano dalla possibilità di avere crescite significative degli ovari. Mediante Real-time PCR quantitativa (qRT-PCR) sono stati valutati i livelli di espressione delle vitellogenine di *P. clarkii*. Queste proteine vengono prodotte nell'epatopancreas e successivamente raggiungono gli ovari attraverso la circolazione emolinfatica. Esse costituiscono i precursori delle componenti proteiche dell'uovo. È stato descritto il ruolo inibitorio del GIH nella vitellogenesi secondaria (maturazione finale degli oociti mediante captazione delle vitellogenine dall'emolinfa), perciò l'espressione delle vitellogenine è stata presa in considerazione come marcatore di attività o inattività ovarica a seguito dell'iniezione di dsRNA-GIH. L'analisi dell'espressione delle vitellogenine evidenzia un ruolo inibitorio del GIH sulla vitellogenesi esogena andando ad influenzare la loro sintesi nell'epatopancreas: il silenziamento provoca un aumento dell'espressione sia rispetto agli animali di controllo che a quelli epeduncolati (Fig. 35). I nostri dati confermano il ruolo inibitorio del GIH sulla maturità ovarica in *P. clarkii* e la potenzialità di questa tecnica già usata nei Crostacei per diminuire il periodo intermuda con il silenziamento dell'ormone inibitorio della muta (MIH) (Pamuru *et al.*, 2012).

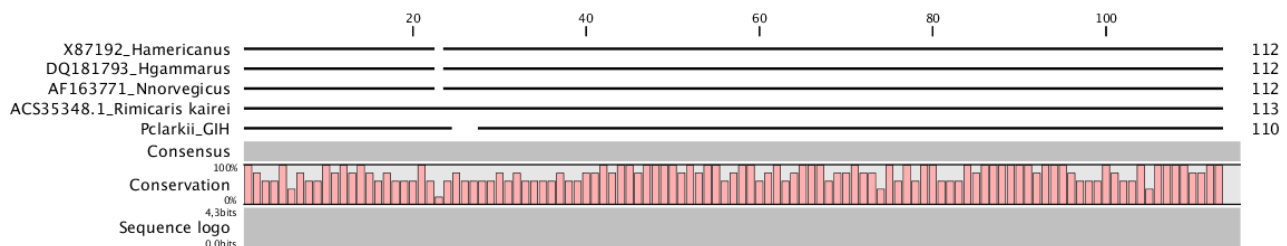


**Fig. 35.** Box plot dei livelli di vitellogenine (Vg) riscontrati nei gruppi sperimentali sia negli ovari che negli epatopancreas. ESA: gruppo epeduncolato; iRNA: gruppo iniettato con dsRNA e S: gruppo di controllo

### Caratterizzazione del GIH di *P. clarkii*

La caratterizzazione di questo neuropeptide ha presentato alcune difficoltà primariamente per la scarsità dei dati in letteratura in quanto, fino ad oggi,

solo 4 GIH sono stati caratterizzati nei Decapodi: quello di *Homarus americanus* (De Kleijn 1994), di *Nephrops norvegicus* (Edomi, 2002), di *Homarus gammarus* (Ollivaux *et al.*, 2006) e di *Panaeus monodon* (Treerattrakool *et al.*, 2008). Inoltre, l'azione del GIH si esplica a basse concentrazioni per cui risulta molto complicato rilevarne la presenza a livello di trascritto come RNA messaggero (mRNA). Per questi motivi la caratterizzazione del GIH di *P. clarkii* ha richiesto l'applicazione di molte tecniche complementari. Dapprima abbiamo sequenziato, mediante sequenziamento Illumina (profondità di sequenziamento 2x100bp), tutti gli mRNA ottenuti dai peduncoli oculari di 4 individui, due maschi e due femmine. Dall'informazione ottenuta, solo due sequenze (denominate read nel sequenziamento Illumina) su 87 milioni codificavano per regioni aventi similarità con i GIH finora caratterizzati. Una read apparteneva ad una porzione intermedia verso l'estremità 3' e l'altra corrispondeva all'estremità 5' della sequenza. Sono stati successivamente disegnati primer specifici per poter caratterizzare la sequenza nucleotidica delle regioni sconosciute. Mediante la 3' Race (Rapid Amplification of cDNA Ends) si è proceduto a completare la sequenza in direzione 3', ovvero fino all'estremità poliadenilata. Poi, mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) sono stati completati i punti mancanti tra l'estremità 5' e la sequenza già caratterizzata. La Fig. 36 riporta gli allineamenti tra le sequenze proteiche conosciute dei GIH allineate con il GIH caratterizzato da *P. clarkii*.



