



LIFE10 NAT/IT/000239 "RARITY"

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

**Az. A2**

**Report on the results achieved with  
non-traditional methods and on the  
protocols to apply them in the field**





*LIFE10 NAT/IT/000239*

**Protocolli per l'applicazione di metodi non  
tradizionali per il controllo di gamberi  
invasivi:  
la tecnica del rilascio dei maschi sterili  
(SMRT)**

**Laura Aquiloni**

*Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, Firenze*

## 1. TECNICA SMRT (*STERILE MALE RELEASE TECHNIQUE*)

Questa tecnica prevede il rilascio nell'ambiente di maschi sterili ma sessualmente attivi e in grado di competere con i maschi fertili per l'accesso alle femmine. Lo SMRT, già ampiamente utilizzato con successo in campo entomologico per il controllo di insetti nocivi all'agricoltura, potrebbe essere applicato anche nel contenimento di specie invasive di ambiente acquatico, come dimostrato dallo studio sulla lampreda di mare (*Petromyzon marinus*). Bergstedt & Twohey (2005) hanno ridotto la popolazione di lamprede nella regione dei Grandi Laghi americani (83% in meno in 9 anni di immissioni), evidenziando che la tecnica di sterilizzazione e rilascio è una delle migliori dal punto di vista del rapporto costi/benefici (Holey & Trudeau 2005). Infatti, a differenza degli altri metodi di intervento, non necessita di una frequente e costosa attività sul territorio, ma si limita ad un'eventuale ripetizione dei rilasci la cui consistenza e frequenza deve essere ben calibrata in funzione della situazione in cui si opera.

La sterilizzazione nei gamberi è ottenuta attraverso l'uso di radiazioni ionizzanti erogate per mezzo di apparecchiature ospedaliere. Queste radiazioni vanno a colpire le cellule dell'organismo che, in relazione al tipo di cellula e al momento in cui vengono colpite, presentano una diversa radiosensibilità. Le cellule maggiormente radiosensibili sono quelle in attiva proliferazione, in cui, a causa della rapida duplicazione del DNA, si evidenziano precocemente le lesioni prodotte dalle radiazioni. Le gonadi maschili all'inizio del periodo riproduttivo, proprio per l'elevata moltiplicazione cellulare, sono particolarmente radiosensibili e l'effetto si manifesta con la morte delle cellule progenitrici della linea seminale e quindi con la sterilità assoluta o temporanea se una parte di esse sopravvive (vedi report scientifico *Selecting the best practices to manage invasive NICS*, AAVV).

In *P. clarkii*, un singolo maschio si accoppia ogni stagione riproduttiva con più femmine, mentre ogni singola femmina ha la possibilità di portare avanti una sola covata. I maschi sterilizzati mediante radiazioni ionizzanti mantengono la stessa capacità di corteggiamento e accoppiamento dei soggetti non trattati (come provato da test comportamentali), ma le dimensioni delle loro gonadi si riducono in modo significativo e la loro spermatogenesi è alterata in modo permanente (Aquiloni et al. 2009). Di conseguenza, il numero di uova abortive risulta maggiore nelle covate generate da femmine accoppiate con maschi sterili, con una riduzione di oltre il 40%. In pratica, se una femmina si accoppia con un maschio sterile, deporrà uova destinate a degenerare e, ad ogni stagione riproduttiva, la popolazione subirà una riduzione del numero di nascite che ridurrà, generazione dopo generazione, la densità di popolazione (Cecchinelli et al 2010).

Dato che, in natura, la probabilità che la femmina incontri un maschio sterile è direttamente proporzionale al rapporto tra maschi sterili e maschi selvatici, il successo di questo metodo è funzione diretta di tale rapporto che è possibile incrementare attraverso: (1) immissioni periodiche

di maschi trattati e (2) rimozione meccanica di maschi non trattati attraverso un trappolaggio intensivo. Inoltre, al fine di ridurre ulteriormente il reclutamento della popolazione, durante il trappolaggio dovranno essere rimosse anche tutte le femmine catturate.

**La tecnica SMRT si basa sul rilascio di un adeguato numero di maschi irraggiati in relazione al contesto di rilascio**

**PRO: (1) metodo efficace anche in popolazioni con basse densità di individui; (2) sicuro per l'ambiente e l'uomo; (3) protocollo di sterilizzazione semplice e con costi contenuti.**

**CONTRO: (1) effetti visibili solo a lungo termine; (2) difficile stima del numero adeguato di maschi da rilasciare; (3) necessario coinvolgimento di una struttura ospedaliera per il trattamento dei maschi.**

## 2. PROTOCOLLO DI APPLICAZIONE

*Periodo di attività:* **variabile da aprile-giugno** in relazione al ciclo biologico degli animali variabile da sito a sito.

Si consiglia di applicare la tecnica SMRT sulla stessa popolazione/area di intervento **ogni anno per almeno tre anni consecutivi**. L'impatto prodotto dalla tecnica sulla popolazione dovrà comunque essere valutato **da 3 a 5 anni dopo** la prima applicazione.

### **Azione 1. SMRT – Individuazione del personale tecnico-scientifico per la supervisione e lo svolgimento delle attività e adempimenti burocratici**

*Durata:* una settimana

*Programma:* in questa fase è necessario individuare un responsabile dell'intervento (supervisore scientifico in grado di indicare il programma di lavoro in relazione alla situazione contingente da affrontare) e gli operatori coinvolti nelle attività di campo (trappolaggio, selezione dei maschi da trattare, rilascio dei maschi trattati in natura). Inoltre, devono essere attivate le pratiche burocratiche per l'utilizzo delle trappole per la cattura degli esemplari e della struttura ospedaliera di riferimento, individuata nell'ambito del progetto RARITY e indicata sotto.

#### **CENTRO DI RIFERIMENTO ONCOLOGICO DI AVIANO**

SOC Oncologia Radioterapica

Via Franco Gallini, 2

33081 Aviano (PN)

Prof. Mauro Trovò, e-mail: [mgtrovo.rt.cro@cro.it](mailto:mgtrovo.rt.cro@cro.it)

Dr Carlo Furlan, e-mail: [cfurlano@cro.it](mailto:cfurlano@cro.it)

*Materiale occorrente:* non è richiesto materiale specifico

## **Azione 2. SMRT– il monitoraggio standardizzato della popolazione prima dell'intervento**

*Durata:* una settimana

*Programma:* la stima iniziale della dimensione della popolazione è una informazione essenziale per quantificare l'impatto prodotto della tecnica di controllo sulla popolazione. La stima viene effettuata attraverso un monitoraggio standardizzato descritto nel dettaglio nei protocolli del progetto RARITY. Dato che la stima della popolazione varia in relazione al ciclo biologico del gambero e alla temperatura del periodo di monitoraggio, si raccomanda che monitoraggi successivi di una stessa popolazione siano condotti nello stesso periodo dell'anno per consentire una soddisfacente confrontabilità dei dati.

*Materiale occorrente:* come specificato nei protocolli di monitoraggio del progetto RARITY

## **Azione 3. SMRT – Trappolaggio intensivo e selezione dei maschi da sterilizzare**

*Durata:* variabile da una settimana ad un mese (in relazione alla dimensione della popolazione target e dell'area di intervento)

*Programma:* i maschi da sterilizzare e rilasciare devono sempre provenire dall'area di intervento (in questo modo non si aumenta la dimensione della popolazione già presente). La SMRT deve quindi essere preceduta da un trappolaggio intensivo che ha lo scopo di: (1) stimare la densità di popolazione e valutare il numero adeguato di maschi sterili da rilasciare; (2) abbassare il numero dei riproduttori della popolazione (femmine e maschi sotto-taglia); (3) selezionare maschi adulti di grandi dimensioni (di lunghezza del cefalotorace  $\geq 40$  mm) e con entrambe le chele da destinare al trattamento di sterilizzazione. Gli animali selezionati devono essere mantenuti in vasche con acqua disposte in luogo ombreggiato fino al trattamento di sterilizzazione.

