
RARITY

**ERADICAZIONE DEL GAMBERO ROSSO DELLA LOUISIANA
E PROTEZIONE DEI GAMBERI DI FIUME DEL FRIULI VENEZIA GIULIA**

***ERADICATE INVASIVE LOUISIANA RED SWAMP AND PRESERVE
NATIVE WHITE CLAWED CRAYFISH IN FRIULI VENEZIA GIULIA***



www.life-rarity.eu



RARITY



ERADICAZIONE DEL GAMBERO ROSSO DELLA LOUISIANA
E PROTEZIONE DEI GAMBERI DI FIUME DEL FRIULI VENEZIA GIULIA

*ERADICATE INVASIVE LOUISIANA RED SWAMP AND PRESERVE
NATIVE WHITE CLAWED CRAYFISH IN FRIULI VENEZIA GIULIA*

RARITY TEAM

Coordinator

- ETP (Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia)

Partners

- CNR-ISMAR (National Research Council, Institute of Marine Sciences, Venice)
- UNITS (University of Trieste, Department of Life Sciences)
- UNIFI (University of Florence, Department of Biology)
- IZSve (Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie)

Supporter

- Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia

Cover photos

- Giorgio De Luise, Paolo Cè

Ogni parte di questo manuale può essere riprodotta o trasmessa in qualsiasi forma e con qualsiasi mezzo purché ne siano citati l'autore o gli autori come di seguito suggerito:

Autore/i, Titolo, 2014. In: "RARITY. Eradicazione del gambero rosso della Louisiana e protezione dei gamberi di fiume del Friuli Venezia Giulia". Pubblicazione realizzata con il contributo finanziario della CE, nell'ambito del progetto RARITY, LIFE10 NAT/IT/000239, pp. 144.

Each part of this volume can be reproduced or diffused in any form and by any mean under the condition that author or authors should be cited according to the following indications:

Author/s, Title, 2014. In: "RARITY. Eradicate invasive Louisiana red swamp and preserve native white clawed crayfish in Friuli Venezia Giulia". Published by the financial contribution of the EC within the RARITY project LIFE10 NAT/IT/000239, pp. 144.

Indice

<p>4 PREFAZIONE PREFACE</p>	<p>39 M. Zanetti, A. Rucli, F. Scapini, F. Giovannelli & L. Aquiloni IL MONITORAGGIO DELLE POPOLAZIONI SELVATICHE ----- MONITORING</p>	<p>73 F. Piazza, L. Aquiloni, C. Manfrin, S. Simi, M. Duse Masin, F. Florian, L. Marson, L. Peruzza, M. Borgogna, S. Paoletti, L. Bonzi, F. Scapini, P. Faraoni, M. Balzi, P. Edomi, P. G. Giulianini MESSA A PUNTO DI METODI INNOVATIVI PER IL CONTENIMENTO E LA CATTURA DI <i>P. CLARKII</i> ----- DEVELOPMENT OF METHODS FOR THE CONTAINMENT AND THE CAPTURE OF <i>P. CLARKII</i></p>	<p>117 A. Manfrin & T. Pretto ASPETTI SANITARI E PREVENZIONE DELLE MALATTIE ----- ASPECTS OF HEALTH AND DISEASE PREVENTION</p>
<p>7 M. Zanetti IL PROGETTO LIFE10 NAT/IT/000239 "RARITY"</p>	<p>49 M. Zanetti, A. Rucli & L. Aquiloni PROTOCOLLI DI RISPOSTA RAPIDA (EDRR- EARLY DETECTION RAPID RESPONSE) ----- EARLY DETECTION RAPID RESPONSE (EDRR)</p>	<p>89 V. Bertucci, C. Manfrin & A. Pallavicini L'ANALISI GENETICA DELLE POPOLAZIONI DEL FRIULI VENEZIA GIULIA ----- GENETIC CHARACTERIZATION OF THE <i>A. PALLIPES</i> COMPLEX POPULATIONS IN FRIULI VENEZIA GIULIA</p>	<p>127 T. Scovacricchi, F. Acri, M. Botter, D. Cassin & N. Nesto CONOSCENZA PREVENZIONE CONSAPEVOLEZZA PARTECIPAZIONE <i>RARITY</i> E LA SFIDA DELLA DISSEMINAZIONE ----- KNOWLEDGE PREVENTION AWARENESS PARTICIPATION <i>RARITY</i> AND THE CHALLENGE OF DISSEMINATION</p>
<p>10 LIFE10 NAT/IT/000239 RARITY PROJECT</p>	<p>58 EARLY DETECTION RAPID RESPONSE (EDRR)</p>	<p>99 L. Aquiloni & M. Zanetti APPROCCIO INTEGRATO DI TRAPPOLAGGIO INTENSIVO ED SMRT PER IL CONTROLLO DI <i>PROCAMBARUS CLARKII</i> NEL SITO DI CASSETTE ----- INTEGRATED INTENSIVE TRAPPING AND SMRT APPROACH FOR THE CONTROL OF <i>PROCAMBARUS CLARKII</i>: THE CASSETTE CASE STUDY</p>	<p>133 RINGRAZIAMENTI ACKNOWLEDGEMENTS</p>
<p>13 M. Zanetti & G. De Luise L'ALLEVAMENTO E IL RIPOPOLAMENTO ----- BREEDING AND RESTOCKING</p>	<p>61 M. Zanetti, F. Giovannelli & L. Aquiloni INDIVIDUAZIONE DELLE AREE A RISCHIO DI PROSSIMA STABILIZZAZIONE DI POPOLAZIONI DI <i>PROCAMBARUS CLARKII</i> ----- AREAS AT RISK OF INVASION OF THE POPULATIONS OF <i>PROCAMBARUS CLARKII</i> IN THE NEAR FUTURE</p>	<p>108 GENETIC CHARACTERIZATION OF THE <i>A. PALLIPES</i> COMPLEX POPULATIONS IN FRIULI VENEZIA GIULIA</p>	<p>131 KNOWLEDGE PREVENTION AWARENESS PARTICIPATION <i>RARITY</i> AND THE CHALLENGE OF DISSEMINATION</p>
<p>24 BREEDING AND RESTOCKING</p>	<p>62 AREAS AT RISK OF INVASION OF THE POPULATIONS OF <i>PROCAMBARUS CLARKII</i> IN THE NEAR FUTURE</p>	<p>113 L. Aquiloni & M. Zanetti APPROCCIO INTEGRATO DI TRAPPOLAGGIO INTENSIVO ED SMRT PER IL CONTROLLO DI <i>PROCAMBARUS CLARKII</i> NEL SITO DI CASSETTE ----- INTEGRATED INTENSIVE TRAPPING AND SMRT APPROACH FOR THE CONTROL OF <i>PROCAMBARUS CLARKII</i>: THE CASSETTE CASE STUDY</p>	<p>133 RINGRAZIAMENTI ACKNOWLEDGEMENTS</p>
<p>29 M. Zanetti & A. Rucli CONTRASTO ALLA DIFFUSIONE DEL GAMBERO ROSSO DELLA LOUISIANA <i>PROCAMBARUS CLARKII</i> ----- COMBATING THE SPREAD OF THE LOUISIANA RED SWAMP CRAYFISH <i>P. CLARKI</i></p>	<p>63 L. Aquiloni, F. Giovannelli, G. Mazza, A. F. Inghilesi & F. Scapini GLI IMPATTI PRODOTTI DAL GAMBERO INVASIVO E LE PRINCIPALI VIE DI INGRESSO DELLA SPECIE IN FRIULI VENEZIA GIULIA ----- IMPACT</p>	<p>115 INTEGRATED INTENSIVE TRAPPING AND SMRT APPROACH FOR THE CONTROL OF <i>PROCAMBARUS CLARKII</i>: THE CASSETTE CASE STUDY</p>	<p>137 ALLEGATI ANNEXES</p>
<p>33 COMBATING THE SPREAD OF THE LOUISIANA RED SWAMP CRAYFISH <i>P. CLARKI</i></p>	<p>69 IMPACT</p>		
<p>35 M. Zanetti & M.R. Mulas UNA NUOVA NORMATIVA ----- A NEW LEGISLATION</p>			
<p>37 A NEW LEGISLATION</p>			

Prefazione



Il progetto RARITY ha rappresentato un'importante occasione di crescita. Sono migliorate le conoscenze sui gamberi di acqua dolce del Friuli Venezia Giulia, in particolare sugli aspetti genetici, sanitari e popolazionali. Sono state affinate le capacità operative del personale dell'Ente tutela pesca che si è occupato, da dipendente o da volontario, dell'allevamento e del ripopolamento dei gamberi autoctoni, del contrasto al gambero rosso della Louisiana, del monitoraggio, della gestione del progetto stesso.

È aumentata anche la consapevolezza del pubblico generico e di alcune categorie maggiormente interessate dai problemi creati dalle specie alloctone, in grado di incidere sulla nostra salute, sulle attività economiche e sulla conservazione degli ambienti che caratterizzano da sempre il nostro territorio e che, grazie all'intensa campagna di informazione, RARITY ha presentato a innumerevoli corsi, conferenze, seminari, workshop, fiere e mostre.

Con RARITY è migliorata anche la capacità di lavorare all'interno di un partenariato di primo livello, che ha consentito di accrescere la competenza e la visibilità non solo dell'Ente tutela pesca, ma di tutto il gruppo di lavoro, a cui va il merito di aver saputo sempre interagire sinergicamente per il conseguimento dei risultati prefissati.

Il progetto RARITY sta per terminare ma l'ETP non cessa il proprio impegno per quanto riguarda la conservazione delle specie che popolano i fiumi della regione, impegno che prosegue con il progetto di recupero della trota marmorata, con l'attività di selezione e allevamento del temolo adriatico, con il rafforzamento delle popolazioni di anguilla. Un impegno a tutto tondo che ci vedrà presto al lavoro per la predisposizione del Piano d'azione per la tutela dei gamberi di fiume: un nuovo documento di pianificazione introdotto nella nostra legislazione, grazie all'impulso dato dal progetto stesso, che vuole consentire in futuro a tutti i soggetti deputati al controllo e alla gestione del territorio, anche in assenza di finanziamenti straordinari, di poter applicare le migliori strategie per il contenimento delle specie alloctone invasive e dei problemi causati dalla loro presenza.

Un doveroso ringraziamento a quanti – sono tantissimi – hanno operato per la buona riuscita del progetto ed in particolare a coloro che lo hanno fatto a titolo di volontariato.

Giovanni Petris
Direttore ETP



Il progetto Rarity e la costante collaborazione con gli istituti dediti alla ricerca sono stati voluti e cercati con convinzione dal Consiglio direttivo dell'Ente tutela pesca.

Se davvero vogliamo rendere sempre più efficaci le strategie e le azioni per tutelare le specie a rischio, non possiamo prescindere da rapporti di collaborazione sempre più stretti tra i vari soggetti coinvolti. In tal senso l'Ente si sta adoperando per creare nuove collaborazioni con i vicini europei.

Forti dell'esperienza acquisita in questi anni e visti gli ottimi risultati del progetto che sta per concludersi, siamo già al lavoro per realizzare un nuovo progetto, sempre nell'ambito dei programmi comunitari, dedicato alla trota marmorata da portare avanti assieme ad altre regioni italiane.

Al tempo stesso, cerchiamo di favorire negli anni a venire il connubio tra la pesca e l'ambiente, rendendola sempre più sostenibile. Intendiamo perciò mettere a disposizione del settore dell'acquacoltura le nostre conoscenze in modo tale da rendere i processi sempre meno impattanti sull'ambiente.

Questo progetto, dedicato all'eradicazione del gambero rosso e alla salvaguardia del gambero di fiume, pone anche le basi per avviare possibili iniziative analoghe su altre specie alloctone, purtroppo presenti nelle nostre acque e particolarmente impattanti per gli equilibri delle popolazioni ittiche.

La felice conclusione del progetto Rarity rappresenta per l'ETP il segno tangibile di una capacità operativa evidenziata dal forte e costante lavoro svolto in questi mesi e conferma la qualità dell'impegno portato avanti dall'intera struttura.

Flaviano Fantin
Presidente ETP

Preface

The RARITY project represented an important opportunity for growth.