**Fig. 36.** Allineamento delle sequenze proteiche dei GIH caratterizzati in organismi appartenenti ai Crostacei Decapodi. Sono presenti inoltre gli identificativi di GenBank per poter risalire alla sequenza del trascritto.

Il pattern di sei cisteine caratterizzanti la superfamiglia del cHH è stato confermato ed è in corso la sintesi del peptide per poter condurre esperimenti di sterilizzazione di *P. clarkii* sia mediante iniezione che attraverso la somministrazione orale di esche contenenti il peptide.

### Sintesi chimica in fase solida di neuro-peptidi peduncolari del gambero rosso della Louisiana

Per la validazione della possibilità di somministrare ormoni peptidi con esche per via orale sono stati sviluppati protocolli per la sintesi del cHH di *P. clarkii*. Questo ormone è prodotto in diverse isoforme e l'isoforma con maggiore attività iperglicemizzante presenta una modificazione post-traduzionale con il terzo residuo aminoacidico di fenilalanina in configurazione D al posto della normale configurazione L (Mosco *et al.*, 2012). Sono state sviluppate strategie



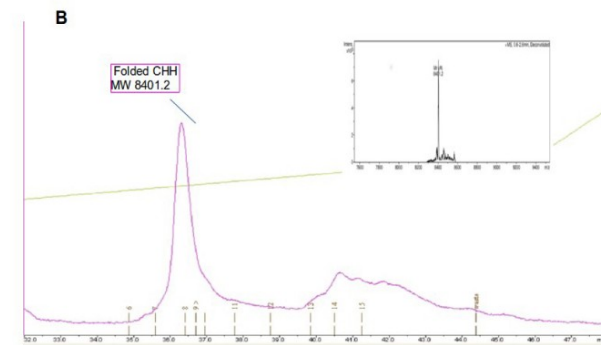
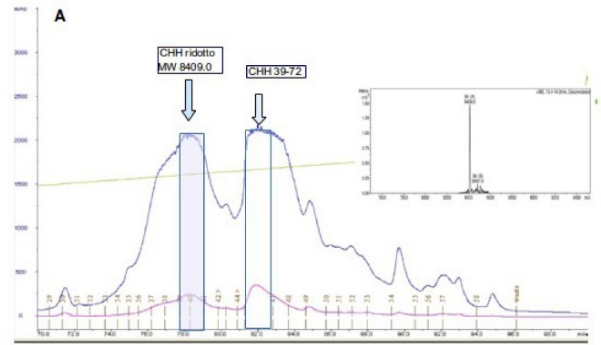
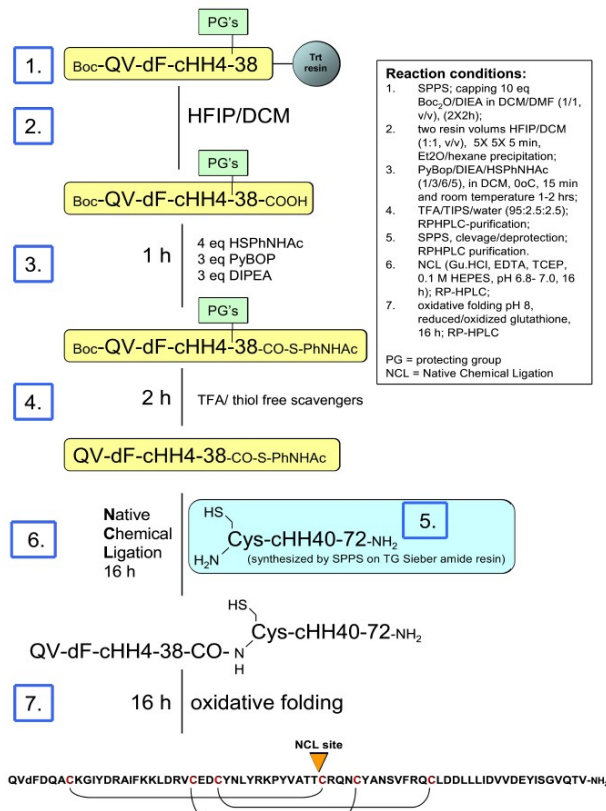


di sintesi peptidica in fase solida (SPPS) per ottenere un isomero dell'ormone iperglicemico contenente questa peculiare modificazione seguendo due approcci principali. Nel primo approccio la sequenza del polipeptide di 72 residui viene divisa in due frammenti la cui sintesi viene effettuata separatamente: la parte N-terminale dell'ormone (CHH 1-38 tioestere) e la parte C-terminale (CHH 39-72). I due frammenti vengono poi coniugati in soluzione utilizzando la tecnica della *Native Chemical Ligation* (NCL) (Mosco *et al.*, 2012).