*Materiale occorrente:* trappole con esca, corde di canapa, picchetti, calibro per la misura della dimensione dei maschi pescati, secchi per trasportare gli animali e vasche per contenerli in attesa del trattamento.

## **Azione 4. SMRT – Sterilizzazione dei maschi**

*Durata:* 1 giorno

*Programma:* gli animali saranno trasportati al reparto di radioterapia dell'ospedale di riferimento all'interno di vasche in plexiglass (40x40 cm, h: 30 cm) dotate di coperchio e prive di acqua. Le vasche devono avere queste dimensioni che corrispondono al fuoco di irraggiamento dell'acceleratore utilizzato per il trattamento. Questo accorgimento consente quindi di trattare gli

animali nelle stesse vasche utilizzate per il loro trasporto con un notevole risparmio di tempo. In ciascuna vasca saranno contenuti quaranta maschi. Ogni vasca, poco prima del trattamento, sarà riempita di una quantità d'acqua tale da coprire gli esemplari, coperta con piano in plexiglass trasparente e sottoposta ad una radiazione di 40 Gy. Dopo il trattamento, la vasca sarà nuovamente svotata dell'acqua per facilitare il trasporto degli animali. L'operazione sarà ripetuta fino al raggiungimento del numero di maschi sterili previsto in A.3. Da considerare che il trattamento di ogni vasca, che corrisponde a circa 40 maschi, richiede 15 minuti di irraggiamento (anche se questi tempi dipendono dalla dose e dalla potenza dello strumento utilizzato).

*Materiale occorrente:* furgone per il trasporto degli animali in vasche (possono anche essere impilate una sull'altra inserendo degli spessori per evitare lo schiacciamento degli animali), vasche con coperchio in plexiglass (40x40x30 cm).

### **Azione 5. SMRT– Rilascio dei maschi trattati nell'area di intervento**

*Durata:* 1 giorno

*Programma:* Gli animali potranno essere rilasciati nell'area di intervento lo stesso giorno del trattamento per ovviare alla loro gestione in ambiente confinato. Occorre tenere presente però che l'effetto delle radiazioni sul loro sistema riproduttivo sarà massimo dopo circa una settimana dall'irraggiamento. Prima di essere rilasciati, i maschi sterili devono essere marcati in modo permanente effettuando un piccolo taglio sull'uropode (la parte terminale della "coda" anche detto ventaglio caudale) che li renda facilmente distinguibili dagli animali non trattati. Questa marcatura è molto importante perché consente agli operatori di riconoscere gli animali sterili anche dopo molto tempo dal loro rilascio e, quindi, di non rimuoverli dal canale, se eventualmente catturati, vanificando gli sforzi della sterilizzazione.

*Materiale occorrente:* furgone per il trasporto degli animali in vasche (possono anche essere impilate una sull'altra inserendo degli spessori per evitare lo schiacciamento degli animali), vasche con coperchio in plexiglass (40x40x30 cm).

### 3. MONITORAGGIO PER LA VALUTAZIONE DELL'EFFETTO SULLA POPOLAZIONE

L'effetto ottenuto dalla SMRT sulla popolazione, dato che tale tecnica abbatte il numero delle nascite riducendo il reclutamento dei giovani nella popolazione, sarà visibile solo sul medio-lungo periodo, ovvero quando i giovani della generazione successiva al rilascio potranno essere catturati. Applicando la SMRT è quindi attesa una significativa riduzione della numerosità della popolazione in 3-5 anni. La popolazione dovrà quindi essere monitorata ogni anno applicando protocolli standardizzati (come descritto nei protocolli di monitoraggio RARITY) con cui sarà possibile seguire le variazioni della numerosità della popolazione nel tempo e, trascorso tale periodo dall'applicazione della SMRT, potrà essere valutato l'impatto prodotto dalla tecnica sulla

popolazione attraverso il confronto con la dimensione iniziale stimata prima del rilascio dei maschi sterili (azione A2).

## **RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

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

Bergstedt R.A. & Twohey M.B. (2005). The sterile-male-release technique in Great Lakes sea lamprey management. Great Lakes Fishery Commission Research Theme Report 8/23/2005.

Cecchinelli E., Aquiloni L., Orioli G. & Gherardi F. (2010) L'uso della SMRT (Sterile Male Release Technique) e di Pyblast per il controllo del gambero invasivo *Procambarus clarkii* nel Consorzio di Bonifica dell'Emilia Centrale. Relazione finale per il Consorzio di Bonifica dell'Emilia Centrale, Reggio Emilia. 30 pp.

Holey M.E. & Trudeau T.N. [EDS] (2005). The state of Lake Michigan in 2000. *Great Lakes Fish. Comm. Spec. Pub.* 05-01.



LIFE10 NAT/IT/000239

**Il controllo delle popolazioni di *Procambarus clarkii*:  
Sito Casette (cod. 0709300)  
III aggiornamento**

**VALUTAZIONE DELL'IMPATTO SULLA  
POPOLAZIONE CON TECNICA INTEGRATA  
TRAPPOLAGGIO-SMRT**



**Laura Aquiloni**

*Itinera C.E.R.T.A. SCRL, Via Isidoro del Lungo 58, Montevarchi (AR)*



Questo report analizza l'impatto prodotto sulla popolazione del gambero invasivo *Procambarus clarkii* presente nel sito di Casette (cod. 0709300, Pordenone) in due anni di attività. Il controllo della specie è stato condotto utilizzando per la prima volta un approccio integrato di trappolaggio intensivo e rilascio di maschi sterili, applicando una tecnica innovativa chiamata SMRT (*Sterile Male Release Technique*). Questa tecnica, sviluppata per questa specie dall'Università di Firenze già nel 2008, è stata messa a punto nel corso del progetto RARITY allo scopo di renderla facilmente applicabile nella gestione di popolazioni invasive. Questo lavoro di campo ha avuto l'obiettivo di valutarne la reale applicabilità e di stimare l'effetto prodotto sulla popolazione, effetto che sarà però possibile quantificare in modo più accurato con monitoraggi standardizzati ripetuti nei prossimi anni: il mancato/ridotto reclutamento di giovani nella popolazione legato al rilascio di riproduttori sterili determinerà un crollo nella futura popolazione riproduttiva dei prossimi anni a partire dalla primavera 2015.

L'area di lavoro, ovvero la stazione denominata Casette (cod. 0709300), si trova su un lago di dimensioni relativamente contenute che, essendo alimentato da acque di risorgiva, non presenta né immissari né emissari. La popolazione del gambero invasivo che ospita può, pertanto, essere considerata "chiusa", ovvero soggetta ad un numero molto basso di eventi di immigrazione/emigrazione da corpi idrici limitrofi eventualmente invasi da questa specie. Lavorare con una popolazione "chiusa" (o che possiamo con buona approssimazione considerare tale) consente di poter valutare con maggiore accuratezza l'impatto prodotto sulla popolazione. Tale impatto si traduce nella riduzione dell'indice CPUE (popolazione catturata con le trappole in relazione allo sforzo di cattura) rilevato attraverso il monitoraggio standardizzato in anni successivi. L'indice CPUEi rappresenta la dimensione iniziale della popolazione, ovvero prima di intraprendere le attività di controllo.

Il lavoro condotto negli anni 2012-2014 può essere suddiviso in varie fasi di seguito descritte.

#### ANNO 2012, FASE I: IL MONITORAGGIO STANDARDIZZATO E L'INDICE CPUEi

Nella settimana del 26 settembre 2012 è stato condotto il monitoraggio standardizzato per il calcolo del CPUEi. La temperatura dell'acqua, parametro importante da registrare perché in grado di influenzare la mobilità dei gamberi e quindi la loro catturabilità, era di 18.7 °C senza oscillazioni di rilievo nell'arco dell'intero campionamento. L'indice **CPUEi era pari a 1.14** gamberi per nassa al giorno con una *sex ratio* fortemente sbilanciata verso i maschi (82% del totale degli esemplari catturati). In questo periodo infatti le femmine presentano scarsa (o nulla) attività locomotoria in quanto sono impegnate nella schiusa o nell'accudire la prole.