Knowledge improved of the freshwater crayfish of Friuli Venezia Giulia and in particular the genetic, health and population aspects. The working skills of staff at the fish protection agency were sharpened after they dealt with, either as employee or volunteer, the rearing and restocking of native crayfish, combating of the Louisiana red swamp crayfish and monitoring and management of the project itself. Awareness increased in the general public and some categories most affected by the problems created by the alien species, capable of affecting our health, economic activities and the preservation of the environments which have been a permanent feature of our area and which, thanks to an intensive information campaign, RARITY has presented at countless courses, lectures, seminars, workshops, trade shows, exhibitions etc.

With RARITY the capacity also improved for working as part of a top-level partnership, allowing increased competency and visibility not only of the fish protection agency but also of the entire work group, who should be credited with having succeeded in always interacting synergically to achieve the results set. The RARITY project is coming to an end but the agency is ceaselessly committed to conserving the species that populate the rivers in the region, a commitment which continues with the project for saving the marble trout, selection and rearing of the grayling and boosting of the eel populations. All-round commitment which will soon see us at work to prepare the action plan for protecting river crayfish. A new planning document introduced into our legislation, thanks to the project itself, which sets out to enable in the future all those assigned control and management of the territory, also without extra funding, to be able to apply the best strategies for limiting invasive alien species and the problems caused by their presence.

Thanks are due to the very many people who worked towards the success of the project and in particular those who did so on a volunteer basis.

Giovanni Petris
ETP Directorate

The Governing Council of the Ente tutela pesca firmly wanted and sought for the project RARITY and for the constant collaboration of research institutes.

If we really want to make more effective the strategies and the actions devoted to protect endangered species, we can not ignore to increase collaboration relationships between the various parties involved. In this sense, the Ente tutela pesca is working to create new partnerships with its European neighbors. Strong experience gained in recent years and given the excellent results of the project that is about to end, we are already working on a new project, always under Community programs, dedicated to trout to be pursued together with other Italian regions.

At the same time, in the coming years we are trying to promote the combination of fishing and the environmental protection, making it even more sustainable. Therefore we intend to share our knowledge with the aquaculture industry in order to make processes more and more environmentally friendly.

This project, dedicated to the eradication of red swamp crayfish and the preservation of the white-clawed crayfish, also lays the foundations for possible similar initiatives on other non-native species, that unfortunately are present in our waters with a negative impact on the balance of fish populations. The successful conclusion of the project RARITY represents a tangible sign of an operational capability highlighted by the strong and constant work made in the past months and confirms the quality of the commitment carried out by the entire structure.

Flaviano Fantin
ETP Chairmanship



IL PROGETTO LIFE10 NAT/IT/000239 "RARITY"

– M. Zanetti –

Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine
email: massimo.zanetti@regione.fvg.it

Nei corsi d'acqua del Friuli Venezia Giulia sono presenti popolazioni importanti di gamberi d'acqua dolce appartenenti a specie autoctone tutelate dalla normativa comunitaria, nazionale e regionale. Per questo motivo, già da molti anni, la Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia e l'Ente tutela pesca conducono studi e monitoraggi su specie di gamberi di fiume caratteristiche dei corsi d'acqua dolce della

regione, come *Austropotamobius pallipes* complex ed *Austropotamobius torrentium* che, considerata la sua limitata presenza sul territorio ad alcune zone nord orientali (le uniche sul territorio nazionale), merita una particolare attenzione (Fig. 1 e Fig. 2).

Nel corso dell'ultimo monitoraggio effettuato su ampia scala nel 2005, ovvero prima del progetto RARITY, è stata ri-



Fig. 1. Il gambero di fiume, *Austropotamobius pallipes*.
Fig. 1. The white clawed crayfish *Austropotamobius pallipes*.



Fig. 2. Il gambero di torrente, *Austropotamobius torrentium* (foto G. De Luise).
Fig. 2. The stone crayfish, *Austropotamobius torrentium* (photo G. De Luise).



Fig. 3 e 4. Le immagini della prima segnalazione di *P. clarkii* in Friuli Venezia Giulia (foto S. Devetti).
Fig. 3 e 4. The photos of the first record of *P. clarkii* in Friuli Venezia Giulia (photo S. Devetti).

levata un'evidente contrazione delle popolazioni di *A. pallipes* presenti sul territorio regionale. A seguire, nel 2007, sono state raccolte le prime segnalazioni documentate della presenza di gambero rosso della Louisiana *Procambarus clarkii*, una specie alloctona invasiva che in diverse regioni italiane si è ampiamente diffusa provocando la scomparsa delle specie autoctone (Fig. 3 e 4). Un comportamento aggressivo e opportunistico unito all'alta prolificità la rendono infatti una specie vincente nel confronto con quelle originarie dei nostri fiumi.

Questa specie, considerata una delle specie alloctone invasive più pericolose per la conservazione della biodiversità, causa gravi semplificazioni degli habitat colonizzati ed è in grado di trasmettere alcune patologie letali per altri organismi acquatici. Grazie alla sua continua attività di scavo e alla densità delle sue popolazioni, provoca un aumento della porosità delle sponde con conseguente rischio di loro imbibizione e crollo. Inoltre questo crostaceo è in grado di accumulare sostanze nocive che può trasmettere all'uomo nel caso quest'ultimo se ne nutra (Fig. 5).



Fig. 5. Il gambero rosso della Louisiana *Procambarus clarkii* (foto S. Zanini).

Fig. 5. The Louisiana red swamp crayfish, *Procambarus clarkii* (photo S. Zanini).

Il progetto LIFE 10 NAT/IT/000239 "RARITY" si prefigge l'obiettivo di tutelare e incrementare le popolazioni di gamberi di fiume presenti in Friuli Venezia Giulia anche attraverso il contrasto alla diffusione del gambero rosso della Louisiana, incrementando e diffondendo le conoscenze sulla problematica ed elaborando una normativa specifica.

RARITY si è realizzato sul territorio del Friuli Venezia Giulia con particolare attenzione ad alcuni siti della rete Natura 2000 (Siti di importanza comunitaria, ora Zone speciali di conservazione, e Zone di protezione speciale), ossia territori individuati in modo coordinato e coerente con gli obiettivi di conservazione della natura promossi dalle direttive 92/43/CEE "Habitat", 79/409/CEE e 2009/147/CE "Uccelli".

Le attività si sono sviluppate in sinergia con un partenariato composto da:

- 1) Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia (di seguito **ETP**) – beneficiario coordinatore;
- 2) CNR-Istituto di scienze marine di Venezia (di seguito **ISMAR**) – beneficiario associato;
- 3) Dipartimento di Scienze della Vita dell'Università di Trieste (di seguito **UNITS**) – beneficiario associato;
- 4) Dipartimento di Biologia dell'Università di Firenze (di seguito **UNIFI**) – beneficiario associato;
- 5) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (di seguito **IZSVE**) – beneficiario associato.

RARITY ha un valore di oltre 2.600.000 euro ed è stato realizzato nel territorio del Friuli Venezia Giulia nel periodo compreso tra il 1 settembre 2011 e il 31 dicembre 2014.

Le attività realizzate si articolano in:

- 1) **Azioni preliminari.** Trattasi di azioni tese da un lato a comprendere le modalità con cui il gambero rosso è arrivato sul territorio del Friuli Venezia Giulia e dall'altro a testare e settare metodi che migliorino l'efficacia delle catture (esche feromonal) o che riducano la prolificità di *P. clarkii* attraverso tecniche non tradizionali, quali ad esempio la sterilizzazione di maschi. Tra le azioni preliminari va annoverata anche la formazione del personale operante. L'Ente tutela pesca può contare sulla disponibilità di circa 250 volontari che, in modo impareggiabile, ne garantiscono l'operatività. Nonostante l'elevata specializzazione di questi volontari, lo specifico argomento ha richiesto un corso di formazione *ad hoc*, che ha fornito loro le competenze necessarie per intervenire sia nelle operazioni di allevamento di *A. pallipes* che in quelle di cattura di *P. clarkii*, come anche nello svolgimento del monitoraggio delle popolazioni di entrambe le specie. Al corso ha partecipato anche personale della Protezione civile, del Corpo forestale regionale e dell'Agenzia regionale per la protezione dell'ambiente (ARPA). Il materiale didattico del corso è stato raccolto in un volume dal titolo "Didattica per gli operatori".

- 2) **Azioni concrete.** Nei due impianti dell'ETP siti ad Amaro (UD) e a San Vito al Tagliamento (PN) sono stati allevati esemplari di *A. pallipes* e sono stati prodotti circa 40.000 giovani gamberi di fiume per ripopolare le acque regionali e prioritariamente quelle ricadenti in alcuni Siti della Rete Natura 2000 (2SC Dolomiti Friulane IT3310001, ZSC Risorgive dello Stella IT3320026, ZSC Risorgive del Venchiaruzzo IT3310010, ZSC Bosco Marzini IT3110011, ZSC Prealpi Giulie Settentrionali IT3320012, ZSC Forra del Cornappo IT3320016, ZSC Valle del medio Tagliamento IT3320015, ZSC Cavana di Monfalcone IT3330007), previa verifica della fattibilità dell'intervento di *restocking*. Utilizzare due allevamenti ha consentito di ridurre il rischio di insuccesso ed affrontare nel migliore dei modi alcune avversità che si sono verificate. L'allevamento e

il ripopolamento sono stati realizzati nel rispetto degli esiti delle analisi genetiche sulle popolazioni di gamberi presenti in Friuli Venezia Giulia, che hanno consentito di individuare 7 differenti gruppi o "ESU".

Per contrastare la diffusione del gambero rosso (o gambero killer, come viene anche chiamato) sono state realizzate catture massive mediante l'utilizzo di nasse. A queste operazioni hanno provveduto i volontari ETP, che dispongono di mezzi adeguati e di una efficiente organizzazione. Gli interventi sono stati finalizzati a mantenere bassa la densità delle popolazioni e, in abbinamento ad altre tecniche di sterilizzazione dei riproduttori e di incremento della predazione naturale, ad eradicare la specie dai siti di nuova colonizzazione. Tutti gli individui catturati sono stati destinati alle analisi genetiche e sanitarie ed in seguito distrutti per incenerimento.

Il progetto ha anche indagato lo stato di salute delle diverse popolazioni selvatiche di *A. pallipes* e studiato il ruolo di *P. clarkii* nella trasmissione di patologie ad altri organismi acquatici. Importanti conoscenze sono state acquisite sulla malattia nota come "peste del gambero" o afanomiosi.

Per consentire di consolidare, rafforzare e mantenere i risultati del progetto, RARITY ha predisposto una normativa, che il Consiglio regionale del Friuli Venezia Giulia ha approvato, e che, partendo da un'analisi comparata della normativa europea, nazionale e regionale relativa alle specie alloctone invasive, disciplina la gestione della problematica presenza del gambero rosso.

- 3) **Azioni di disseminazione.** Intenso è stato anche il programma delle iniziative di disseminazione, con incontri tematici destinati a pescatori, allevatori, commercianti, guardie forestali e altre categorie di persone interessate. È stato realizzato un manuale per le Pubbliche amministrazioni (Comuni, Protezione civile, Consorzi di bonifica, etc.) che si dovessero trovare ad affrontare i problemi generati dalla presenza del gambero rosso e sono stati organizzati seminari specifici per chi si occupa della vigilanza ambientale. Comunicazioni specifiche han-

no riguardato gli esiti delle indagini sanitarie, mentre lo stato di avanzamento del progetto è stato oggetto di comunicazioni periodiche attraverso una newsletter, il cui invio tramite posta elettronica ha interessato centinaia di destinatari. Tutte le notizie ed i materiali relativi al progetto sono caricati sul sito web www.life-rarity.eu, liberamente consultabile.

Per supportare iniziative di divulgazione sono stati realizzati appositi materiali (banner, brochure, cartelline, ...) e presso le sedi ETP e i siti interessati dalle attività sono stati esposti appositi pannelli informativi che illustrano le attività in essere. È stato realizzato un film della durata di circa 30 minuti dal titolo "Alieni tra noi" che consente anche al grande pubblico di familiarizzare con i temi del progetto. L'acquario di Ariis di Rivignano Teor dell'Ente tutela pesca ha ospitato numerose iniziative destinate al pubblico generico quali mostre o percorsi didattici per famiglie, scuole e docenti. L'ETP ha altresì provveduto a dare informazioni sul progetto in ogni numero del proprio notiziario "Pesca e ambiente".