**CHH 1-38: H-QVdFDQACKGIYDRAIFKKLDRVCEDCYNLYRKPYVATT-CO-S-PhNHAc**

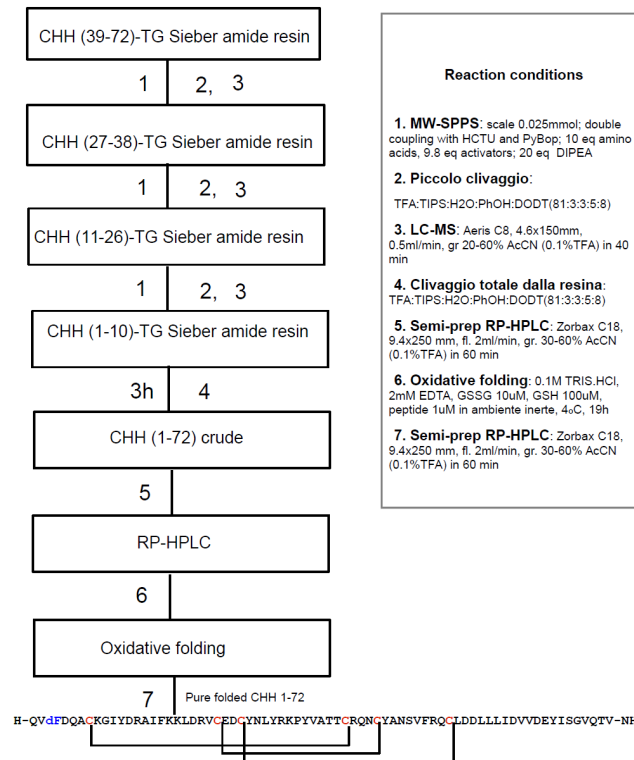
**CHH 39-72: H-CRQNCYANSVFRQCLDDLLIDVVDEYISGVQTV-NH<sub>2</sub>**

In breve la NCL (Fig. 37) consente la formazione di un legame tra due segmenti peptidici non protetti aventi rispettivamente il gruppo C-terminale tioestere ed un residuo di cisteina all' N-terminale. Il risultato finale di questa reazione è un legame ammidico nativo nel sito di ligazione, fenomeno che rende questo metodo molto attraente per la sintesi di peptidi piuttosto lunghi. Abitualmente sono utilizzati  $\alpha$ -alchiltioesteri per la loro facilità di preparazione, ma poiché sono poco reattivi la reazione di ligazione è catalizzata *in situ* da transtioesterificazione con tioli aromatici. Nel nostro caso sintetizziamo direttamente uno dei due peptidi sotto forma di tioestere aromatico dell'acido 4-mercaptofenilacetico (MPAA) tramite il quale la ligazione avviene molto più rapidamente. I risultati ottenuti dalla NCL in tampone acquoso del CHH 1-72 dopo la purificazione tramite RP-HPLC e relativa analisi di massa con ESI-MS sono visibili in Fig. 38A. La frazione pura è stata sottoposta a folding ossido-riduttivo nelle condizioni descritte in Fig. 37 e i risultati del folding sono presentati nella Fig. 38B. L'elevata idrofobicità della porzione C-terminale e del peptide intero ridotto prodotto dalla reazione concorrono ad una bassa solubilità della miscela di NCL in tampone acquoso causando una bassa resa del prodotto finale (circa 3-5%) che ci ha comunque permesso di ottenere circa 300  $\mu$ g di D-Phe CHH in conformazione nativa. Nel tentativo di migliorare le rese abbiamo anche sperimentato varie altre miscele di NCL in solvente organico come la dimetilformamide (DMF), ma nonostante la buona solubilità del peptide C-terminale in DMF la NCL non procede a livelli soddisfacenti.



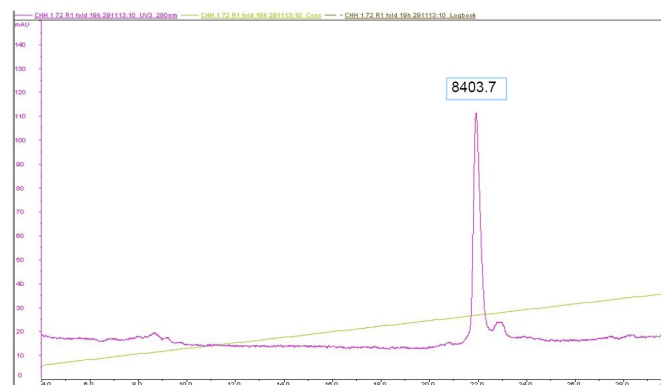
**Fig. 37.** (a sinistra) Sintesi di cHH 1-72 via NCL  
**Fig. 38.** (a destra) A- Purificazione del peptide ridotto dopo NCL tramite RP-HPLC e analisi di spettrometria di massa (ESI-MS). B- Purificazione del peptide foldato tramite RP-HPLC e analisi ESI-MS.