#### ANNO 2013, FASE II: IL TRAPPOLAGGIO INTENSIVO PER LA RACCOLTA DEI MASCHI DA STERILIZZARE

Dal 17 giugno al 13 luglio è stato effettuato un trappolaggio intensivo (temperatura media dell'acqua 25 °C) con il duplice scopo di raccogliere e selezionare i maschi da sottoporre a sterilizzazione e abbattere la popolazione presente. In 14 giorni di cattura sono stati raccolti **5927 esemplari**. Di questi, 840 maschi con caratteristiche idonee (ovvero maturità sessuale, lunghezza del cefalotorace maggiore di 40 mm ed entrambe le chele presenti con dimensioni adeguate) sono stati selezionati per essere sottoposti al trattamento di sterilizzazione, mentre tutti gli altri (5087 individui tra maschi non idonei al trattamento e femmine) sono stati rimossi dal sito e trasportati nei centri di stoccaggio delle peschate. I maschi selezionati per il trattamento sono invece stati trasportati all'acquario di Ariis e mantenuti in vasche opportunamente allestite.

#### ANNO 2013, FASE III: TRATTAMENTO PER INDURRE LA STERILITÀ E RILASCIO IN NATURA

Sono stati complessivamente **trattati 566 maschi con 20 Gy** in due sedute: 235 esemplari il 27 giugno e 331 il 3 luglio presso l'ospedale di Pordenone. La taglia dei maschi varia sensibilmente tra le due sedute (prima:  $50.53 \pm 0.32$  ES e seconda:  $47.48 \pm 0.27$  ES), in conseguenza della riduzione progressiva della taglia media del pescato, rimanendo comunque vicina alla taglia maggiormente scelta dalle femmine ( $49.87 \pm 2.5$ , Aquiloni & Gherardi 2008). Gli animali sono stati irraggiati seguendo i protocolli indicati in letteratura (Aquiloni et al. 2009), già descritti nel precedente report sulle attività condotte a Casette, con un costo complessivo per esemplare pari a 2.7 euro. Tale costo comprende anche la consulenza di un fisico per il necessario studio dosimetrico e può quindi potenzialmente diminuire per eventuali successivi trattamenti una volta consolidato l'iter da seguire da parte dell'ospedale di riferimento. Da notare, infatti, che nella seconda seduta sono stati trattati circa 100 gamberi in più con un notevole abbattimento del costo medio ad individuo (2.3 euro a individuo calcolando il costo sulla base dei dati della sola seconda seduta). Auspicabilmente il costo potrebbe scendere ancora attestandosi intorno a 1.5 euro.

Successivamente al trattamento gli animali sono stati marcati attraverso cauterizzazione dell'esoscheletro con un saldatore da campo. Questa marcatura offre notevoli vantaggi: è facile e veloce da applicare, permane anche dopo la muta dell'individuo rendendolo riconoscibile per lunghi periodi ed ha un basso costo. Un facile riconoscimento degli individui trattati anche oltre la durata del progetto è basilare per il successo della SMRT perché consentirà di rilasciare gli individui trattati eventualmente catturati nel corso di trappolaggi intensivi o di monitoraggi standardizzati. Gli esemplari trattati sono stati rilasciati in due diversi giorni: il primo gruppo di **235 esemplari il 28 giugno** e il secondo gruppo di **331 il 3 luglio**,

#### ANNO 2013, FASE IV: IL TRAPPOLAGGIO INTENSIVO POST-RILASCIO E LA STIMA DELLE DIMENSIONE DELLA POPOLAZIONE

Il rilascio degli maschi sterili marcati e le loro successive ricatture durante le attività di trappolaggio intensivo ci hanno consentito di stimare la dimensione della popolazione applicando il metodo di Schnabel.

La popolazione presente a Casette al termine delle catture intensive, ovvero il 13 luglio 2013, ammontava a **10.419 esemplari**.

Per ridurre ulteriormente la popolazione del gambero invasivo presente a Casette, l'ETP ha predisposto e realizzato una nuova sessione di catture massive attraverso un trappolaggio intensivo. Il trappolaggio è stato realizzato in autunno (temperatura media dell'acqua di 16 °C), dal 19 settembre al 23 ottobre 2013, ovvero una volta concluse gran parte della attività di campo estive che vedono quotidianamente impegnato il personale dell'Ente. Nell'arco di questo periodo di 35 giorni sono state condotte 9 pesche con la **rimozione di 743 esemplari**. Da rilevare, tuttavia, che uno sforzo analogo, in termini di numero di trappole e uomini impiegati, rispetto a quello utilizzato durante le pesche estive ha consentito la cattura di un numero decisamente minore di esemplari (743 contro 5927 dell'estate). A questa riduzione delle catture concorrono sia un reale abbattimento della popolazione dovuto agli interventi di rimozione effettuati sia una minore mobilità degli animali legata alle temperature autunnali più basse di circa 9 °C rispetto a quelle estive. L'eventuale riduzione della dimensione della popolazione potrà essere confermata solo attraverso un monitoraggio standardizzato con il rilevamento della temperatura dell'acqua che ci permetterà un effettivo confronto della situazione attuale rispetto a quella iniziale registrata prima degli interventi di rimozione.

#### ANNO 2014, FASE II: IL TRAPPOLAGGIO INTENSIVO PER LA RACCOLTA DEI MASCHI DA STERILIZZARE

Analogamente a quanto effettuato nel 2013, nel periodo tra il 24 aprile e il 15 luglio, è stato condotto un trappolaggio intensivo con lo scopo di selezionare i maschi da sottoporre al trattamento sterilizzante, oltre che, ovviamente, abbattere la popolazione con la rimozione delle femmine e dei maschi non idonei catturati. Rispetto all'anno precedente, tuttavia, il trappolaggio è stato anticipato ad aprile con l'obiettivo di riuscire a trattare un adeguato numero di maschi già in giugno, ovvero nel periodo in cui le gonadi dovrebbero essere maggiormente radiosensibili subendo quindi un maggior danno istologico a parità di radiazioni erogate (vedi report relativo all'azione A2 sullo sviluppo di tecniche innovative). Nonostante la raccolta di esemplari sia quindi iniziata circa tre settimane in anticipo, è stato difficile reperire maschi idonei per la sterilizzazione e ciò ha determinato un ritardo nelle successive operazioni di trattamento e rilascio. Complessivamente sono stati **raccolti 3927 esemplari** di cui solo 250 maschi sono stati selezionati per essere irraggiati nonostante presentassero una taglia decisamente inferiore a quella scelta dalle femmine ( $40.7 \pm 0.5$  mm invece di  $49.87 \pm 2.5$ , Aquiloni & Gherardi 2008). È importante notare che durante questi trappolaggi sono stati **ricatturati due maschi sterili del precedente anno** riconosciuti grazie alla marcatura per cauterizzazione. Questi maschi, immediatamente rilasciati, hanno dimostrato di essere in grado di sopravvivere a lungo termine al trattamento sterilizzante e alle attività di manipolazione/marcatura contribuendo così per la seconda stagione riproduttiva ad un abbattimento delle

nascite nella popolazione. L'esiguo numero degli animali ricatturati dopo circa un anno dal rilascio non stupisce data la dimensione stimata della popolazione presente a Casette di oltre 10.000 individui.