- 4) **Attività di networking.** Poiché in Italia e in Europa sono stati realizzati altri progetti relativi a tematiche in parte simili a quelle affrontate da RARITY, sono stati sviluppati scambi di esperienze, visite e incontri con i diversi gruppi di lavoro provenienti dalla Slovenia, dalla Carinzia (Austria) e dalle regioni Piemonte, Trentino Alto Adige, Lombardia, Abruzzo.

- 5) **Attività di monitoraggio.** Una delle azioni più impegnative per l'ETP è stata decisamente quella del monitoraggio, che si è svolto per tre stagioni su una rete di 238 stazioni diffuse su tutto il territorio regionale. Il monitoraggio ha rilevato informazioni non solo sulla consistenza delle popolazioni di gamberi, ma anche sulle condizioni ambientali, mediante i rilievi di parametri chimico-fisici dell'acqua e il calcolo degli indici IBE e IFF.

Particolare impegno è stato profuso, per la realizzazione delle attività, dai volontari dell'Ente tutela pesca la cui professionalità, preparazione e disponibilità è risultata una delle chiavi di volta del progetto.

– M. Zanetti –

Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine
email: massimo.zanetti@regione.fvg.it

Large populations of freshwater crayfish belonging to autochthonous species protected by EU, national and regional laws are found in the waterways of Friuli Venezia Giulia. For this reason the Friuli Venezia Giulia regional authorities and fish protection agency have for many years studied and monitored species of native river crayfish of the freshwater waterways in the region, such as *Austropotamobius pallipes* complex and *Austropotamobius torrentium* which, considering its presence in the area is limited to some north-eastern zones (the only ones in Italy), deserves special attention (Fig. 1 and 2).

During the last monitoring action carried out on a large scale in 2005, i.e. before the RARITY project, a distinct decline in the populations of *A. pallipes* present in the regional area was seen. Later, in 2007, the first documented reports were obtained of the presence of the Louisiana red swamp crayfish *Procambarus clarkii*, an invasive alien species which has spread extensively in several regions of Italy causing the disappearance of native species (Fig. 3 and 4). An aggressive and opportunistic behaviour combined with high prolificity mean in fact that this is a species that dominates the original ones of Italy's rivers.

This species, considered one of the most dangerous invasive allochthonous species for the conservation of biodiversity, causes serious simplifications of the colonised habitats and is capable of transmitting some diseases lethal to other aquatic organisms. Thanks to its continual digging and the density of its populations it causes an increase in the porosity of banks with a consequent risk of their water absorption and collapse. This crustacean is also able to accumulate harmful substances which it can transmit to humans if used as food (fig. 5). The aim of the LIFE 10 NAT/IT/000239 RARITY project is to safeguard and increase the populations of white clawed crayfish present in Friuli Venezia Giulia also by combating the diffusion of the Louisiana red swamp crayfish, boosting and spreading knowledge of the problem and drafting specific legislation.

RARITY was carried out in the territory of Friuli Venezia Giulia with special focus on some sites in the *Natura 2000* network (sites of EU importance, now special conservation areas and special protection zones), i.e. territories

identified with a coordinated approach coherent with the goals of nature conservation set by the directives 92/43/EEC (habitats directive), 79/409/EEC and 2009/147/EC (birds directive).

Activities were carried out synergically with the following partners:

- 1) Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia [Friuli Venezia Giulia Fish Protection Agency], referred to as **ETP** further on, coordinating beneficiary;
- 2) CNR-Istituto di scienze marine di Venezia [CNR - Institute of Marine Sciences in Venice], referred to as **ISMAR** further on, associated beneficiary;
- 3) Department of Life Sciences of the University of Trieste, referred to as **UNITS** further on, associated beneficiary;
- 4) Department of Biology of the University of Florence, referred to as **UNIFI** further on, associated beneficiary;
- 5) Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie [National reference laboratory for Fish, Mollusc and Crustacean Diseases], referred to as **IZSVe** further on, associated beneficiary.

RARITY has a value of over 2,600,000 Euros and was carried out in the area of Friuli Venezia Giulia in the period between 1 September 2011 and 31 December 2014.

The work carried out was structured as:

- 1) **Preliminary actions.** These were actions aimed on the one hand at understanding the ways in which the red swamp crayfish arrived in the area of Friuli Venezia Giulia and on the other hand to test and set methods which improve the efficacy of catches (pheromone baits) or which reduce the prolificity of *P. clarkii* through non-traditional techniques, such as for example sterilisation of males. The training of operative personnel should also be included among the preliminary actions. The ETP can count on the availability of approximately 250 volunteers who peerlessly guarantee its operations. Despite the high specialisation of these volunteers the specific issue required an ad hoc training course which supplied them with the necessary skills for participat-

ing both in the operations of breeding *A. pallipes* and in those of catching *P. clarkii* as also in the monitoring of the populations of both species. The course was also attended by staff from civil defence, the regional forestry corps and the regional environmental protection agency (ARPA). The course teaching material was collected in a book entitled "Training for Operatives".

- 2) **Concrete actions.** At the two ETP farms situated in Amaro (Udine) and San Vito al Tagliamento (Pordenone) specimens of *A. pallipes* were bred and reproduced and around 40,000 juveniles of white clawed crayfish were produced in order to restock the regional waters and, as priority, those within some sites of the *Natura 2000* network (ZSC [special conservation zone] Dolomiti Friulane IT3310001, ZSC Risorgive dello Stella IT3320026, ZSC Risorgive del Venchiaruzzo IT3310010, ZSC Bosco Marzini IT3110011, ZSC Prealpi Giulie Settentrionali IT3320012, ZSC Forra del Cornappo IT3320016, ZSC Valle del medio Tagliamento IT3320015 and ZSC Cavana di Monfalcone IT3330007) after ascertaining the feasibility of the restocking operations. Using two farms enabled the risk of failure to be reduced and to tackle in the best possible way some of the adversities which occurred. In order to combat the spread of the red swamp crayfish (or "killer" crayfish, as it is also known) mass capture was carried out using fish traps. These operations were performed by the ETP volunteers who were equipped with adequate means and were efficiently organised. The aim of the operations was to keep the density of the populations low and, combined with other techniques of sterilisation of the reproducers and increasing of natural predators, to eradicate the species from the sites of fresh colonisation. All the individuals caught were allocated to genetic and health analyses and later destroyed by incineration.

The project also investigated the state of health of the various wild populations of *A. pallipes* and studied the role of *P. clarkii* in the transmission of disease to other aquatic organisms. Important knowledge was gained about the disease known as crayfish plague or aphanomycosis.

In order to enable the results of the project to be consolidated, reinforced and maintained, RARITY drafted a law approved by the regional council of Friuli Venezia Giulia and which, basing on a comparative analysis of European, national and regional laws on invasive allochthonous species, would allow management of the problematic presence of the red swamp crayfish.

- 3) **Dissemination.** The programme of promotional initiatives was also intensive with themed meetings with fishermen, breeders, retailers, forestry guards and other categories of people concerned. A manual was produced for local government organisations (town councils, civil defence, land management consortia, etc.) who may find themselves having to tackle the problems created by the presence of the red swamp crayfish and specific seminars were organised for those involved in environmental surveillance. Specific communication related to the results of the health investigations, while the progress of the project was reported periodically through a newsletter, sent by email to hundreds of recipients. All the news and materials relating to the project were loaded onto the website www.life-rarity.eu, with free consultation.

Special materials (banners, brochures, folders, etc.) were produced as backing for the promotion initiatives and special information panels were displayed at the ETP locations and those locations involved in operations to illustrate the activities underway. A film lasting about 30 minutes was also produced, entitled *Alieni tra noi* or "Aliens Among Us", which also allowed the general public to familiarise themselves with the themes of the project. The aquarium of Ariis di Rivignano of the ETP housed a number of initiatives for the general public such as exhibitions or educational displays for families, schools and teachers. The ETP also gave out information on the project in every issue of its newsletter *Pesca e ambiente*.

- 4) **Networking.** Since other projects relating to issues partly similar to those tackled by RARITY have been implemented in Italy and other European countries, exchanges of experiences, visits and meetings were held with various work groups from Slovenia, Carinthia (Austria) and the Piedmont, Trentino Alto Adige, Lombardy and Abruzzo regions of Italy.

- 5) **Monitoring.** One of the most challenging actions for the ETP was definitely that of monitoring, which was carried out for three seasons on a network of 238 stations spread throughout the regional area. The monitoring generated information not only on the size of the crayfish populations but also on the environmental conditions through gauging of chemical and physical parameters of the water and calculation of the EBI and FFI indices.

Particular commitment during the activities was shown by the volunteers of the ETP whose professionalism, training and willingness formed one of the keystones of the project.



L'ALLEVAMENTO E IL RIPOPOLAMENTO

– M. Zanetti¹ & G. De Luise² –

¹ Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine
email: massimo.zanetti@regione.fvg.it
² via XXIV maggio, 61 • I - 33010 Reana del Rojale (UD)
email: giorgio.deluise@email.it

Nell'ambito del progetto RARITY, tra le azioni concrete di conservazione, il rafforzamento delle popolazioni di *Austropotamobius pallipes* è stato certamente una delle più rilevanti. Al termine delle attività, a fine 2014, in tre anni sono stati complessivamente rilasciati in natura circa 40mila giovani gamberi destinati a ripopolare siti in cui la specie è risultata rarefatta o addirittura scomparsa.

Il ripopolamento è stato effettuato con forme giovanili (larve L3) (Fig. 6 e 7) di gambero di fiume prodotte in impianto di allevamento dell'Ente tutela pesca, a partire da riproduttori catturati in natura e testati geneticamente. Sono stati individuati due impianti per l'allevamento del gambero di fiume: uno a San Vito al Tagliamento (PN) e l'altro ad Amaro (UD).



Fig. 6. Giovane gambero di fiume di circa 1 mese.
Fig. 6. Young (around 1 month old) white clawed crayfish.



Fig. 7. Giovane gambero pronto per la immissione in natura (larva L3).
Fig. 7. Young crayfish ready for introduction into the wild (larva L3).



Fig. 8 e 9. Le vasche dell'impianto di San Vito al Tagliamento (PN).
Fig. 8 and 9. The tanks of the farm at San Vito al Tagliamento (Pordenone).



sterno della struttura sono presenti altre 4 vasche rettangolari (2,1x0,60 m), una vasca settata in quattro (0,40x0,8), oltre ad un laghetto per la coltivazione di piante acquatiche. Le vasche sono alimentate da acqua di pozzo a temperatura costante di 12,4°C.

L'impianto è attivo per il progetto dal novembre 2011 ed ha consentito di produrre oltre 23.000 esemplari, tutti liberati in natura tra l'estate 2012 e l'autunno 2014 (Fig. 8 e 9). L'impianto di Amaro – ubicato in località Cison – è stato interamente ristrutturato con il progetto RARITY ed ha ufficialmente iniziato la sua nuova attività nel settembre 2012. Il ciclo produttivo avviene all'interno di 6 vasche in vetroresina di 6x1 m e altrettante di 3x1 m alimentate da acqua di pozzo a temperatura costante di 10,5°C.

L'impianto ha anche a disposizione alcune vasche in vetroresina per la quarantena, nonché due vasche in cemento (40x2,5m), settabili, per la coltivazione di piante acquatiche. Le vasche per l'allevamento del gambero sono posizionate in un tunnel-serra con la copertura oscurata, per evitare che nelle vasche crescano troppe alghe.

L'impianto ha consentito di produrre oltre 18.000 larve di gambero, destinate al ripopolamento negli anni 2013 e 2014 (Fig. 10, 11 e 12).

L'acqua di entrambi gli allevamenti, proveniente da falda artesiana, viene opportunamente degassata da appositi dispositivi (Fig. 13) e viene distribuita in modo da arrivare direttamente a ciascuna vasca che, quindi, rappresenta un'unità autonoma e indipendente.

In entrambi i centri la quantità d'acqua fluente nelle vasche di allevamento assicura un ricambio completo nelle 24 ore più che sufficiente alle esigenze dei crostacei.

Sulla scorta delle esperienze nello specifico settore, le mandate dell'acqua di ciascuna vasca degli impianti sono state realizzate in modo da generare un flusso d'acqua laminare sul fondo, grazie a condotte a due vie con terminali a bec-



Fig. 13. Il degassatore dell'impianto di Amaro.
Fig. 13. The degasser of the Amaro farm.