Abbiamo quindi sviluppato un secondo approccio (normalmente poco usato nella sintesi di peptidi più lunghi di 50 aminoacidi a causa delle difficoltà tecniche) cioè la sintesi in fase solida dell'intera sequenza di 72 residui; per aumentare la probabilità di successo abbiamo effettuato la sintesi con un sintetizzatore automatico assistito da microonde (BIOTAGE – Fig. 39).



**Fig 39.** Sintesi di CHH (1-72) via MW-SPPS.

La sintesi è stata effettuata in 4 fasi (CHH 39-72; CHH 27-38; CHH 11-26 e CHH 1-10) successive, seguendo la riuscita di ogni fase con analisi di spettrometria di massa. Il risultato è stato sorprendentemente buono vista l'analisi LC-MS del peptide crudo CHH 1-72. Una prima aliquota del peptide è stata quindi purificata tramite RP-HPLC semi-preparativa e il folding della frazione pura è stato effettuato come specificato in Fig. 39, ottenendo 100 µg di un peptide foldato nativo di ottima qualità e purezza (Fig. 40). Stiamo attualmente applicando le stesse strategie di sintesi fin qui sviluppate con il cHH, all'ormone gonado-inibitorio di *P. clarkii* (GIH) di cui abbiamo finora sintetizzato un frammento C-terminale di 25 aminoacidi.



**Fig. 40.** Purificazione semi-preparativa in fase inversa (RP-HPLC) del peptide CHH 1-72 foldato a 4°C per 19h.



### **Prospettive e conclusioni sull'applicabilità di esche ormonali**

Il nuovo metodo autocida proposto per il contenimento numerico di *P. clarkii* presenta numerosi vantaggi: il rilascio di esche ormonali in bacini infestati prima della stagione riproduttiva è di facile attuazione e non richiede personale specializzato; l'ormone gonado-inibitorio è specie-specifico e non dovrebbe influire sul metabolismo di specie non-bersaglio; anche se l'assunzione per via orale ha un'efficienza non elevata, sono sufficienti dosi circolanti minime per esplicare la sua attività biologica. La nostra esperienza su molti campioni di RNA estratto da peduncolari oculari di femmine di gambero rosso ha evidenziato un'espressione sempre a livelli molto bassi, difficile anche da rilevare con i nuovi metodi di next generation sequencing (Illumina). In breve: **1-** sono state messe a punto esche di alginato/chitosano che permettono l'assorbimento di quantità di ormoni peptidici bioattive sufficienti a innalzare la glicemia negli animali trattati; **2-** è stato caratterizzato l'ormone gonado inibitorio di *P. clarkii* ed è stato confermato il suo ruolo mediante la tecnica dell'interferenza a RNA; **3-** è iniziata la sintesi chimica in fase solida dell'ormone gonado inibitorio. La sintesi di un'adeguata quantità di ormone permetterà di validare la tecnica su una popolazione di *P. clarkii* durante la stagione riproduttiva.