#### ANNO 2014, FASE III: TRATTAMENTO PER INDURRE LA STERILITÀ E RILASCIO IN NATURA

Il trattamento irraggiante è stato effettuato presso l'ospedale di Pordenone **il giorno 12 agosto**. Sia la marcatura degli esemplari per cauterizzazione che l'assistenza al personale ospedaliero che effettuava l'irraggiamento sono stati effettuati da personale ETP opportunamente addestrato e, ormai, pienamente autonomo nell'applicazione di questa tecnica innovativa di controllo. I **250 maschi** selezionati sono stati **irraggiati con 40 Gy**, ovvero con una dose doppia rispetto a quella utilizzata precedentemente. Questo perché esperimenti e analisi di laboratorio condotte nel corso del progetto proprio allo scopo di implementare la tecnica SMRT hanno dimostrato che una dose doppia consente di ottenere un maggior livello medio di sterilità maschile senza compromettere né la sopravvivenza né il comportamento sessuale degli individui trattati. Il trattamento ha richiesto circa un'ora dopodiché gli animali sono stati immediatamente rilasciati nel sito di Casette.

#### ANNO 2014, FASE IV: IL TRAPPOLAGGIO INTENSIVO POST-RILASCIO E LA STIMA DELLE DIMENSIONE DELLA POPOLAZIONE

A causa del protrarsi delle attività di trappolaggio per la selezione dei maschi sterili fino ad agosto e lo scarso rendimento per unità di ottenuto il precedente anno con il trappolaggio tardo estivo, questa fase non è stata attivata per il 2014.

#### ANNO 2014, FASE V: IL MONITORAGGIO STANDARDIZZATO E L'INDICE CPUE 2014

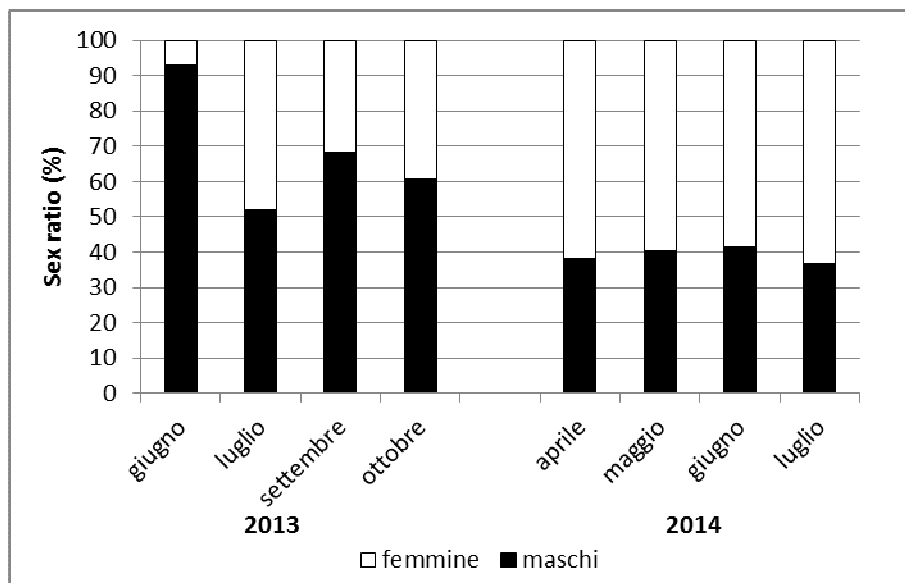
Al termine della attività di controllo della popolazione, è stato condotto un monitoraggio standardizzato per valutare l'effettivo impatto prodotto. Il monitoraggio è stato effettuato nella settimana del 29 settembre 2014 (temperatura media dell'acqua di 21.6 °C), ovvero in un periodo dell'anno analogo a quello del monitoraggio per il calcolo del CPUEi di due anni prima (settimana del 26 settembre 2012). Questa accortezza ha avuto lo scopo di minimizzare le eventuali differenze nella temperatura dell'acqua e nella propensione alla locomozione legata alla stagionalità del ciclo biologico della specie. Il numero totale degli esemplari catturati è stato di 6 corrispondente ad un **indice CPUE pari a 0.187**.

#### VALUTAZIONE DELL'IMPATTO SULLA POPOLAZIONE

Dal confronto del CPUE 2014 con il CPUEi, pari a 1.14, è possibile calcolare **una riduzione percentuale della popolazione di Casette pari all'87% in due soli anni di attività**. Questo risultato eccezionale è prevalentemente legato all'attività di trappolaggio intensivo in quanto gli effetti della tecnica SMRT saranno quantificabili solo nel medio-lungo periodo, già a partire dalla prossima stagione riproduttiva, quando

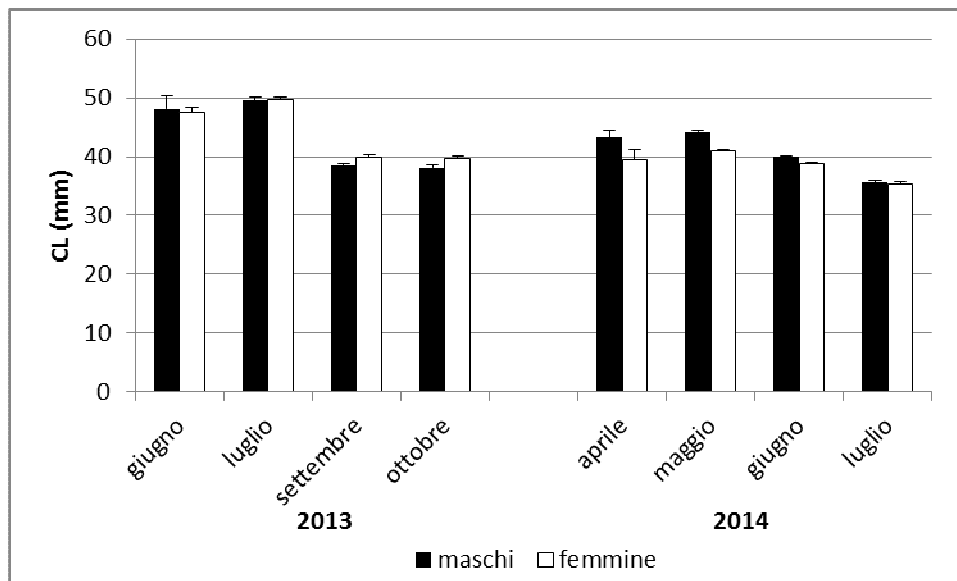
l'abbattimento delle nascite del 2013 conseguente al rilascio dei primi maschi trattati determinerà un crollo della popolazione riproduttiva.

Osservando la sex ratio calcolata nei mesi di trappolaggio intensivo 2013-2014 (Fig. 1) è possibile notare un drastico calo dei maschi nel secondo anno di attività (da 68% a 39%). Anche confrontando gli stessi mesi in anni diversi tale calo è evidente (giugno: da 93% a 38%; luglio: da 51% a 40%).



**Figura 1.** Sex ratio della popolazione di Casette durante le attività di trappolaggio intensivo 2013-2014

Analogamente, si riscontra anche una diminuzione della taglia media del pescato (Fig. 2) sia nei maschi che nelle femmine tra anni successivi (maschi:  $43.6 \pm 0.9$  contro  $40.7 \pm 0.5$ ; femmine:  $44.2 \pm 0.5$  contro  $38.6 \pm 0.7$ ) ed anche confrontando lo stesso mese in anni diversi (giugno:  $48.1 \pm 0.9$  contro  $40 \pm 0.21$  nei maschi e  $47.6 \pm 0.73$  contro  $40 \pm 0.27$  nelle femmine; luglio:  $49.5 \pm 0.51$  contro  $35.6 \pm 0.35$  nei maschi e  $49.6 \pm 0.44$  contro  $35.3 \pm 0.44$  nelle femmine).



**Figura 3.** Taglia media del pescato di maschi e femmine catturati nella stazione di Casette durante le attività di trappolaggio intensivo 2013-2014.