Fig. 10, 11 e 12. L'impianto di Amaro (UD).
Fig. 10, 11 and 12. The farm at Amaro (Udine).

L'impianto di San Vito è uno dei piccoli incubatoi di proprietà dell'Ente tutela pesca, utilizzato fino al 2011 (inizio progetto RARITY) per la schiusa di uova di trota. È una piccola ma funzionale struttura che si trova all'interno di una proprietà privata, ubicata nella frazione di Savorgnano. L'impianto è coperto e ospita 10 vasche in vetroresina rettangolari (2x0,6 m) e 4 vasche circolari (diametro 1,5 m). All'e-

co di clarino. Grazie ad un foro praticato sul tubo nella parte non immersa, il flusso d'acqua si arricchisce di aria, consentendo una buona ossigenazione, nonché una buona pulizia della vasca, creando condizioni idrauliche simili a quelle di un ambiente naturale (Fig. 14).

L'allevamento dei gamberi è stato realizzato in condizioni intensive, utilizzando vasche in vetroresina correate di ricoveri artificiali di differente diametro, dipendente dalle diverse taglie degli animali ospitati e in numero superiore a quello dei soggetti presenti. Allo scopo si sono impiegate



Fig. 14. I tubi di mandata dell'acqua alle vasche sono state adattate per generare un flusso laminare sul fondo e arricchire l'acqua di ossigeno.

Fig. 14. The pipes for delivery of the water to the tanks were adapted to generate a laminar flow on the base and enrich the water with oxygen.



Fig. 15. Tane artificiali ricavate da tubi in PVC.
Fig. 15. Artificial lairs formed from PVC pipes.

strutture tubolari in PVC per le taglie maggiori, mattoni forati e profilati in PVC per il ricovero dei giovani nati (Fig. 15). Grande attenzione è stata posta alle misure di profilassi, in modo da evitare possibili contaminazioni. Ciascun impianto, accessibile esclusivamente da operatori autorizzati, è dotato di sistemi di disinfezione per gli operatori stessi e ciascuna vasca è stata dotata di propri strumenti di servizio: un guadino a maglie piccole del genere di quelli usati in acquariologia, una piccola scopa ed una tavoletta di legno posta al di sopra della griglia di scarico, sia per evitare fughe indesiderate, sia come base di appoggio per ogni operazione e per la scheda tecnica che l'operatore provvede quotidianamente ad aggiornare.

I gamberi sono stati alimentati con un mangime commerciale autosufficiente, adeguato alle esigenze nutritive della specie, distribuito sotto forma di *pellets* di diversa granulometria a seconda della taglia dei soggetti e, soprattutto, di consistenza tale da mantenersi compatto per almeno 48 ore. Per tenere controllata la quantità di cibo consumata giornalmente da parte dei gamberi, sono state adottate due o più mangiatoie di fattura artigianale per ogni vasca (Fig. 16).

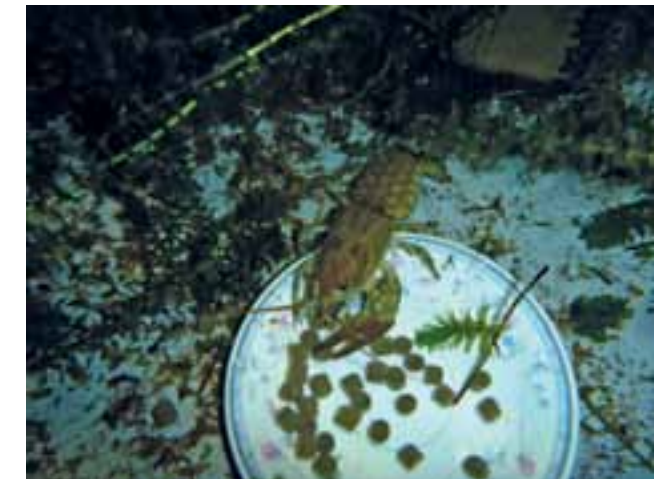


Fig. 16. Per controllare l'effettivo consumo del cibo e tarare la quantità di mangime, si utilizzano delle mangiatoie costituite da piatti in ceramica.

Fig. 16. In order to check on effective consumption of food and calibrate the quantity of feed, feeders built from ceramic plates are used.

La quantità giornaliera di mangime somministrato è stata calcolata in ragione del 3-4% del loro peso (biomassa totale) degli adulti, del 5% delle larve e dei giovani gamberi. Per le femmine ovigere, fino alla schiusa delle uova, il consumo è stato ridotto allo 0,2-0,4% del loro peso vivo.

Ad integrazione della dieta, in ciascuna vasca sono state posizionate piante acquatiche (*Ranunculus*, *Helodea*, *Fontinalis* e *Myriophyllum*), prelevate precedentemente in ambiente naturale e coltivate in impianto (Fig. 17).



Fig. 17. Laghetto per la coltivazione delle piante acquatiche nell'impianto di San Vito.

Fig. 17. Pond for cultivating aquatic plants at the San Vito farm.



Fig. 18. vasca allestita con ricoveri artificiali (mattoni) e piante acquatiche.

Fig. 18. Tank set up with artificial shelters (bricks) and aquatic plants.

Queste si sono rivelate utili come ripari aggiuntivi, come ulteriore fonte di calcio, molto utile nel processo di ecdisi, e come alimento, costituito non solo dai vegetali stessi ma

anche dal nectoplancton e benthos sviluppatosi: Cladoceri (*Daphniae*), Copepodi, Anfipodi (*Gammarus sp.*), Efemerotteri (*Ephemerella*), Gasteropodi (*Planorbis*, *Lymnoeae*) (Fig. 18). Gli impianti hanno richiesto due-quattro operatori ciascuno, a seconda del periodo, che si sono occupati della cura degli animali tutti i giorni, per un impegno medio di 4 ore al giorno. Il personale coinvolto in queste attività è stato formato con un apposito corso all'inizio del progetto ed ha potuto operare sotto il coordinamento di un consulente esperto di acquacoltura.

Le operazioni di monitoraggio condotte nell'ambito del progetto hanno consentito di individuare le aree con maggiore presenza di gambero di fiume e caratterizzate dall'assenza di gamberi alloctoni. Grazie alle indagini sanitarie condotte dall'ISVe e a quelle genetiche condotte dall'UNITS, è stato possibile anche valutare lo stato di salute delle popolazioni e suddividere le stesse popolazioni in gruppi geneticamente affini. Queste indicazioni si sono rivelate essenziali per la scelta dei siti dai quali prelevare i riproduttori per avviare gli impianti.

Le catture di riproduttori hanno riguardato individui sessualmente maturi in numero sufficiente al fabbisogno degli impianti (Fig. 19).



Fig. 19. La selezione dei possibili riproduttori.

Fig. 19. Selection of possible reproducers.

La selezione è stata fatta sulla base del sesso e della taglia in quanto gli individui più grandi producono una maggiore quantità di uova e quindi di piccoli (Fig. 20). Lo stock di riproduttori è stato strutturato con una ripartizione dei sessi di 1:3 ed è stato stabulato segregando i maschi dalle femmine, ad eccezione del breve periodo degli accoppiamenti. I riproduttori sono stati catturati nel rio Gorgons, in comune di Cavasso Nuovo (PN); nel rio Gamberi e nel rio Inglagna, in Comune di Tramonti di sopra (PN); nel Torrente Chiarzò, in località Campone del Comune di Tramonti di sotto (PN); nel torrente Palar, in località Alesso del Comune di Trasa-



Fig. 20. I riproduttori di *A. pallipes* selezionati.

Fig. 20. Reproducers of *A. pallipes* selected.

ghis; nel torrente Valcalda nel Comune di Taipana (UD) e nel rio Chiarò in Comune di Prepotto (UD).

Al termine di ciascun ciclo riproduttivo, gli individui adulti sono stati riportati nei luoghi di origine o, in minima parte, impiegati per il ripopolamento. Nei siti di prelievo dei riproduttori si è provveduto al rilascio di una quota dei piccoli prodotti negli impianti.

Per il trasporto dei gamberi, a seconda del periodo – ma soprattutto delle condizioni climatiche del momento – sono stati impiegati diversi mezzi. In taluni casi si è utilizzata una vasca isoterma in vetroresina progettata per il trasporto di pesci e crostacei e completa di bombola per l'ossigeno. Più spesso si è fatto ricorso al trasporto cosiddetto “a sec-



Fig. 21. Il modo coretto di immergere i gamberi in acqua. La posizione dorsale consente all'aria imprigionata sotto al carapace di liberarsi in pochi istanti.

Fig. 21. The proper way of immersing the crayfish in water. The dorsal position allows the air trapped under the carapace to be freed in a few moments.

co”, ovvero in ambiente umido, refrigerato, ma senza acqua. In queste condizioni, infatti, i gamberi riescono a respirare ossigeno atmosferico. Questa peculiarità rende agevoli le operazioni di trasporto, che possono essere effettuate con comuni borse frigo o altri contenitori coibentati.

Dopo il trasporto a secco, i gamberi sono stati inseriti nelle vasche di quarantena avendo cura di immergerli dorsalmente, in modo da permettere la fuoriuscita delle bolle d'aria dalla cavità branchiale e consentire così un rapido recupero di tutte le funzioni (Fig. 21). Le diverse popolazioni sono state stabulate in vasche differenti.

Nelle vasche di allevamento si è mantenuta una densità massima di 20 esemplari al m². Tra i mesi di ottobre e novembre, a seconda del grado di maturazione delle femmine, si è proceduto al mescolamento dei due sessi, nel rispetto delle ESU (gruppi geneticamente affini) di appartenenza e della sex ratio 1:3. Ogni due giorni tutte le vasche sono state controllate per verificare gli avvenuti accoppiamenti, sovente osservabili dal vivo, e la presenza di femmine già fecondate o addirittura con le uova. Una femmina di questa specie, a seconda della sua taglia, è in grado di produrre da 30 a 120 uova (Fig. 22).



Fig. 22. Femmina di *A. pallipes* con uova. Sono ancora visibili le spermateche deposte dal maschio con l'accoppiamento.

Fig. 22. Female of *A. pallipes* with eggs. The spermathecae deposited by the male with mating can still be seen.

Le femmine ovigere sono state trasferite nelle vasche a loro dedicate, all'interno di particolari strutture denominate “gabbie da parto” appositamente realizzate. Si tratta di contenitori in polycarbonato trasparente, forati sul fondo e sulle pareti perimetrali, dotati di coperchio e appoggiati sui bordi delle vasche in modo da consentire una loro parziale immersione (Fig. 23 e 24).

Prima di immettere le femmine in questi box, sul fondo della vasca, lungo tutto il perimetro, sono stati posizionati mattoni forati (diametro delle aperture di 3/4 mm) e pian-



Fig. 25. Giovani di *A. pallipes* appena separatisi dalla madre.
Fig. 25. Young of *A. pallipes* newly separated from the mothers.

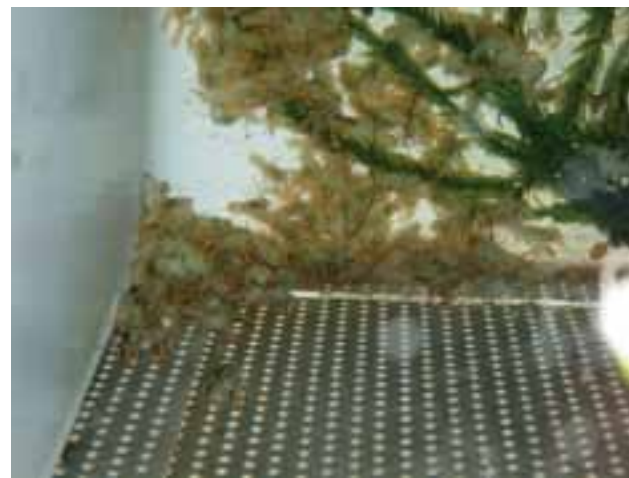


Fig. 26. Nei primi giorni di vita le larve di *A. pallipes* non riescono a contrastare la seppur debole corrente presente nella vasche, concentrandosi nelle griglie di protezione dello scarico.
Fig. 26. In the first days of life the larvae of *A. pallipes* cannot fight the albeit weak current present in the tanks, gathering in the grilles protecting the outlet.