## Bibliografia

- Ameyaw-Akumfi CE e Hazlett BA. Sex recognition in the crayfish *P. clarkii*. Science (1975) 190: 1225–1226.
- Aquiloni L e Gherardi F 2008b. Assessing mate size in the red swamp crayfish *P. clarkii*: effects of visual versus chemical stimuli. Freshwater Biol (2008b) 53: 461-469.
- Aquiloni L e Gherardi F. Mutual mate choice in crayfish: large body size is selected by both sexes, virginity by males only. J Zool Lon (2008a) 274: 171-179.
- Aquiloni L e Gherardi F. The use of sex pheromones for the control of invasive populations of the crayfish *P. clarkii*: a field study. Hydrobiologia (2010) 649: 249-254.
- Aquiloni L, Becciolini A, Trunfio C, Berti R e Gherardi F. Managing invasive crayfish: use of X-ray sterilization of males. Freshwater Biol (2009) 54: 10510-1519.
- Aquiloni L, Buric M e Gherardi F. Crayfish females eavesdrop on fighting males before choosing the dominant mate. Current Biology (2008) 18: 462-463.
- Aquiloni L, Massolo A e Gherardi F. Sex identification in female crayfish is bimodal. Naturwissenschaften (2009) 9: 103-110.
- Aspden TJ, Mason JD, Jones NS, Lowe J, Skaugrud O e Illum L. Chitosan as a nasal delivery system: the effect of chitosan solutions on in vitro and in vivo mucociliary transport rates in human turbinates and volunteers. J Pharm Sci (1997) 86(4): 509-513.
- Atema J e Voigt R. Behaviour and sensory biology. In Biology of the Lobster *Homarus americanus* (ed. J. R. Factor) (1995) 313–348. New York: Academic Press, Inc.
- Atema J. Review of sexual selection and chemical communication in the lobster, *Homarus americanus*. Can J Fish Aquat Sci (1984) 43: 2283–2290.
- Barbosa AP. Interaction of gamma radiation and temperature on the determination of the sterilizing dose of some stored products pests. MSc Thesis (1976), Sao Paulo University, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, Brazil.
- Belanger RM e Moore PA. The use of the major chelae by reproductive male crayfish (*Orconectes rusticus*) for discrimination of female odours. Behaviour (2006)143: 713–731.
- Bergman DA e Moore PA. The prolonged exposure to social odors alters subsequent social behavior of crayfish (*Orconectes rusticus*). Anim Behav (2005) 70: 311–318.
- Bergman DA, Kozlowski CP, McIntyre JC, Huber R, Daws AG e Moore PA. Temporal dynamics and communication of winner effects in the crayfish, *Orconectes rusticus*. Behaviour (2003) 140: 805–825.
- Borgatti SP. (2002) NetDraw: graph visualization software. Harvard: Analytic Technologies.
- Breithaupt T e Eger P. Urine makes the difference: chemical communication in fighting crayfish made visible. J Exp Biol (2002) 205: 1221–1231.
- Breithaupt T, Lindstrom DP e Atema J. Urine release in freely moving catheterized lobsters (*Homarus americanus*) with reference to feeding and





- social activities. *J Chem Ecol* (1999) 202: 837-844.
- Bushmann PJ e Atema J. Aggression-reducing courtship signals in the lobster, *Homarus americanus*. *Biol Bull* (1994) 187: 275–276.
- Bushmann PJ e Atema J. Chemical communication signals as determinants of mating success in the lobster, *Homarus americanus*. 24th Annual Benthic Ecology Meeting, Columbia, S. Carolina (1996).
- Bushmann PJ e Atema J. Shelter sharing and chemical courtship signals in the lobster, *Homarus americanus*. *Can. J. Fish Aquat Sci* (1997) 54: 647–654.
- Carpenter JE e Gross HR. Interaction of inherited sterility and diapause in the corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* (1989) 82: 1354-1357.
- Carr WESm, Ache BW e Gleeson RA. Chemoreceptor of crustaceans: similarities to receptors for neuroactive substances in internal tissues. *Environ Health Perspect* (1987) 71: 31-46.
- Cecchinelli E, Aquiloni L, Orioli G e Gherardi F. L'uso della SMRT (Sterile Male Release Technique) e di Pyblast per il controllo del gambero invasivo *P. clarkii* nel Consorzio della Bonifica Parmigiana Moglia-Secchia. Consorzio di Bonifica Parmigiana-Moglia-Secchia (2010), Reggio Emilia.
- Coccia E, Varricchio E e Paolucci M. Digestive enzymes in the crayfish *Cherax albidus*: polymorphism and partial characterization. *Inter J Zool* (2011) 2011: 1-9.
- Corkum LD e Belanger RM. Use of chemical communication in the management of freshwater aquatic species that are vectors of human diseases or are invasive. *General and Comparative Endocrinology* (2007) 153: 401–417.
- Curtis CF. Genetic control of insect pests: growth industry or lead balloon? *Biol J Linn Soc* (1985) 26: 359-374.
- De Kleijn DPV. Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. *FEBS Letters* (1994) 353(3): 255-258.
- Dodane V e Vilivalam VD. Pharmaceutical applications of chitosan. *Pharm Sci Technol* (1998) Today 1: 246-253.
- Dorsett Y e Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* (2004) 3(4): 318-329.
- Dunham DW e Oh JW. Chemical sex discrimination in the crayfish, *P. clarkii*: role of antennules. *J Chem Ecol* (1992) 18: 2363–2372.
- Edomi P, Azzoni E, Mettullo R, Pandolfelli N, Ferrero EA e Giulianini PG. Gonad-inhibiting hormone of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*): cDNA cloning, expression, recombinant protein production, and immunolocalization. *Gene* (2002) 284(1-2): 93-102.
- Ekerholm M e Hallberg E. Primer and short-range releaser pheromone properties of premolt female urine from the shore crab. *Carcinus maenas*. *J Chem Ecol* (2005) 31: 1845-1864.
- Erkan M, Tunali Y e Sancar-Bas S. Male reproductive system morphology and spermatophore formation in *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (decapoda: astacidae). *J Crustacean Biol* (2009a) 29: 42-50.
- Erkan M, Tunali Y, Balkis H e Oliveria E. Morphology of testis and vas deferens in the xanthoid crab, *Eriphia verrucosa* (forskl, 1775) (decapoda:



- brachyura). *J Crustacean Biol* (2009b) 29: 458-465.
- Fisher K. Irradiation effects in air and in nitrogen on Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) pupae in Western Australia. *J Econ Entomol* (1997) 90: 1609-1614.
- Gherardi F, Baldaccini GN, Barbaresi , Ercolini , De Luise G, Mazzone D e Mori M. The situation in Italy. In: *Crayfish in Europe as Alien Species. How to Make the Best of a Bad Situation?* Eds F Gherardi e DM Holdich (1999), pp. 107-128. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.
- Giri T e Dunham DW. Use of the inner antennule ramus in the localisation of distant food odours by *P. clarkii* (Girard, 1852) (Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana* (1999) 72: 123-127.
- Giulianini PG, Edomi P. Neuropeptides controlling reproduction and growth in Crustacea: a molecular approach. In: Satake H, editor. *Invertebrate Neuropeptides and Hormones: Basic Knowledge and Recent Advances*. Research Signpost. (2006) pp. 225–252.
- Gleeson R A. Pheromone communication in the reproductive behavior of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Mar Behav Physiol* (1980) 7: 119-134.
- Gleeson RA, Adams MA e Smith AB III. Characterization of a sex pheromone in the blue crab, *Callinectes sapidus*: crustecdysone studies. *J Chem Ecol* (1984) 10: 913-921.
- Gleeson RA, Adams MA e Smith AB III. Hormonal modulation of pheromone mediated behavior in a crustacean. *Biol Bull* (1987) 172: 1-9.
- Gleeson RA. Morphological and behavioral identification of the sensory structures mediating pheromone reception in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Biol Bull* (1982) 163: 162-171.
- Hallman GJ. Ionizing irradiation quarantine treatment against plum curculio (Coleoptera: Curculionidae). *J Econ Entomol* (2003) 96: 1399-1404.
- Hardege JD, Jennings A, Hayden D, Muller CT, Pascoe D, Bentley MG e Clare AS. Novel behavioural assay and partial purification of a female-derived sex pheromone in *Carcinus maenas*. *Mar Ecol Prog Ser* (2002) 244: 179-189.
- Hazlett BA. Crayfish feeding responses to zebra mussels depend on microorganisms and learning. *J Chem Ecol* (1994) 20: 2623–2630.
- Hazlett BA. Source and nature of disturbance-chemical system in crayfish. *J Chem Ecol* (1990) 16: 2263–2275.
- Hemsworth R, Villareal W, Patullo BW e Macmillan DL. Crustacean social behavioral changes in response to isolation. *Biol Bull* (2007) 213: 187-195.
- Holdich DM, Gydemo R e Rogers WD. 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 e DM Holdich (1999), pp. 245–270. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.
- Hooper GHS. The effect of ionizing radiation on reproduction. In: *World crop pests, vol. 3A: fruit flies, their biology, natural enemies and control*. Eds AS Robinson e G Hooper (1989), pp. 153-164. Elsevier Publishers, New York.
- Kamio M, Araki M, Nagayama T, Matsunaga S e Fusetani N. Behavioral and electrophysiological experiments suggest that the antennular outer flagellum is the site of pheromone reception in the male helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Biol Bull* (2005) 208: 12-19.
- Kamio M, Matsunaga S e Fusetani N. Copulation pheromone in the crab