La spiegazione di questo evidente cambiamento nella struttura di popolazione è insita proprio nel sistema di rimozione. Il trappolaggio intensivo è efficace soprattutto sulla popolazione riproduttiva e avendo rimosso un maggior numero di maschi nel 2013 questo ha influenzato il rapporto nei riproduttori dell'anno successivo. Analogamente, il trappolaggio è in grado di influenzare anche la taglia media della popolazione perché la trappola favorisce la cattura (e quindi la rimozione) degli individui più grandi di entrambi i sessi che hanno una maggiore attività locomotoria ed un comportamento esplorativo più spiccato. Gli individui più giovani manifestano, inoltre, un evitamento attivo dei conspecifici di grande taglia molto più forti e vincenti nelle interazioni aggressive. La presenza di individui di grande taglia nelle trappole sarebbe quindi un deterrente all'ingresso di individui giovani. Queste profonde alterazioni nella struttura di popolazione sono evidenti anche perché si è assistito ad una diminuzione drastica della dimensione della popolazione, come evidenziato dal confronto del CPUEi con il CPUE 2014, così che il reclutamento di nuovi riproduttori e il loro tasso di accrescimento sono stati inferiori al prelievo effettuato col trappolaggio intensivo.

Questa riduzione complessiva della taglia del pescato favorisce il successo della SMRT in quanto aumenta la probabilità di accoppiamento dei maschi sterili, sempre scelti tra gli individui di taglia maggiore del campione pescato. Sappiamo infatti che le femmine scelgono maschi di taglia maggiore e che i maschi più grandi sono maggiormente capaci di trattenere la femmina durante la copula assicurandosi un efficace trasferimento di sperma all'interno dell'*annulus ventralis* della femmina.

#### INDICAZIONI GESTIONALI

I risultati ottenuti dall'applicazione di un approccio integrato di controllo basato sulla tecnica tradizionale del trappolaggio intensivo e di quella innovativa denominata SMRT hanno determinato un crollo dell'87% della popolazione in soli due anni. L'integrazione di queste due tecniche è opportuna non solo perché

colpisce due diversi *target* della stessa popolazione, i riproduttori e i giovani, ma anche perché consente di ottenere una maggiore e più duratura efficacia nel controllo della popolazione rispetto all'utilizzo del solo trappolaggio intensivo proprio per il mancato reclutamento di giovani legato al rilascio dei maschi sterili. Da sottolineare il fatto che l'integrazione di queste due tecniche riduce i costi legati alla sola SMRT in quanto il trappolaggio, che rappresenta di gran lunga l'attività più onerosa, consente la raccolta dei maschi da sottoporre al trattamento e contribuisce al loro successo riducendo il numero delle femmine e dei possibili competitori non trattati. Da notare, inoltre, che le operazioni di marcatura, assistenza del personale ospedaliero durante la sterilizzazione e rilascio dei maschi sterili nel sito di lavoro sono state svolte dal personale ETP, precedentemente formato da UNIFI, in piena autonomia a dimostrazione della reale applicabilità di questa tecnica innovativa anche da personale non esperto. La ridotta fertilità dei riproduttori rilasciati contribuirà al controllo della popolazione riducendo il reclutamento di giovani ma gli effetti ottenuti dall'applicazione della SMRT saranno quantificabili con precisione solo nei prossimi anni (sarebbe quindi importante includere il monitoraggio della stazione di Casette nell'*after-Life Plan*).

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Aquiloni L., Becciolini A., Trunfio C., Berti R. & Gherardi F. 2009. Managing invasive crayfish: use of X-ray sterilization of males. *Freshwater Biology*, 54: 10510-1519.
- Aquiloni L. & Gherardi F. 2008a. Mutual mate choice in crayfish: large body size is selected by both sexes, virginity by males only. *Journal of Zoology London*, 274: 171-179.
- Aquiloni L. & Gherardi F. 2008b. Extended mother-offspring relationships in crayfish: the return behaviour of *Procambarus clarkii* juveniles. *Ethology*, 114: 946-954.
- Figler, M.H., Blanck, G.S. & Peeke, H.V.S. (2005). Shelter competition between resident male red swamp crayfish *Procambarus clarkii* (Girard) and conspecific intruders varying by sex and reproductive status. *Mar. Freshwater Behav. Physiol.* 38, 237–248.
- Huner, J.V. (1992). Significance of burrows in crawfish management. *Aquacult. Mag.* 18, 6–10.
- Scholtz G, Braband A., Tolley L., Reimann A., Mittmann B., Lukhaup C., Steuerwald F. & Vogt G. 2002. Parthenogenesis in an outsider crayfish. *Nature*, 421: 806.
- Martin P, Dorn NJ, Kawai T, van der Heiden C, Scholtz G. 2010. The enigmatic Marmorkrebs (marbled crayfish) is the parthenogenetic form of *Procambarus fallax* (Hagen, 1870) *Contributions to Zoology* 79(3): 107-118.





## **La cattura di *Procambarus clarkii* attraverso l'impiego di esche feromonalì.**

### **PROTOCOLLI ED ESITO DELL'APPLICAZIONE IN CAMPO**

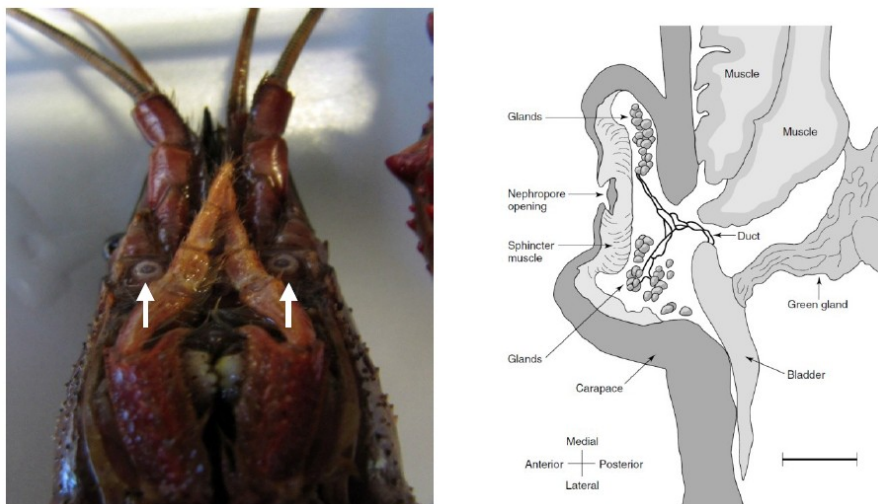


**Piero Giulianini**

*Università di Trieste, Dipartimento di Scienze della Vita*

## I FEROMONI

I feromoni, sostanze molto piccole presenti in determinati fluidi biologici (Hardege et al., 2002; Kamio et al., 2002; Zhang et al., 2010), 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 et al., 1988; Dunham e Oh, 1992; Bushmann e Atema, 1994; Stebbing et al., 2003a; b; Belanger e Moore, 2006; Corkum e Belanger, 2007), 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; Willman et al., 1994; Keller e Moore, 1999; Schneider e Moore, 2000), sulla determinazione dei confini del territorio, sulla struttura sociale (Schneider et al., 2001; Bergman et al., 2003), sull'acquisizione di cibo e l'orientamento (Kraus-Epley e Moore, 2002). Un particolare tipo di feromone, chiamato "feromone sessuale", è utilizzato dalle femmine sessualmente mature per attrarre i maschi (Stebbing et al., 2003a; b) tanto che essi, stimolati da queste sostanze, mostrano moduli comportamentali riproduttivi anche in assenza della femmina (Gleeson et al., 1987). Queste sostanze vengono rilasciate con l'urina e vengono prodotte nelle ghiandole a rosetta associate alla vescica urinaria che sbocca all'esterno mediante i 2 nefropori alla base delle seconde antenne (Fig. 1) (Ryan, 1966; Ameyaw-Akumfi e Hazlett, 1975; Gleeson, 1980, 1982; Seifert, 1982; Tierney et al., 1984; Atema, 1986; Schneider e Moore, 2000; Hardege et al., 2002; Kamio et al., 2002; Stebbing et al., 2003a; b).