Solo in un secondo tempo sono state reimmesse nel parco riproduttori assieme ai loro compagni, continuando così il ciclo riproduttivo. Ciò non è avvenuto simultaneamente per tutte le vasche, dato che non è materialmente possibile ottenere una sincronizzazione degli accoppiamenti e di conseguenza della produzione di uova, delle nascite e, quindi, degli accrescimenti. Una volta che tutte le femmine nelle gabbie da parto sono risultate "sgravate", è iniziata la fase più delicata dell'allevamento, ovvero lo svezzamento delle piccole larve presenti in gran numero sul fondo delle vasche (con densità da 200 piccoli/m² in su) (Fig. 26).

Fig. 23 e 24. Gabbie "da parto". I piccoli che abbandonano la madre possono fuggire dai fori e nascondersi tra i ripari appositamente collocati nella vasca. Si riducono così sensibilmente le perdite da cannibalismo.
Fig. 23 and 24. "Birthing" cages. The young crayfish who abandon their mothers can escape through the holes and hide among the shelters placed specially in the tank. This therefore reduces considerably losses through cannibalism.

te acquatiche al fine di garantire riparo e cibo ai nascituri. All'interno delle gabbie da parto, che hanno una superficie di circa 1 m², sono state ospitate da 10 fino ad un massimo di 20 femmine. Queste strutture sono state concepite per evitare la coabitazione delle madri con i piccoli in modo da limitare i naturali episodi di cannibalismo. Al momento opportuno, infatti, attraverso i numerosi fori del fondo, i piccoli hanno potuto allontanarsi dalle femmine e popolare la sottostante vasca. Le femmine, una volta liberatesi dalla prole (Fig. 25), sono state stabulate in vasche a loro riservate, dove hanno potuto recuperare la forma fisica ed esuviare.

Ad integrazione dell'alimento naturale costituito dalle piante e dai macroinvertebrati, tutti i soggetti sono stati alimentati quotidianamente anche con l'alimento artificiale autosufficiente (in questo caso sfarinati e/o microgranuli della stessa composizione di quelli per i riproduttori), in quantità stabilita in base al consumo. Nelle successive fasi la granulometria dei pellets è stata progressivamente aumentata in relazione all'incremento di taglia degli individui di ciascuna vasca. Con cadenza quindicinale si è provveduto a rilevare la lunghezza totale degli individui di un campione di ciascuna vasca, grazie all'impiego di una piastra Petri trasparente posizionata sopra una carta millimetrata, al fine di determinare il raggiungimento della taglia media minima per la liberazione, ovvero di 2 cm. A tale lunghezza, raggiunta da 4 a 6 mesi, i giovani diminuiscono la frequenza delle loro mute e sono già completamente indipendenti ed autonomi (Fig. 27). La qualità delle acque utilizzate nei due impianti e soprattutto



Fig. 27. Metodo per la misurazione della lunghezza dei giovani gamberi.
Fig. 27. Method for measuring the length of the young crayfish.

to la temperatura costante, prive di sbalzi stagionali, hanno favorito una schiusa precoce, accorciando di parecchi mesi il naturale ciclo di maturazione delle uova (Fig. 28 e 29). Le prime schiuse si sono verificate nel mese di marzo, a differenza dei siti naturali, dove le prime nascite di solito avvengono ai primi di giugno, proseguendo fino a luglio inoltrato. In quel periodo i giovani gamberi negli impianti avevano ormai raggiunto una taglia di 15 mm circa.



Fig. 28. Uova prossime alla schiusa; si noti la presenza degli occhi degli embrioni visibili in trasparenza del guscio.
Fig. 28. Eggs close to hatching. Note the presence of the eyes of the embryos visible through the shell.



Fig. 29. In impianto dal mese di marzo le uova iniziano a schiudere. Le larve rimangono attaccate all'addome materno ancora per qualche tempo.
Fig. 29. The eggs start to hatch from March at the farm. The larvae still remain attached to the mother's abdomen for a length of time.

Mediamente, all'inizio di settembre i piccoli crostacei ottenuti negli impianti ETP hanno raggiunto una taglia media di 20 mm.

Oltre a questo sistema di allevamento si è sperimentato l'impiego di incubatoi artificiali, in modo da incubare le uova in assenza della madre. Con questa tecnica è stato possibile recuperare anche le uova di femmine morte durante l'inverno o destinate a morte per invasione da saprolegnia (Fig. 30).



Fig. 30. Alcune uova degradano e devono periodicamente essere rimosse per evitare infestazioni fungine.
Fig. 30. Some eggs deteriorate and have to be removed periodically to avoid fungal infections.

Prendendo spunto dalle esperienze di altri ricercatori su questo problema (J.M. Carral et al., 2003) si è proceduto alla rimozione dai pleopodi materni di alcuni soggetti delle uova grazie all'impiego di un pettine e di una pinzetta, utili a mondare le uova da quelle degradate (facilmente riconoscibili dal loro colore) o dalla massa spugnosa della saprolegnia cresciuta proprio sulle uova già morte (Fig. 31 e 32). Le uova sono state inserite in incubatoi tipo bottiglie McDonald e bottiglie Zug (Fig. 33 e 34), impiegati in acquacoltura per l'incubazione artificiale delle uova di specie ittiche e rivelatesi utili anche per quelle del gambero di fiume. A giorni alterni le uova sono state opportunamente trattate con disinfettanti. Una volta nati, i piccoli (Fig. 35) sono stati posti in alcuni telaini flottanti dove giornalmente sono stati accuditi, separando quelli in grado di alimentarsi autonomamente (Fig. 36, 37 e 38).

Si è anche testata la possibilità di avviare l'allevamento con incubazione artificiale, prelevando uova da femmine selvatiche direttamente dai siti di origine e quindi senza la necessità di portare le femmine in impianto. Questa tecnica ha fornito dei risultati incoraggianti, soprattutto in presenza di popolazioni affette da afanomicosi.

Al termine del ciclo di allevamento, nei due impianti ETP si



Fig. 31. Operazioni di mondata delle uova con pinzetta.
Fig. 31. Operations of cleaning the eggs with a tweezer.



Fig. 32. Operazioni di mondata delle uova con pettine.
Fig. 32. Operations of cleaning the eggs with a comb.



Fig. 33. Incubatoio artificiale tipo Mc Donald.
Fig. 33. McDonald type artificial incubator.



Fig. 34. Incubatoi artificiali tipo Zug.
Fig. 34. Zug type artificial incubators.



Fig. 35. Larve nate nell'incubatoio artificiale.
Fig. 35. Larvae born in the artificial incubator.

è proceduto con l'immissione dei giovani gamberi in natura, previo loro conteggio (Fig. 39 e 40). Il trasporto dei giovani è avvenuto in acqua, in un contenitore dotato di aeratore (Fig. 41).



Fig. 36. Le larve nate negli incubatoi vengono posizionate in appositi telaini fino al momento in cui sono in grado di muoversi in modo autonomo.
Fig. 36. The larvae born in the incubators are placed in special frames until they are able to move independently.



Fig. 37. Operazioni di selezione delle larve nate negli incubatoi.
Fig. 37. Operations of selection of the larvae born in the incubators.



Fig. 38. Particolare delle larve nei telaini.
Fig. 38. Detail of the larvae in the frames.



Fig. 42, 43 e 44. La liberazione dei giovani di *A. pallipes*.
Fig. 42, 43 and 44. Releasing of *A. pallipes* juveniles.

Le immissioni sono avvenute nei mesi di settembre, ottobre e novembre. Tali periodi sono considerati i migliori per le larve di questa specie in quanto ancora abbastanza mobili, lontane dall'epoca di muta, in grado di cercare un sicuro riparo e, soprattutto, con un ragionevole lasso di tempo per abituarsi al nuovo ambiente prima del sopraggiungere del freddo.



Fig. 41. Contenitore impiegato per il trasporto dei giovani da immettere nei corsi d'acqua.
Fig. 41. Container used for the transport of juveniles to be introduced into the waterways.



Fig. 45. Gli adulti utilizzati come riproduttori sono stati riportati nei luoghi di origine.
Fig. 45. The adults used as reproducers were returned to the places of origin.

L'immissione in natura è stata preceduta da un breve periodo di acclimatazione alle condizioni del corso d'acqua mediante progressiva diluizione dell'acqua di trasporto con quella del sito, operazione utile soprattutto per abituare i gamberi alla differente temperatura (Fig. 42, 43 e 44).

Otto sono state le aree oggetto di ripopolamento, tutte corrispondenti ad altrettante Zone speciali di conservazione. Alcuni giovani gamberi sono stati rilasciati anche nei luoghi di provenienza dei riproduttori, per compensare la diminuita riproduzione naturale di quelle popolazioni. È stata ripopolata anche la stazione del torrente Cellina, a Claut (PN), in cui in precedenza è stato rimosso un nucleo di gamberi rossi. Anche una parte dei riproduttori presenti nei due impianti, al termine del loro ciclo, è stata reintrodotta nelle acque di origine (Fig. 45).

La scelta dei siti da ripopolare è stata fatta sulla base dei dati pregressi che attestavano la presenza, in declino, o la scomparsa dei gamberi di fiume.

Non è stato possibile, nel corso del progetto, identificare le cause di rarefazione o scomparsa dei gamberi nei diversi siti ripopolati, ma si è provveduto ad una verifica preliminare per accertare la sussistenza delle condizioni ambientali idonee alla vita dei gamberi. Sono stati quindi rilevati i parametri chimico-fisici dell'acqua e determinato l'indice biotico esteso, oltre a verificare la presenza di nascondigli naturali e di vegetazione acquatica, l'assenza di gamberi alloctoni e di dati di presenza di afanomicosi e di predatori. Dopo le opportune verifiche degli ambienti identificati, è stata redatta una scheda tecnica dell'area in cui, accanto alle caratteristiche del corso d'acqua, è riportato il punto cartografico di immissione degli animali con il loro numero.

Sito Natura 2000 ripopolato <i>Natura 2000 site restocked</i>	Giovani gamberi rilasciati <i>Juveniles released</i>		
	2012	2013	2014
ZSC Dolomiti Friulane IT3310001		2.408	7.267
ZSC Risorgive dello Stella IT3320026	365	1.479	4.286
ZSC Risorgive del Venchiaruzzo IT3310010	615	2.919	6.468
ZSC Bosco Marzinis IT3110011		392	1.725
ZSC Prealpi Giulie Settentrionali IT3320012		2.064	*
ZSC Forra del Cornappo IT3320016		924	*
ZSC Valle del medio Tagliamento IT3320015		474	*
ZSC Cavana di Monfalcone IT3330007			*
Altre aree	244	1.812	*
Totali	1.224	12.472	19.436

* Operazioni da completare alla data di redazione del presente documento. Altri 7.000 esemplari saranno rilasciati nell'autunno 2014.
* *Work to be completed on the date of preparation of this document. Approximately 7,000 additional specimens will be released in the fall 2014.*

Tab. 1. Dettaglio dei gamberi immessi.
Tab 1. Detail of the crayfish released.

BREEDING AND RESTOCKING

– M. Zanetti¹ & G. De Luise² –

¹ Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine

email: massimo.zanetti@regione.fvg.it

² via XXIV maggio, 61 • I - 33010 Reana del Rojale (UD)

email: giorgio.deluise@email.it

As part of the RARITY project, among the concrete conservation actions, strengthening the populations of *Austropotamobius pallipes* is definitely one of the most important. When the work was completed at the end of 2014, in three years a total of around 40,000 juveniles were released into the wild, intended to restock sites where the species was found to be rare or even non-existent.

Restocking was carried out with white clawed crayfish juveniles (larvae L3) (Fig. 6 and 7) bred at a fish farm of ETP from reproducers captured in the wild and tested genetically. Two farms were identified for breeding the white clawed crayfish: one at San Vito al Tagliamento (Pordenone) and the other at Amaro (Udine).

The San Vito farm is one of the small hatcheries owned by ETP, used until 2011 (start of the RARITY project) for hatching trout eggs. It is a small yet functional structure situated within private property located in the hamlet of Savorgnano. The farm is indoor and houses 10 rectangular tanks in fibreglass (2x0.6 m) and 4 round tanks (diameter 1.5 m). Outside the facility there are a further 4 rectangular tanks (2.1x0.60 m), a tank divided into four (0.40x0.8), as well as a pond for growing aquatic plants. The tanks are fed with well water at a constant temperature of 12.4°C.

The farm was involved in the project from November 2011 and allowed almost 20,000 specimens to be produced, all released into the wild between the summer of 2012 and the autumn of 2014 (Fig. 8 and 9).