- Telmessus cheiragonus* (Brachyura: Decapoda). Mar Ecol Prog Ser (2002) 234: 183-190
- Keller TA e Moore PA. Effects of ontogeny and odors on behavior: the influence of crayfish size and fish odors on crayfish movement. Mar Freshw Behav Physiol (1999) 33: 35–50.
- Khimmakthong U, Kongmee P, Deachamag P, Leggat U e Chotigeat W. Activation of an immune response in *Litopenaeus vannamei* by oral immunization with phagocytosis activating protein (PAP) DNA. Fish e Shellfish Immunology (2013) 34: 929-938.
- Knipling EF. Eradication of screw-worm fly. Sci Am (1960) 203: 54-61.
- Kraus-Epley KE e Moore PA. Bilateral and unilateral antennal lesions alter orientation abilities of the crayfish, *Orconectes rusticus*. Chem Senses (2002) 27: 49–55.
- Laverack MS. The diversity of chemoreceptors. In Sensory Biology of Aquatic Animals (ed. J. Atema, A. N. Popper, R. R. Fay and W. N. Tavolga), (1988) pp, 287-317. New York: Springer-Verlag.
- Lee N. Effects of Cobalt-60 Gamma Irradiation on the Malaysian Prawn *Macrobrachium rosenbergii*. PhD Thesis (2000), Louisiana State University, Louisiana.
- Liley NR. Chemical communication in fish. Can J Fish Aquat Sci (1982) 39: 22–35.
- Lodge DM, Williams SL, Maclsaac H *et al.* Biological invasions: recommendations for U.S. policy and management. Ecological Applications (2006) 16: 2035-2054.
- Maini S. Nuove applicazioni dei feromoni per la lotta integrata nei fruttiferi. Frutticoltura (2007) 2: 48-57.
- Mansour M. Gamma irradiation as a quarantine treatment for apples infested by codling moth (Lep., Tortricidae). J Appl Entomol (2003) 127: 137-141.
- Marsich E, Borgogna M, Donati I, Mozetic P, Strand BL, Salvador SG, Vittur F e Paoletti S. Alginate/lactose-modified chitosan hydrogels: A bioactive biomaterial for chondrocyte encapsulation. J Biomed Mater Res A (2008) 84: 364–376.
- Mayas I. The effect of fractionation of the sterilizing dose of gamma-rays on the emergence, fertility and competitiveness of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata* Wied. In: Proceedings, Symposium: The use of isotopes in pesticides and pest control. (1975), pp. 145-152. Beirut, Lebanon
- Mejía-Ruíz C, Vega-Peña S, Alvarez-Ruiz P e Escobedo-Bonilla CM (2011). Double-stranded RNA against white spot syndrome virus (WSSV) vp28 or vp26 reduced susceptibility of *Litopenaeus vannamei* to WSSV, and survivors exhibited decreased susceptibility in subsequent re-infections. J Invertebr Pathol (2011) 107(1): 65-68.
- Miller JR, Gut LJ, De Lame FM e Stelinski LL. Differentiation of competitive vs. non-competitive mechanism mediating disruption of moths sexual communication by point sources of sex pheromone (part I): theory, J Chem Ecol (2006a) 32: 2115-2143.
- Monteclaro HM, Anraku K e Matsuoka T. Response properties of crayfish antennules to hydrodynamic stimuli: functional differences in the lateral and medial flagella. J Exp Biol (2010) 213: 3683–3691.



- Mosco A, Zlatev V, Guarnaccia C, Pongor S, Campanella A, Zahariev S e Giulianini P. Novel protocol for the chemical synthesis of crustacean hyperglycemic hormone analogues—an efficient experimental tool for studying their functions. *PloS one* (2012) 7: e30052.
- Ohinata K, Ashraf M e Harris EJ. Mediterranean fruit flies: sterility and sexual competitiveness in the laboratory after treatment with gamma irradiation in air, carbon dioxide, helium, nitrogen or partial vacuum. *J Econ Entomol* (1977) 70: 165-168.
- Ollivaux C, Vinh J, Soyeux D e Toullec JY. Crustacean hyperglycemic and vitellogenesis-inhibiting hormones in the lobster *Homarus gammarus*: Implications for structural and functional evolution of a neuropeptide family. *FEBS Journal* (2006) 273(10): 2151-2160.
- Onishi H e Machida Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials* 20 (2) (1999) 175-182.
- Pamuru RR , Rosen O, Manor R, Chung JS, Zmora N, Glazer L, Aflalo ED, Weil S, Tamone SL e Sagi A. Stimulation of molt by RNA interference of the molt-inhibiting hormone in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *General and comparative endocrinology* (2012) 178 (2): 227-236.
- Rajeshkumar S, Venkatesan C, Sarathi M, Sarathbabu V, Thomas J, Anver Basha K e Sahul Hameed AS. Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish e Shellfish Immunology* (2009) 26: 429-437.
- Rao SB e Sharma CP. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res* (1997) 34: 21-28.
- Rees GH. Effects of gamma radiation on two decapod crustaceans, *Palaemonetes pugio* and *Uca pugnax*. *Chesapeake Science* (1962) 3: 29-34.
- Romalde JL, Luzardo-Alvarez A, Ravelo C, Toranzo AE e Blanco-Mendez J. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture* (2004) 236: 119-129.
- Rotllant G, Chiva M, Durfort M e Ribes E. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the norway lobster *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Astacidea). *J Morphol* (2012) 273: 572-585.
- Ryan EP. Pheromone: evidence in a decapod crustacean. *Science* (1966) 151: 340–341.
- Schneider RAZ e Moore PA. Urine as a source of conspecific disturbance signals in crayfish *P. clarkii*. *J Exp Biol* (2000) 203: 765–771.
- Schneider RAZ, Huber R e Moore PA. Individual and status recognition in the crayfish, *Orconectes rusticus*: the effects of urine release on fight dynamics. *Behaviour* (2001) 138: 137–153.
- Seifert P. Studies on the sex pheromone of the shore crab, *Carcinus maenas*, with special regard to ecdysone excretion. *Ophelia* (1982) 21: 147–158.
- Sellars MJ e Preston NP. Sexual sterilisation of harvest-size *Penaeus japonicus* (Bate) using ionising irradiation. *Aquaculture Research* (2005) 36: 1144-1147.
- Shechter A, Glazer L, Cheled S, Mor E, Weil S, Berman A, Bentov S, Aflalo ED, Khalaila I e Sagi A. A gastrolith protein serving a dual role in the formation of an amorphous mineral containing extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci*