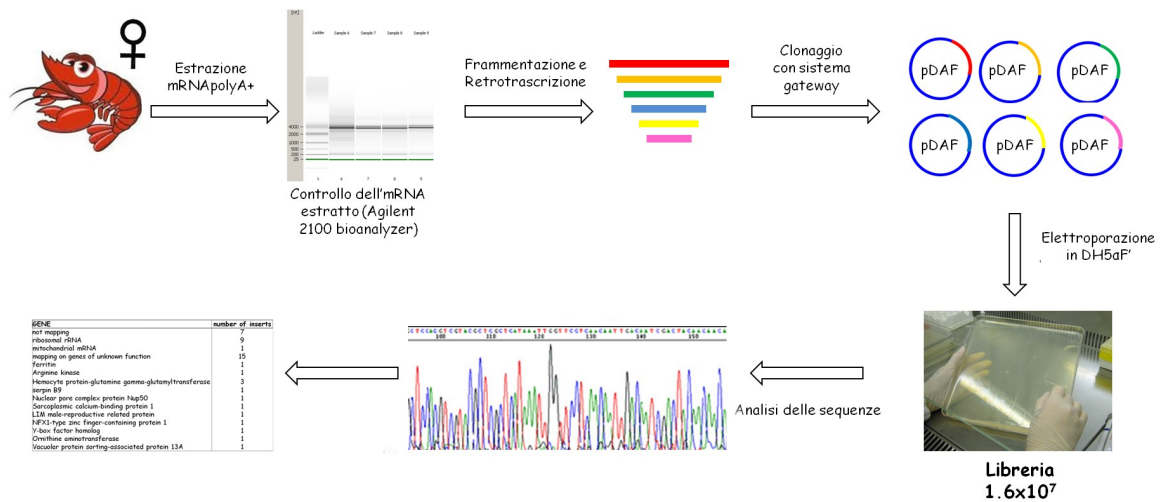


**Figura 1.** Foto dei nefropori di *P. clarkii* e schema delle ghiandole a rosetta associate alla ghiandola verde in Crostacei Decapodi (da Bushmann & Atema, 1996).

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 e Hallberg, 2005). La specie-specificità delle esche feromonal permetterebbe di catturare selettivamente maschi giovani maschi di *P. clarkii* con numerose stagioni riproduttive ancora davanti (Stebbing et al., 2003a; b; Aquiloni e Gherardi, 2010). Inoltre 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., 2003a; b) . Il sistema di esche specie-specifiche a feromoni rispetta tutte le condizioni succitate.

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

Per isolare, produrre e caratterizzare le molecole attrattive prodotte e rilasciate dalle femmine sessualmente mature di *P. clarkii* si è usata una tecnica denominata libreria di espressione in phage-display. Per la creazione della libreria (Fig. 2) è stato estratto RNA totale da tessuti (ghiandole a rosetta associate alla ghiandola verde) disecati a partire da femmine di *P. clarkii* in periodo riproduttivo (testate attraverso esperimenti comportamentali dall'Università di Firenze).



**Figura 2.** Schema della costruzione della libreria di feromoni sessuali di *P. clarkii*.

L'RNA messaggero purificato dall'RNA totale è stato frammentato al calore, al fine di ottenere frammenti in grado di codificare piccoli peptidi (250-500 bp). I frammenti così ottenuti sono stati retrotrascritti, amplificati e successivamente clonati in accordo con il sistema di clonaggio proposto dal metodo gateway. È stata ottenuta una libreria di  $1.6 \times 10^7$  cloni. La qualità della libreria, verificata attraverso il sequenziamento, ha consentito di procedere con le selezioni delle molecole più reattive. Le selezioni sono state eseguite mediante interazione su antennule, sede dei recettori per i feromoni sessuali (Carr et al., 1987), di esemplari maschi di *P. clarkii* in fase riproduttiva ovvero con morfotipo F1 e stadio E. Nei Crostacei Decapodi le antennule sono l'organo chemosensoriale 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 (Monteclaro et al., 2010). Il flagello laterale viene usato per la ricerca di cibo (Atema et al., 1988; Laverack, 1988; Giri e Dunham, 1999; Steullet et al., 2001, 2002), per captare i feromoni sessuali (Ameyaw-Akumfi e Hazlett, 1975; Gleeson, 1982; Kamio et al., 2005) e le molecole di comunicazione sociale, media la percezione degli odori (Giri e Dunham, 1999) e la discriminazione del sesso (Ameyaw-Akumfi e Hazlett, 1975; Dunham e Oh, 1992).

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



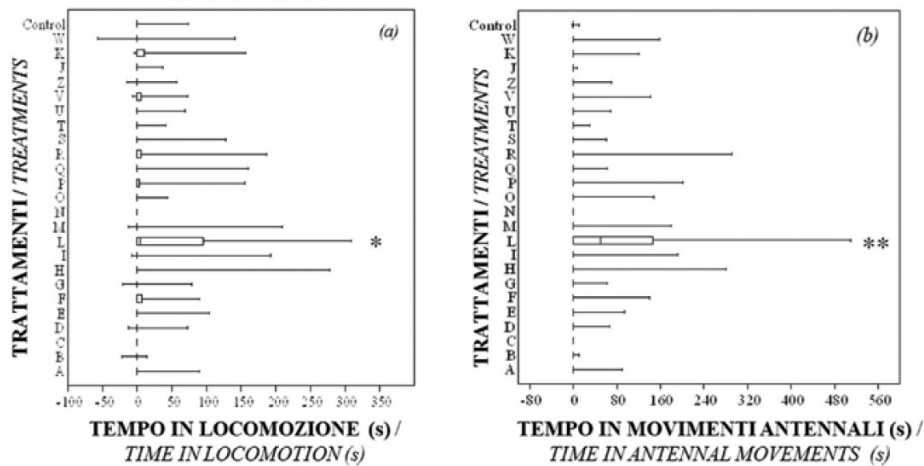
**Figura 3.** Preparazione delle antennule per la selezione

La libreria ottenuta è una collezione di milioni di fagi (virus che infettano i batteri) ognuno dei quali esprime un peptide (feromone putativo) diverso. I fagi possono essere selezionati attraverso il loro legame specifico con i recettori presenti sulle antennule. Alla fine della selezione, la libreria risulta composta (arricchita) da una frazione di fagi che si legano ai recettori. Sono state allestite 24 selezioni di cui 22 su antennule, 1 su zampa e 1 su antenna, queste ultime considerate come controlli negativi. Le librerie selezionate sono state raccolte e utilizzate per la produzione di fagi specifici che sono stati poi quantificati e liofilizzati. In collaborazione con l'Università di Firenze sono stati allestiti i saggi comportamentali per valutare la capacità attrattiva dei pool fagici su maschi di *P. clarkii* in periodo ricettivo.

#### **Bioassay per la selezione della libreria di espressione in phage-display**

Il *bioassay* consisteva in osservazioni del comportamento in due fasi successive di 25 maschi sessualmente riproduttivi: (1) una fase di controllo in cui 20 mL di soluzione fisiologica erano rilasciati per mezzo di una siringa sterile nell'acqua nel lato opposto dell'acquario rispetto a quello occupato dalla tana e (2) una fase sperimentale in cui erano somministrati, con la stessa modalità della fase di controllo, 20 mL di soluzione di trattamento (fisiologica con uno dei 24 pool fagico). Nei test di controllo anche durante la seconda fase veniva somministrata la sola soluzione fisiologica. Il comportamento era osservato in ciascuna delle due fasi per tre minuti (tempo sufficiente nei gamberi a mostrare eventuali alterazioni del comportamento in risposta ad uno stimolo; vedi Acquistapace et al., 2002) a partire dalla prima reazione dell'animale test. Il tempo intercorso tra il rilascio della soluzione e la prima reazione dell'animale è stato registrato come tempo di latenza. Successivamente è stata calcolata la differenza tra la durata dei parametri registrati tra fase sperimentale e di controllo ed il tempo netto ottenuto è stato analizzato con appropriati test statistici. Il tempo medio di latenza è 245 sec (*range* da 120 a 475), indipendentemente dal pool fagico somministrato (H: 22.98, P=0.4). Generalmente la somministrazione della soluzione determina un complessivo incremento dell'attività di locomozione senza però rilevare differenze significative con il controllo ad eccezione che nel pool L in cui aumenta sensibilmente (Fig. 4a). Come per la locomozione, anche i movimenti antennali aumentano significativamente solo in seguito alla somministrazione del pool L (Fig. 4b).