The Amaro farm, located in the hamlet of Cison, was fully renovated through the RARITY project and was officially reopened in September 2012.

The production cycle takes place in 6 fibreglass tanks measuring 6 x 1 m and the same number measuring 3 x 1 m fed with well water at a constant temperature of 10.5°C.

The farm also has available some fibreglass tanks for quarantining as well as two concrete tanks (40 x 2.5 m), divisible, for growing aquatic plants. The crayfish farming tanks are positioned in a tunnel-glasshouse with the ceiling obscured to avoid excessive algae growth in the tanks. The farm allowed approximately 20,000 crayfish larvae to be produced, for restocking use in 2013 and 2014 (Fig. 10, 11 and 12).

The water of both farms, coming from artesian waters, is appropriately degassed by special devices (Fig. 13) and distributed so as to arrive directly at each tank which therefore represents an autonomous and independent unit.

In both centres the quantity of water flowing into the breeding tanks ensures a complete change over 24 hours, more than sufficient for the needs of the crustaceans.

In the wake of the experience gained in the specific sector, the deliveries of each tank on the farms were made in order to generate a laminar flow of water on the base thanks to two-way pipes with slant ends.

Thanks to a hole made in the pipe in the part above water, the flow of water is enriched with air to allow good oxygenation as well as good cleaning of the tank, creating hydraulic conditions similar to those of a natural environment (Fig. 14).

The crayfish were bred in intensive conditions, using fibreglass tanks with artificial shelters of different diameter depending on the different sizes of the fish housed and in a number higher than that of the numbers of fish present. For this purpose tubular PVC structures were used for the larger sizes and perforated bricks and PVC bars for sheltering the juveniles (Fig. 15).

Major focus was placed on preventive measures so as to avoid possible contaminations. Each farm, accessible only to authorised personnel, has systems of disinfecting for the same personnel and each tank was equipped with its own service instruments: a landing net with small mesh of the type used in aquariology, a small broom and a small wooden board placed over the discharge grille both to prevent undesirable escapes and as a support base for all operations and for the technical chart to be updated daily by the member of staff.

The crayfish were fed with commercial self-sufficient food, suitable for the nutritional needs of the species, distributed in the form of pellets of different piece size according to the size of the specimens and, above all, of such consistency as to remain compact for at least 48 hours. In order to keep the quantity of food consumed daily by the crayfish under control two or more craft-made feeders were adopted for each tank (Fig. 16).

The daily quantity of feed administered was calculated as 3-4% of the live weight (total biomass) of the adults and 5% of the larvae and of the young crayfish.

For egg-bearing females instead, up to hatching of the eggs, consumption was reduced to 0.2 - 0.4% of their weight.

As integration of the diet, aquatic plants were placed in each tank (*Ranunculus*, *Helodea*, *Fontinalis* and *Myriophyllum*) picked previously in a natural environment and farmed (Fig. 17).

They were found to be useful as additional shelters, as a further source of calcium, very useful in the ecdysis process, and as food, made up not only of the actual plants but also the nekoplankton and benthos developed: Cladocera (*Daphniae*), copepods, amphipods (*Gammarus* sp.), Ephemeroptera (*Ephemerella*), gasteropods (*Planorbis*, *Lymnoeae*) (Fig. 18). The farms required two-four operatives each, according to the period, who cared for the animals every day, for an average commitment of 4 hours a day. The staff involved in these activities were trained by a special course at the start of the project and were able to work under the coordination of a consultant expert in aquaculture.

The monitoring operations performed as part of the project allowed areas to be identified with the highest presence of white clawed crayfish and without allochthonous crayfish. Thanks to the medical investigations by the ISZVe and genetic ones by the UNITS, it was also possible to assess the state of health of the populations and divide the same populations into genetically similar groups (ESU: Evolutionarily significant units). This information was found to be essential in choosing the sites from which to take the reproducers for starting up the farms.

The catches of breeders related to sexually mature individuals in a sufficient number for the needs of the farms (Fig. 19). The selection was made on the basis of sex and size as larger individuals produce a higher quantity of eggs and therefore young (Fig. 20).

The stock of reproducers was structured with a distribution of the sexes of 1:3 and was farmed by segregating the males from the females, with the exception of the brief mating periods.

The breeders were captured in the rio Gorgons, in the municipal area of Cavasso Nuovo (Pordenone); in the rio Gamberi and in the rio Inglagna, in the municipal area of Tramonti di Sopra (Pordenone); in the Torrente Chiarzò, in Campone in the municipal area of Tramonti di Sotto (Pordenone); in the torrente Palar, at Alesso in the municipal area of Trasaghis; in the torrente Valcalda in the municipal area of Taipana (Udine) and in the rio Chiarò in the municipal area of Prepotto (Udine).

At the end of each reproduction cycle the adult individuals were returned to the places of origin or, to a minimal extent, used for restocking. At the sites where the reproducers were taken a quota of young produced at the farms was released. Various means were used for the transport of the crayfish,

according to the period and above all the current weather conditions. In some cases an isothermal tank in fibreglass designed for the transport of fish and crustaceans and supplied with a cylinder for oxygen was used. More often “dry” transport was adopted, i.e. in a humid and refrigerated environment but without water. In these conditions in fact the crayfish manage to breathe atmospheric oxygen. These special features facilitate the transport operations which can be performed with standard cooler bags or insulated containers.

After dry transport the crayfish were placed in the quarantine tanks, making sure they were immersed dorsally so as to allow air bubbles to leave the branchial cavity and in this way enable a rapid recovery of all functions (Fig. 21). The various populations were farmed in different tanks.

A maximum density of 20 specimens per m² was maintained in the breeding tanks. Between October and November, according to the degree of maturity of the females, the two sexes were mixed, in accordance with the relevant ESU and the 1:3 sex ratio. All the tanks were checked every two days to ascertain that mating had taken place, which could often be observed live, and the presence of females already fecundated or even with eggs. A female of this species, according to its size, is able to produce from 30 to 120 eggs (Fig. 22). The egg-bearing females were transferred into their allotted tanks inside special structures known as “spawning cages” made especially. These are containers in clear polycarbonate, with holes in the base and in the perimeter walls, fitted with a lid and resting on the edges of the tanks so as to allow their partial immersion (Fig. 23 and 24).

Before placing the females in these cages, on the base of the tank, along the entire perimeter, perforated bricks (diameter of holes 3/4 mm) and aquatic plants were positioned in order to guarantee shelter and food for the newborn crayfish.

The spawning cages, with a surface area of approximately 1 m², housed from 10 up to a maximum of 20 females. These structures were designed in order to avoid cohabitation of mothers with the young so as to limit the natural episodes of cannibalism. At the appropriate time, in fact, the young were able to move away from the females through the numerous holes in the base and populate the tank below. The females, once freed from the offspring (Fig. 25), were farmed in tanks reserved for them where they could regain physical fitness and exuviate.

Only later were they returned to the reproducers park with their mates, thus continuing the reproduction cycle.

This did not take place simultaneously for all the tanks, given that it is not physically possible to achieve synchronisation of the matings and consequently production of eggs, births and, therefore, of growth.

Once it had been ascertained that all the females in the spawning cages had been “delivered”, the more delicate phase of rearing began, i.e. weaning of the small larvae pres-

ent in a large number on the base of the tanks (with density of 200 juveniles/m² upwards) (Fig. 26).

To integrate the natural food consisting of plants and macroinvertebrates, all the specimens were fed daily also with self-sufficient artificial feed (in this case meal and/or micro granules of the same composition as those for the reproducers) in a quantity established on the basis of consumption. In the later phases the size of the pellets was gradually increased in relation to the increase in size of the individuals of each tank.

Every fortnight the total length of the individuals of a sample of each tank was measured using a transparent Petri dish positioned over graph paper to determine the reaching of the minimum average size for release, i.e. 2 cm. At this length, achieved at 4 to 6 months, the juveniles reduce the frequency of their exuviation and are already fully independent and autonomous (Fig. 27).

The quality of the water used in the two farms and above all the constant temperature, without sudden seasonal changes, encouraged early hatching, shortening by several months the natural cycle of maturing of the eggs (Fig. 28 and 29). The first hatchings took place in March, unlike natural sites where the first births usually take place in early June, continuing until late July. During that time the young crayfish in the farms had by then reached a size of approximately 15 mm.

On average in early September the young crustaceans obtained in the ETP farms achieved an average size of 20 mm. As well as this system of rearing the use of artificial hatcheries was experimented so as to hatch the eggs without the mother. With this technique it was possible to recover also the eggs of females who died during the winter or were destined to die due to invasion by saprolegnia (Fig. 30). Basing on the experience of other researchers with this problem (J.M. Carral et Al., 2003) the eggs were removed from the maternal pleopods using a comb and tweezers, useful for sorting the eggs from those that had deteriorated (easily recognisable by their colour) or from the spongy mass of the saprolegnia growing in fact on the eggs already dead (Fig. 31 and 32).

The eggs were inserted in hatcheries of the McDonald jar and Zug bottle type (Fig. 33 and 34), used in aquaculture for the artificial incubation of eggs of fish species and also found to be useful for those of the white clawed crayfish. The eggs were treated appropriately with disinfectants on alternate days. Once born, the juveniles (Fig. 35) were placed in some floating frames where they were nurtured daily, separating those able to feed autonomously (Fig. 36, 37 and 38).

The possibility was also tried out of launching rearing with artificial incubation, taking eggs from wild females directly from the sites of origin and therefore without the need to bring the females to the farm. This technique supplied encouraging results, above all with populations affected by aphanomycosis.

At the end of the rearing cycle juveniles were taken into the wild from the two ETP farms after having been counted (Fig. 39 and 40).

The juveniles were transported in water in a container equipped with aerator (Fig. 41).

The releases took place in September, October and November. These periods are considered the best for the larvae of this species in that still quite mobile, far from the period of exuviation, able to seek safe shelter and, above all, with a reasonable interval of time in order to become accustomed to the new environment before the cold weather starts.

The introduction into the wild was preceded by a short period of acclimatisation to the conditions of the waterway by progressive dilution of the transport water with that of the site, a useful operation above all for accustoming the crayfish to the different temperature (Fig. 42, 43 and 44).

Eight areas were involved in restocking, all corresponding to the same number of special conservation areas. Some juveniles were also released in the places of origin of the breeders, in order to compensate the reduced natural reproduction of those populations. The station of the Cellina stream in Claut (Pordenone) was also restocked, where a core of red swamp crayfish had previously been removed. Part of the reproducers present in the two farms, at the end of their cycle, were also reintroduced into the waters of origin (Fig. 45). The sites to be restocked were chosen on the basis of previous data indicating the declining presence or disappearance of the white clawed crayfish.

It was not possible to identify during the project the causes of RARITY or disappearance of the crayfish in the various restocked sites, but a preliminary check was carried out to ascertain the existence of the environmental conditions suitable for the life of the crayfish. The chemical and physical parameters of the water were therefore gauged and the extended biotic index calculated. The presence of natural hiding places and aquatic vegetation, the absence of alien crayfish, data on the presence of aphanomycosis and of predators were also checked. After the appropriate checks of the environments identified, a technical chart was drawn up of the area on which, alongside the features of the waterway, the cartographic point of introduction of the animals is given with their number (Tab. 1).

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

- Carral JM, Sàez-Royuela M, Celada JD, Pérez JR, Melendre PM & Aguilera A. 2003. Advantages of artificial reproduction techniques for white – clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes* Lerebuollet). Bull. Fr. Pêche Piscic. 370-371: 181-184
- Carral JM, González A, Celada JD, Sáez-Royuela M, Melendre PM, González R, García V. 2009. Antifungal treatments in artificial incubation of crayfish eggs (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae): Searching for alternatives to formaldehyde. Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems (2009) 394-395, 16.
- De Luise G. 1991. Diffusione, allevamento e ripopolamento in Friuli del gambero d'acqua dolce. Chiandetti Editore (Reana del Rojale), 174pp.
- De Luise G & Giorgetti G. 1995. Sanitary problems related with restocking the public inland water. In Aquarom '95 "Aquaculture and Fishing", Galati - Romania, 18 - 22, 1995.
- De Luise G. 2003. Guida ai crostacei d'acqua dolce del Friuli Venezia Giulia pp.31- Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia.
- De Luise G. 2006. I crostacei decapodi d'acqua dolce in Friuli Venezia Giulia. Recenti acquisizioni sul comportamento e sulla distribuzione nelle acque dolci della Regione. Venti anni di studi e ricerche. Marzo 2006, p 91. Ente tutela pesca - Regione Friuli Venezia Giulia.
- Liberato C, Di Cristo C, De Luise G, Di Cosimo A & Paolucci M. 2003. Preliminary evidence of an oxidative stress in

freshwater crayfish *Austropotamobius pallipes italicus*. Bull. Fr. Pêche Piscic., 370-371: 151-155.