- (2008) 105(20): 7129-7134.
- Smidsrød O e Skjak-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. Trends in Biotechnology (1990) 8: 71–78.
- Stebbing PD, Bentley MG e Watson GJ. Mating behavior and evidence for a female released courtship pheromone in the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus*. J Chem Ecol (2003a) 29: 465-475.
- Stebbing PD, Watson GJ, Bentley MG, Fraser D, Jennings R, Rushton SP e Sibley PJ. Reducing the threat: the potential use of pheromones to control invasive signal crayfish. Bull Fr Peche Piscicult (2003b) 370-371, 219–224.
- Steullet P, Dudar O, Flavus T, Zhou M e Derby CD. Selective ablation of antennular sensilla on the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus* suggests that dual antennular chemosensory pathways mediate odorant activation of searching and localization of food. J Exp Biol (2001) 204: 4259-4269.
- Steullet P, Krützfeldt DR, Hamidani G, Flavus T, Ngo V e Derby CD. Dual antennular chemosensory pathways mediate odor-associative learning and odor discrimination in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. J Exp Biol (2002) 205: 851-867.
- Strand BL, Gåserød O, Kulseng B, Espevik T e Skjåk-Baek G. Alginate-polylysine-alginate microcapsules: effect of size reduction on capsule properties. J Microencapsulation (2002) 19(5): 615-630.
- Taketomi Y, Nishikawa S e Koga S. Testis and androgenic gland during development of external sexual characteristics of the crayfish *P. clarkii*. J Crust Biol (1996) 16: 24-34.
- Tamhankar AJ e Shantharam K. Sterile insect technique (SIT) for control of spotted bollworm of cotton: field experiments confirm dose fractionation improves mating competitiveness of sterile males. In: Proceedings, Conference: Applications of Radioisotopes and Radiation Technology in The 21st Century, Naarri International Conference. Eds N Ramamoorthy, M Ananthakrishnan e AN Nandakumar (2001), pp. 250-252. Mumbai, India.
- Tierney AJ, Thompson CS e Dunham DW. Site of pheromone reception in the crayfish *Orconectes propinquus* (Decapoda, Cambaridae). J Crust Biol (1984) 4: 554–559.
- Treerattrakool S, Panyim S, Chan SM, Withyachumnarnkul B e Udomkit A. Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference. FEBS Journal (2008) 275(5): 970-980.
- Varum KM. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field NMR spectroscopy. Carbohydrate Research (1991) 211: 17-23.
- Ventura T, Manor R, Aflalo ED, Weil S, Rosen O e Sagi A. Timing sexual differentiation: full functional sex reversal achieved through silencing of a single insulin-like gene in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. Biol Reprod (2012) 86(3).
- Willman EJ, Hill AM e Lodge DM. Response of three crayfish congeners (*Orconectes* spp.) to odors of fish carrion and live predatory fish. Am Midl Nat (1994) 132: 44–51.
- Word B e Hobbs H. Observations on the testis of the crayfish *Cambarus montanus acuminatus* Faxon. Am. Micros. Soc. (1958) 77: 435-450.





Zhang D, Lin J, Harley MA e Hardege JD. Characterization of sex pheromones in a simultaneous hermaphroditic shrimp, *Lysmata wurdemanni*. *Mar Biol* (2010) 157: 1-6.