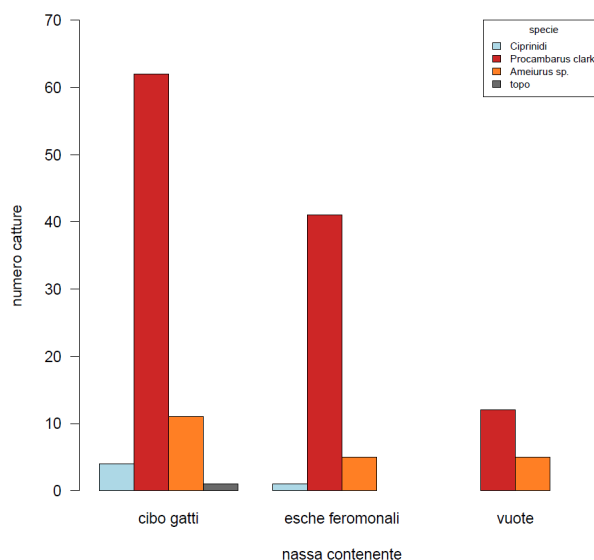
**Figura 4.** *Box plot* relativi al tempo netto speso in locomozione orientata (a) e in movimenti antennali (b) in seguito alla somministrazione del trattamento. Il confronto tra trattamenti (N=24 per pool) è stato analizzato con il *Friedman test* seguito da un *pairwise Wilcoxon test*. Uno e due asterischi denotano una differenza significativa dal controllo di  $P < 0.01$  e  $P < 0.001$ , rispettivamente.

Nessuna alterazione comportamentale, tipo apatia o anoressia, è stata osservata per l'intera durata dei test né vi sono stati decessi tra gli animali sperimentali. Gli animali, quando erano prossimi alla zona di rilascio dello stimolo, muovevano le antenne prevalentemente sulla superficie dell'acqua descrivendo ampi settori circolari e battevano ritmicamente le antennule. Spesso questo movimento era accompagnato dal sollevamento dell'animale lungo le pareti dell'acquario e da un veloce movimento dei massillipedi e dei chelipedi spingendo l'acqua verso la bocca. Queste azioni erano compiute in modo stereotipato negli animali e sono state manifestate con buona frequenza solo in alcuni trattamenti: in L nel 77% dei casi (10 su 13 animali reattivi), in K nel 50% dei casi (3 su 6 reattivi) e in F nel 40% dei casi (2 su 5 reattivi).

#### **Allestimento di esche feromonalì e prove in campo**

Visti i risultati del saggio biologico si è deciso di allestire esche di alginato contenenti i fagi della selezione n. 9 (corrispondente alla L nei test di *Bioassay* sopra descritti) per testare la loro capacità attrattiva sul campo. Individuate le molecole attrattive è infatti necessario inserirle in una matrice di gel che ne permetta un rilascio graduale per diverse ore in acqua al fine di massimizzare le catture. Si è deciso di usare una matrice di alginato per la sua particolare proprietà di gelificare in presenza di cloruro di calcio (Smidsrød e Skjåk-Braek, 1990). 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 (Smidsrød e Skjåk-Braek, 1990). L'esca feromonale testata in campo è costituita da una piastra petri in policarbonato da 10 cm di diametro, al cui interno è presente un gel di alginato di sodio al 2% contenente il pool fagico n. 9. La piastra petri presenta la superficie forata per permettere un lento rilascio in acqua dei peptidi contenuti nella matrice di alginato. In collaborazione con l'ETP sono state allestite 2 prove di cattura presso un piccolo corso d'acqua (Villutta, Pordenone) mediante 30 nasse, poste a una distanza di 10 m l'una dall'altra seguendo la direzione della corrente. Le prime 10 senza esca, le successive 10 con le esche feromonalì e le ultime 10 contengono contenenti l'esca usata per i monitoraggi (scatoletta di cibo per gatti forata). La prima prova ha evidenziato che le nasse contenenti le esche feromonalì hanno permesso la cattura di 20 esemplari di *P. clarkii* con un rapporto maschi/femmine di 3/1, ma il basso numero di animali catturati (62 in totale) ha impedito un'analisi statistica dei dati. Nel secondo esperimento il numero degli animali catturati con le 30

nasse è risultato ancora inferiore (38 in totale). Questi risultati hanno portato alla decisione di effettuare una terza prova nel canale Brancoletto, sede del monitoraggio sulla condizione riproduttiva di *P. clarkii*, sempre con 30 nasse, posizionate come riportato precedentemente. In questa prova le nasse contenenti le esche feromonalì hanno permesso la cattura di 41 esemplari di *P. clarkii*, quelle vuote di 12 esemplari e quelle con il cibo per gatti di 62 esemplari. In questa prova, il numero degli animali catturati con le nasse contenenti le esche feromonalì è significativamente superiore a quello delle nasse vuote (confronto a coppie con il metodo “Wilcoxon rank sum test” con la correzione di Bonferroni,  $p=0.0059$ ) ma non significativamente inferiore a quello delle nasse contenenti l'esca trofica (confronto a coppie con il metodo “Wilcoxon rank sum test” con la correzione di Bonferroni,  $p=0.1172$ ). Inoltre la percentuale di animali catturati con le esche feromonalì rispetto al totale (35.65%) è superiore alla percentuale di animali catturati con nasse contenenti femmine sessualmente attrattive riportato in letteratura (21.25% di esemplari catturati rispetto al totale – nasse con cibo, contenenti maschi o femmine mature, Aquiloni e Gherardi, 2010). È da evidenziare come le nasse contenenti le esche feromonalì abbiano catturato 5 esemplari di specie non target rispetto alle nasse contenenti cibo per gatti che ne contenevano 16 (Fig. 5). Le esche feromonalì così formulate risultano perciò più attrattive delle femmine mature, specie-specifiche anche se meno (ma non significativamente) attrattive rispetto alle esche trofiche.



**Figura 5.** Catture totali con 10 nasse contenenti esche trofiche, 10 contenenti le esche feromonalì e 10 vuote (controllo) di: *P. clarkii* (rosso), Ciprinidi (azzurro), pesci gatto (ocra) e Roditori (grigio).

### Prospettive e conclusioni sull'applicabilità dei feromoni sessuali

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. Le analisi e le osservazioni comportamentali hanno evidenziato che il pool L (selezione n. 9) sembra essere l'unico in grado di aumentare sia l'attività di locomozione degli animali sia i movimenti antennali e, insieme ai pool K e F, di produrre un comportamento di ricerca stereotipato in prossimità della sorgente di rilascio dello stimolo. Tuttavia, queste putative sostanze feromonalì sembrano diffondere prevalentemente sulla superficie dell'acqua: occorrono infatti in media 4-5 minuti in un acquario di 5.5 L di acqua affinché l'animale percepisca qualcosa sulla superficie mentre una parte del segnale chimico rimane concentrato in prossimità della zona di rilascio attaccandosi alle pareti



della vasca. Questo comportamento chimico sembra tipico di una molecola idrofobica e, da un punto di vista eco-evolutivo, potrebbe svolgere la funzione di un feromone di contatto utile per il riconoscimento del sesso di un conspecifico a breve distanza ma non applicabile come attrattivo su lunghe distanze. D'altra parte i risultati di cattura nelle prove in campo evidenziano che l'esca allestita con la selezione n. 9 di fagi è capace di attrarre esemplari di *P. clarkii* in modo specie-specifico e significativo, anche se inferiore alle esche trofiche. Ulteriori approfondimenti sono necessari per valutare l'applicabilità di queste sostanze per il controllo di popolazioni naturali ma la tecnica qui utilizzata per la loro individuazione costituisce senza dubbio una svolta significativa nelle ricerche del settore.