- Policar T, Simon V & Kozak P. 2004. Egg incubation in the noble crayfish (*Astacus astacus*): The effect of controlled laboratory and outdoor ambient condition on hatching success and survival rate of ambient condition on hatching success, growth and survival rate of juveniles. Bull. Fr. Pêche Piscic., 372-373: 411-423.
- Policar T, Kozak P. & Martin J. 2006. Effects of eggs bath and daily removal of dead eggs on hatching success and production of stage 2 juveniles during artificial incubation in noble crayfish (*Astacus astacus* L.). Bull. Fr. Pêche Piscic., 380-381: 1197-1206.
- Rocio Gonzalez, Jesus D. Celada, Vanesa Garcia Alvaro Gonzalez, José M. Carral & Maria Saez-Royuela. 2009 The artificial incubation of crayfish eggs: review and report from an experimental study concerning the effects of offspring origin (maternal or artificial incubation) on the survival and growth of juvenile signal crayfish (*Pacifastacus leniusculus*, Astacidae). Rev Fish Biol Fisheries, 19:167-176.
- Sam Cookiyaei A, Afsharnasab M, Razavilar V, Motalebi A, Kakoolaki S, Asadpor Y, Yahyazade MY & Nekuie Fard A. 2012. Experimentally pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* in freshwater Crayfish (*Astacus leptodactylus*) in iran. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 11(3): 644-2012.
- Vey A. (1978). Infection fongines chez l'écrevisse *Astacus leptodactylus* Esch. Freshwater Crayfish, 4: 403-410.
- Vigneux D & Vigneux E. 1981. Gestion des peuplements astacicoles - repeuplements. Bull. Franç. Pisc. 281:169-184.



CONTRASTO ALLA DIFFUSIONE DEL GAMBERO ROSSO DELLA LOUISIANA *PROCAMBARUS CLARKII*

– M. Zanetti & A. Rucli –

Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine
email: massimo.zanetti@regione.fvg.it; alessandro.rucli@regione.fvg.it

Per contrastare la diffusione della specie alloctona invasiva *Procambarus clarkii*, RARITY ha previsto una strategia complessa, costituita fondamentalmente da catture massive, associate ad altre misure tese ad incrementare l'efficacia del contenimento: il rilascio di predatori naturali come l'anguilla, l'impiego di esche maggiormente efficaci e la sterilizzazione di una parte delle popolazione. Il risultato atteso dal progetto è il decremento della popolazione catturabile almeno del 60% in tutta la regione FVG e la contrazione – o la non espansione – delle aree di presenza. Per popolazione catturabile si intende quella cattu-

rabile con le nasse, rimanendo esclusi gli esemplari piccoli non trattenuti dalla maglia delle nasse. Per la cattura del gambero rosso della Louisiana si è fatto impiego di nasse a doppio inganno simili a quelle impiegate nei monitoraggi, di forma cilindrica, richiudibili, aventi lunghezza di cm 60 e diametro di 30 cm. Sono state impiegate svariate tipologie di esca, ma per comodità si è fatto largo impiego di scatolette di cibo per gatti. Le operazioni sono state affidate agli operatori dell'Ente tutela pesca (ETP), precedentemente formati in appositi corsi (Fig. 46 e 47).



Fig. 46. Operatori ETP impegnati nelle attività di cattura.
Fig. 46. Operatives of ETP during the capture activity.



Fig. 47. Gamberi rossi della Louisiana catturati.
Fig. 47. Louisiana red swamp crayfish trapped.

L'attività è iniziata con l'avvio del progetto in alcuni siti di presenza nota del gambero rosso ed è proseguita anche in occasione dei corsi di formazione del personale ETP (primavera 2012), realizzando la cattura di qualche centinaio di esemplari. Successivamente al primo monitoraggio, conclusosi con l'estate 2012, si sono avute informazioni maggiormente dettagliate sulla diffusione della specie e questo ha consentito di pianificare le attività nei sei siti di presenza accertata. Le informazioni raccolte sono state poi implementate nel corso dei monitoraggi degli anni 2013 e 2014, che hanno consentito di rilevare la presenza di *P. clarkii* in ulteriori due stazioni.

L'Università di Firenze (UNIFI) ha elaborato a favore di ETP una proposta d'intervento differenziata per ciascun sito, considerate le caratteristiche ambientali e quelle della popolazione rilevata (Fig. 48).

Le informazioni raccolte con i monitoraggi sono state integrate con le segnalazioni pervenute da organi addetti alla vigilanza (es. Corpo forestale regionale) o da privati, raccolte in un apposito database.

Relativamente alle segnalazioni, è stato messo a punto un apposito protocollo di risposta rapida o "Early Detection Rapid Response" (EDRR), di cui sono stati portati a conoscenza tutti gli enti interessati: Corpo forestale, Regione, Polizia

provinciale, Comuni, Protezione civile, ARPA. Il protocollo individua le specie di gamberi alloctoni cui prestare attenzione e indica l'ETP come soggetto cui inviare le segnalazioni di presenza di queste specie. Prevede inoltre che l'ETP proceda alla verifica della fondatezza delle segnalazioni, attivi il monitoraggio e il tentativo di eradicazione della popolazione. È acclarato infatti che solo nella fase di insediamento di una nuova popolazione possa ragionevolmente parlarsi di eradicazione di gamberi alloctoni, essendo questo risultato praticamente irraggiungibile per le popolazioni già affermate. Si veda anche lo specifico paragrafo sui protocolli EDRR a pagina 55 (Fig. 49).

Le segnalazioni dei cittadini sono estremamente importanti, soprattutto per progetti su scala regionale, dove la raccolta delle informazioni da parte dei soli addetti ai lavori non può essere esaustiva. La collaborazione dei cittadini che partecipano attivamente alla raccolta e all'invio di informazioni e dati, è nota con il nome di *citizen science* ed è oggi resa più agevole rispetto ad un tempo grazie alla crescita esponenziale degli accessi a Internet e all'utilizzo frequente di *social network* e di dispositivi informatici. Tramite questi strumenti è possibile raccogliere grandi quantità di informazioni che necessitano però di una validazione, che può avvenire sempre attraverso strumenti informatici.



Fig. 48. Siti di presenza del gambero rosso negli anni 2012, 2013 e 2014.

Fig. 48. Sites with presence of Louisiana red swamp crayfish in 2012, 2013 and 2014.



Fig. 49. Esemplari di gambero rosso liberati nel torrente Cellina a Claut. Molti di loro sono morti per le rigide condizioni ambientali. Gli altri sono stati catturati a seguito dell'attivazione del protocollo di risposta rapida.

Fig. 49. Specimens of Louisiana red swamp crayfish found in the Cellina river in Claut. Many of them died on environmental conditions. The others were captured as a result of the activation of the Early detection and rapid response protocol.

Da queste considerazioni, nel 2014, grazie alla collaborazione dell'Università di Trieste (UNITS) e del progetto SIIT (www.siiit.eu), è nato "Il Sistema di Segnalazione del Gambero Rosso della Louisiana", uno strumento di *citizen science* sviluppato per il progetto RARITY e concepito per consentire ai cittadini la segnalazione di questa pericolosa specie alloctona invasiva (www.gamberialieni.divulgando.eu). Chiunque, utilizzando il proprio *smartphone* o *computer* può accedere al sito *web* e informarsi sul progetto, conoscere le caratteristiche distintive del gambero rosso della Louisiana e consultare le segnalazioni pubblicate da altri utenti sia come elenco che come punti su mappa GIS, nonché contribuire al monitoraggio inviando una propria segnalazione d'avvistamento.

Tali segnalazioni sono validate da personale esperto di UNITS e inviate all'ETP per l'eventuale attivazione dei protocolli di risposta rapida.

La procedura, linkabile dal sito dal progetto RARITY e ampiamente divulgata, ha consentito di raccogliere numerose segnalazioni ed anche di attivare nel corso del 2014 il protocollo di risposta rapida in un sito prossimo al fiume Livenza in Comune di Sacile, che costituisce il nono sito con presenza accertata di una popolazione di *P. clarkii* (Fig. 50). Rientrano certamente tra le catture massive anche quelle effettuate a scopo di monitoraggio. Gli esemplari di *P. clarkii* catturati nel corso di tale attività, che complessivamente sono oltre un migliaio, sono stati, infatti, tutti rimossi.

Per quanto attiene il rilascio di predatori naturali, nel corso del progetto sono stati complessivamente immessi cir-



Fig. 50. Citizen science: la foto allegata ad una segnalazione pervenuta tramite Internet.

Fig. 50. Citizen Science: the photo attached to a record sent via Internet.



Fig. 51. Operazioni di rilascio delle anguille.

Fig. 51. Eels release operations.

ca 400 kg di giovani anguille nel canale Brancolo (Gorizia). Il rilascio, avvenuto nell'ambito di un programma regionale e nazionale di conservazione della specie, rappresenta un tassello importante della strategia per il contenimento dell'espansione del gambero rosso, in quanto l'anguilla è una predatrice attiva ed efficace degli stadi giovanili di gambero e il Brancolo rappresenta un corso d'acqua a sud del quale vi sono importanti popolazioni di *P. clarkii*, situazione che non si è verificata a nord di tale canale (Fig. 51). Al fine di massimizzare la tutela dell'anguilla e il suo impatto predatorio, dall'anno 2012 l'ETP ne ha disposto il divieto di pesca nel Brancolo.

In collaborazione con l'UNITS, l'ETP ha sperimentato in campo l'impiego di esche non alimentari, create con attrattivi sessuali, finalizzate ad incrementare la selettività delle nas-



Fig. 52. Operazioni di sterilizzazione dei maschi di gambero rosso.
Fig. 52. Sterilizations activity of Louisiana red swamp crayfish males.

se, entro cui normalmente entrano diverse specie non target, anche con riguardo al sesso e al grado di maturità sessuale dei gamberi da catturare.

La sperimentazione, ripetuta in un sito del pordenonese e in uno della provincia di Gorizia, ha dato risultati incoraggianti, come riportato al paragrafo “Allestimento di esche feromonali e prova in campo” a pagina 83.

In collaborazione con l'UNIFI di Firenze è stata applicata nel lago Casette o Cester nel comune di Sesto al Reghena (Pordenone) la *Sterilized male release technique* (SMRT), ovvero una misura che si prefigge il contenimento numerico delle popolazioni attraverso il rilascio di maschi sterili. Un approfondimento in merito è riportato al paragrafo specifico a pagina 113 (Fig. 52).

La strategia di contenimento del gambero rosso è stata applicata in modo differenziato sul territorio regionale in relazione alle differenti situazioni ambientali. Laddove la presenza di *P. clarkii* si è rivelata molto diffusa e abbondante, interessando reticoli idrografici complessi, corsi d'acqua che scorrono tra regioni differenti (con metodi di gestione diversi della problematica) o contesti di difficile accesso, si è ritenuto più ragionevole limitare l'intervento ad un monitoraggio della situazione, cercando di raccogliere dati utili a definire l'areale di diffusione e la consistenza della popolazione. Nel caso invece di popolazioni più isolate si è proceduto con l'attivazione delle misure di vero e proprio contrasto. Di seguito, in forma schematica, sono dettagliati gli inter-

venti differenziati per i diversi siti, specificando che alla data di redazione del presente elaborato le operazioni stanno continuando e quindi i dati sono da considerare parziali.