### **Bibliografia**

- Acquistapace P, Aquiloni L, Hazlett BA & Gherardi F. 2002. Multimodal communication in crayfish: sex recognition during mate search by male *Austropotamobius pallipes*. *Canadian Journal Zoology*, 80: 2041-2045.
- Ameyaw-Akumfi C & Hazlett BA. 1975. Sex recognition in the crayfish *Procambarus clarkii*. *Science*, 190:1225–1226.
- Aquiloni L & Gherardi F. 2010. The use of sex pheromones for the control of invasive populations of the crayfish *Procambarus clarkii*: a field study. *Hydrobiologia*, 649:249–254.
- Atema J, Fay RR, Popper AN & Tavalga WN. 1988. *Sensory biology of aquatic animals*. Springer New York, NY:
- Atema J. 1986. Review of Sexual Selection and Chemical Communication in the Lobster, *Homarus americanus*. *Can J Fish Aquat Sci*, 43:2283–2290.
- Belanger RM & Moore PA. 2006. The use of the major chelae by reproductive male crayfish (*Orconectes rusticus*) for discrimination of female odours. *Behaviour*, 143:713–732.
- Bergman DA, Kozlowski CP, McIntyre JC, Huber R & Daws AG. 2003. Temporal dynamics and communication of winner-effects in the crayfish *Orconectes rusticus*. *Behaviour*, 140:805–825.
- Bushman P & Atema J. 1994. Aggression-reducing courtship signals in the lobster, *Homarus americanus*. *Biol Bull*, 187:275–276.
- Carr WE, Ache B & Gleeson RA. 1987. Chemoreceptors of crustaceans: similarities to receptors for neuroactive substances in internal tissues. *Environ Health Perspect*, 71:31–46.
- Corkum LD & Belanger RM. 2007. Use of chemical communication in the management of freshwater aquatic species that are vectors of human diseases or are invasive. *Gen Comp Endocrinol*, 153:401–417.
- Dunham DW & Oh JW. 1992. Chemical sex discrimination in the crayfish *Procambarus clarkii*: Role of antennules. *J Chem Ecol*, 18:2363–2372.
- Ekerholm & Hallberg E. 2005. Primer and Short-Range Releaser Pheromone Properties of Premolt Female Urine from the Shore Crab *Carcinus maenas*. *J Chem Ecol*, 31:1845–1864.
- Giri T & Dunham DW. 1999. Use of the inner antennule ramus in the localisation of distant food odours by *Procambarus clarkii* (Girard, 1852)(Decapoda, Cambaridae). *Crustaceana*, 123–127.
- Gleeson RA, Adams MA & Smith AB. 1987. Hormonal Modulation of Pheromone-Mediated Behavior in a Crustacean. *Biol Bull*, 172:1–9.



- Gleeson RA. 1980. Pheromone communication in the reproductive behavior of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Mar Behav Physiol*, 7:119–134.
- Gleeson RA. 1982. Morphological and Behavioral Identification of the Sensory Structures Mediating Pheromone Reception in the Blue Crab, *Callinectes Sapidus*. *Biol Bull*, 163:162–171.
- Hardege JD, Jennings A, Hayden D, Müller CT, Pascoe D, Bentley MG & Clare AS. 2002. Novel behavioural assay and partial purification of a female-derived sex pheromone in *Carcinus maenas*. *Mar Ecol Prog Ser*, 244:179–189.
- Hazlett BA. 1990. Source and nature of disturbance-chemical system in crayfish. *J Chem Ecol*, 16:2263–2275.
- Hazlett BA. 1994. Crayfish feeding responses to zebra mussels depend on microorganisms and learning. *J Chem Ecol*, 20:2623–2630.
- Kamio M, Araki M, Nagayama T, Matsunaga S & Fusetani N. 2005. 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*, 208:12–19.
- Kamio M, Matsunaga S & Fusetani N. 2002. Copulation pheromone in the crab *Telmessus cheiragonus* (Brachyura: Decapoda). *Mar Ecol Prog Ser*, 234:183–190.
- Keller TA & Moore PA. 1999. Effects of ontogeny and odors on behavior: The influence of crayfish size and fish odors on crayfish movement. *Mar Freshw Behav Physiol*, 33:35–50.
- Kraus-Epley KE & Moore PA. 2002. Bilateral and Unilateral Antennal Lesions Alter Orientation Abilities of the Crayfish, *Orconectes rusticus*. *Chem Senses*, 27:49–55.
- Laverack MS. 1988. The Diversity of Chemoreceptors. In: Atema J, Fay RR, Popper AN, Tavolga WN, editors. *Sensory Biology of Aquatic Animals*. Springer New York. p 287–312. Available from: [http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-3714-3\\_11](http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4612-3714-3_11)
- Monteclaro HM, Anraku K & Matsuoka T. 2010. Response properties of crayfish antennules to hydrodynamic stimuli: functional differences in the lateral and medial flagella. *J Exp Biol*, 213:3683–3691.
- Ryan EP. 1966. Pheromone: Evidence in a Decapod Crustacean. *Science*, 151:340–341.
- Schneider RAZ, Huber R & Moore PA. 2001. Individual and status recognition in the crayfish, *Orconectes rusticus*: the effects of urine release on fight dynamics. *Behaviour*, 138:137–154.
- Schneider RAZ & Moore PA. 2000. Urine as a source of conspecific disturbance signals in the crayfish *Procambarus clarkii*. *J Exp Biol*, 203:765–771.
- Seifert P. 1982. Studies on the sex pheromone of the shore crab, *Carcinus maenas*, with special regard to ecdysone excretion. *Ophelia*, 21:147–158.
- Smidsrød O & Skjåk-Braek G. 1990. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* 8:71–78.
- Stebbing PD, Bentley MG & Watson GJ. 2003a. Mating Behaviour and Evidence for a Female Released Courtship Pheromone in the Signal Crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *J Chem Ecol*, 29:465–475.
- Stebbing PD, Watson GJ, Bentley MG, Fraser D, Jennings R, Rushton SP & Sibley PJ. 2003b. Reducing the threat: the potential use of pheromones to control invasive signal crayfish. *Bull Francais Peche Piscic*, 370:219–224.





- Steullet P, Dudar O, Flavus T, Zhou M & Derby CD. 2001. 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*, 204:4259–4269.
- Steullet P, Krütfeldt DR, Hamidani G, Flavus T, Ngo V & Derby CD. 2002. Dual antennular chemosensory pathways mediate odor-associative learning and odor discrimination in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. *J Exp Biol*, 205:851–867.
- Tierney AJ, Thompson CS & Dunham DW. 1984. Site of Pheromone Reception in the Crayfish *Orconectes propinquus* (Decapoda, Cambaridae). *J Crustac Biol*, 4:554.
- Willman EJ, Hill AM, Lodge DM. 1994. Response of Three Crayfish Congeners (*Orconectes* spp.) to Odors of Fish Carrion and Live Predatory Fish. *Am Midl Nat*, 132:44.
- Zhang D, Lin J, Harley M, Hardege JD. 2010. Characterization of a sex pheromone in a simultaneous hermaphroditic shrimp, *Lysmata wurdemanni*. *Mar Biol*, 157:1–6.