- Lago Paker o Cester in località Casette di Sesto al Reghena (Pordenone): catturati complessivamente oltre 11.800 esemplari e applicata la tecnica SMRT mediante il rilascio di complessivi 500 maschi sterili provenienti dallo stesso lago.
- Canali in Località Alberoni o bonifica Sacchetti (Gorizia): rimossi oltre 5.000 esemplari, in parte utilizzando le esche feromoniche realizzate dall'Università di Trieste. Esteso il monitoraggio al fine di definire l'areale occupato dalla specie.
- Fossati in Località Campomolle, Comune di Teor (Udine): rimossi circa 2.700 esemplari con catture massive ripetute. Esteso il monitoraggio al fine di definire l'areale occupato dalla specie.
- Rio Lin o Villutta in Località Villutta, Comune di Chions (Pordenone): rimossi oltre 400 esemplari. Esteso il monitoraggio al fine di definire l'areale occupato dalla specie.
- Fossati di Muzzana del Turgnano (Udine): attivato il protocollo EDRR che ha dato esito positivo confermando la presenza in un'area già fortemente colonizzata dalla specie.
- Torrente Cellina, Claut (Pordenone): nel 2012 rimossi circa 100 esemplari applicando il protocollo di risposta rapida. Successivi monitoraggi hanno escluso la presenza della specie negli anni 2013 e 2014.
- Smorta del Livenza a San Giovanni di Livenza, Sacile (Pordenone): nel 2014 applicato il protocollo di risposta rapida che ha confermato la presenza della specie in un'area di difficile accesso.

Degli animali catturati sono stati rilevati il sesso e la lunghezza del cefalotorace.

Tutti gli esemplari catturati, ad eccezione dei maschi destinati alla sterilizzazione, sono stati soppressi mediante refrigerazione e congelamento e successivamente smaltiti tramite incenerimento. Alcuni esemplari catturati sono stati forniti all'UNITS per le indagini genetiche e altri all'ISMAR per indagini sui metalli pesanti e sulla tossicità delle carni. I restanti sono stati conferiti all'IZSVE per le analisi sanitarie e per lo smaltimento per incenerimento.

COMBATING THE SPREAD OF THE LOUISIANA RED SWAMP CRAYFISH *P. CLARKII*

– M. Zanetti & A. Rucli –

Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine

email: massimo.zanetti@regione.fvg.it; alessandro.rucli@regione.fvg.it

In order to tackle the spread of the invasive alien species *Procambarus clarkii*, RARITY planned a complex strategy made up fundamentally of massive capture, associated with other measures aimed at increasing the efficacy of containment: the release of natural predators such as the eel, the use of more effective baits and the sterilisation of a part of the population.

The result expected from the project is the decrease in the catchable population by at least 60% throughout the FVG region and the contraction, or non-expansion, of the areas of presence. Catchable population refers to that which can be caught with fish traps, not including small specimens not caught in the mesh of the fish traps.

To catch the Louisiana red swamp crayfish use was made of double decoy fish traps similar to those used for monitoring and cylindrical in shape, closable, with height of 60 cm and diameter of 30 cm. Various types of bait were used although extensive use was made of tinned cat food for the sake of convenience. The operations were assigned to the ETP volunteer after previous training on special courses (Fig. 46 and 47).

The activity began with the launch of the project in some sites of known presence of the red swamp crayfish and continued also on the occasion of the training courses of the ETP staff (spring 2012), catching some hundreds of specimens. Subsequently, at the first monitoring which ended in summer 2012, more detailed information was gained on the spread of the species and this allowed planning of the activities in the six sites of ascertained presence. The information collected was then implemented during the monitoring operations in 2013 and 2014 which allowed the presence of *P. clarkii* to be detected in a further two stations. The University of Florence drew up for the ETP a proposal of differentiated intervention for each site, considering the environmental features and those of the population monitored (Fig. 48).

The information collected through the monitoring operations was integrated with the reports received from surveillance staff (e.g. regional forestry corps) or from private individuals, collected in a special database.

As regards the reports, a special rapid response protocol was

developed or an “Early Detection Rapid Response EDRR”, made known to all the organisations concerned: forestry corps, regional authorities, provincial police force, town councils, civil defence, regional environmental protection agency (ARPA). The protocol identifies the species of alien crayfish deserving attention and indicates the ETP as the organisation for sending reports of the presence of this species. It also provides for the ETP to check on the accuracy of the reports, activate monitoring and the attempt at eradication of the population. It is pointed out in fact that only in the phase of settlement of a new population can eradication of allochthonous crayfish be discussed, this being a practically unobtainable result for populations already freed. See also the specific paragraph on EDRR protocols, at pag. 58 (Fig. 49).

Reports from the public are extremely important, above all for a project on a regional scale where the collection of information by staff only cannot be exhaustive. Cooperation from the public, who take an active part in the collection and sending of information and data, is known by the name of “citizen science” and is nowadays made easier compared to the past thanks to the exponential growth in access to the Internet and the frequent use of social networks and computer technology devices. Via these tools it is possible to collect large quantities of information which however need validation, which can take place again via computer technology tools.

Basing on these conditions, in 2014, thanks to collaboration with the University of Trieste and with the SIIT project (www.siiit.eu), the “System of Reporting of the Louisiana red swamp crayfish” was introduced, a citizen science tool developed for the RARITY project and designed to allow the public to report this dangerous and invasive allochthonous species (www.gamberialieni.divulgando.eu).

Anyone, using their smartphone or computer, can therefore display the website and gain information about the project and the distinctive features of the Louisiana red swamp crayfish and consult the reports published by other users both as a list and as points on a GIS map, as well as contribute to monitoring by sending their own sighting report. These reports are validated by expert staff from the Uni-

iversity of Trieste and sent to the ETP for the possible activation of the rapid response protocols.

The procedure, with link from the site of the RARITY project and circulated extensively, has enabled numerous reports to be collected and also the EDRR protocol to be activated during 2014 in a site close to the river Livenza in the municipal area of Sacile, which constitutes the ninth site of ascertained presence of a population of *P. clarkii* (Fig. 50). Those carried out for the purpose of monitoring also come under mass capture. The specimens of *P. clarkii* caught during this activity, which total over a thousand, were in fact all removed.

As regards the release of natural predators, during the project a total of approximately 400 kg of young eels were introduced into the Brancolo canal (Gorizia). The release, performed as part of a regional and national programme for preservation of the species, represents an important part of the strategy of containing the spread of the red swamp crayfish in that the eel is an effective and active predator of juvenile crayfish and the Brancolo represents a waterway south of which there are large populations of *P. clarkii*, a situation which did not occur north of this canal (Fig. 51). In order to maximise safeguarding of eels and their impact as predators, from 2012 onwards the ETP banned eel fishing in the Brancolo.

In collaboration with the University of Trieste the ETP experimented in the field the use of non-food baits, created with sex lures, aimed at increasing the selectivity of the fish traps, which different non-target species normally enter, also with regard to the sex and to the degree of sexual maturity of the crayfish to be caught.

The experiments, repeated in a site in the Pordenone area and in one in the province of Gorizia, gave encouraging results, as indicated in the paragraph "Preparation of pheromonal baits and field test" at pag. 93.

In collaboration with the University of Florence the sterilised male release technique (SMRT) was applied in Lake Casette or Cester in the municipal area of Sesto al Reghena (Pordenone), i.e. a measure which aims at the containment of population numbers through the release of sterile males. Further details of this is given in the specific paragraph at pag. 115 (Fig. 52).

The strategy for containment of the red swamp crayfish was applied in a differentiated way in the regional area in relation to the different environmental situations. Where the presence of *P. clarkii* was found to be very widespread and abundant, involving complex hydrographic networks, waterways which run between different regions (with different methods of management of the problem) or contexts

with difficult access, it was considered more logical to limit intervention to monitoring of the situation, seeking to collect data useful for defining the distributional area and the size of the population.

In the case instead of more isolated populations the measures of actual combating were activated.

The interventions differentiated for the various sites are detailed schematically further on, pointing out that at the date of this report the operations are continuing and therefore the data are to be considered partial.

- Lake Paker or Cester at Casette near Sesto al Reghena (Pordenone): a total of over 11,800 specimens caught and the SMRT technique applied via the release of a total of 500 sterile males from the same lake.
- Canals at Alberoni or the Sacchetti reclaimed land (Gorizia): removed over 5,000 specimens, in part using the pheromone baits made by the University of Trieste. Monitoring extended in order to define the distributional area occupied by the species.
- Ditches at Campomolle, municipal area of Teor (Udine): around 2,700 specimens removed with repeated mass capture. Monitoring extended in order to define the distributional area occupied by the species.
- Rio Lin or Villutta at Villutta, municipal area of Chions (Pordenone): more than 400 specimens removed. Monitoring extended in order to define the distributional area occupied by the species.
- Ditches at Muzzana del Turgano (Udine): EDRR protocol activated which gave a positive result, confirming the presence in an area already strongly involved by the species.
- Cellina stream, Claut (Pordenone): in 2012 around 100 specimens removed applying the rapid response protocol. Subsequent monitoring ruled out the presence of the species in 2013 and 2014.
- Smorta del Livenza at San Giovanni di Livenza, Sacile (Pordenone): rapid response protocol applied in 2014 which confirmed the presence of the species in an area of difficult access.

The sex was determined and the length of the cephalothorax measured in the animals caught.

All the specimens caught, with the exception of the males intended for sterilisation, were exterminated by refrigeration and freezing and later disposed of by incineration. Some specimens caught were supplied to UNITS for genetic research and others to ISMAR for research into heavy metals and the toxicity of the flesh. The remainder were sent to IZSVE for the health analyses and for disposal through incineration.

UNA NUOVA NORMATIVA

– M. Zanetti & M.R. Mulas –

Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine

email: massimo.zanetti@regione.fvg.it; mariarosa.mulas@regione.fvg.it

Le motivazioni che inducono ad affrontare il problema della invasione dei nostri ambienti da parte delle specie alloctone di gamberi sono fundamentalmente legate agli impatti che queste possono avere sulla conservazione delle specie presenti da sempre nei nostri corsi d'acqua (*Austropotamobius pallipes* e *A. torrentium*), sulla salute dell'uomo e sul mantenimento degli equilibri degli ecosistemi.

È quindi importante comprendere il contesto normativo nel quale inquadrare la problematica.

I gamberi d'acqua dolce *A. pallipes* e *A. torrentium* sono specie presenti nel nostro territorio e tutelati dalla direttiva europea 92/43/CEE, nota come direttiva *Habitat*. Le due specie sono elencate nell'allegato II della direttiva tra quelle che richiedono la designazione di zone speciali di conservazione. *A. torrentium* è anche definita specie *prioritaria* per la estrema localizzazione del suo areale, che in Italia è limitato ad alcuni siti del Friuli Venezia Giulia.

I gamberi d'acqua dolce presenti da sempre nei corsi d'acqua del Friuli Venezia Giulia sono dunque specie di interesse comunitario.

La direttiva *Habitat* è stata recepita in Italia con DPR 357/1997, che istituisce la Rete Natura 2000 e dispone, tra l'altro, forti limitazioni all'introduzione in natura di specie non locali. Il DPR 357/1997 impone alle Regioni di adottare tutte le misure possibili per mantenere in uno stato di conservazione soddisfacente le specie di interesse comunitario e di provvedere al monitoraggio delle relative popolazioni. In Friuli Venezia Giulia la materia è stata disciplinata con la legge regionale 7/2008, che ha stabilito le procedure per la redazione delle Misure di conservazione e dei Piani di gestione dei siti appartenenti alla Rete Natura 2000: i Siti di importanza comunitaria (SIC), destinati a divenire Zone speciali di conservazione (ZSC), e le Zone di protezione speciale (ZPS), legate alla tutela dell'avifauna. Tra il 2011 e il 2013 sono state approvate le Misure di conservazione dei siti Natura 2000 del Friuli Venezia Giulia.

Nel corso del Progetto RARITY, l'Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia (ETP) ha partecipato al processo di predisposizione e approvazione delle Misure di conservazione dei siti Natura 2000 interessati dalla presenza dei gamberi di fiume ottenendo, oltre all'inserimento del divieto di cattu-

ra, immissione, allevamento e detenzione dei crostacei decapodi alloctoni maggiormente invasivi (generi *Procambarus*, *Cherax*, *Orconectes*, *Pacifastacus*), anche la definizione delle linee di indirizzo per le attività di monitoraggio delle popolazioni di gamberi di fiume e per il loro rafforzamento, anche mediante *restocking*, nonché per gli interventi di controllo delle specie alloctone (Allegato II).

La tutela diretta delle specie autoctone di gamberi d'acqua dolce è altresì disposta con la legge forestale regionale n. 9/2007 e con il relativo regolamento di attuazione, approvato con il DPR 74/2009, che hanno qualificato come "specie di interesse regionale" i gamberi appartenenti al genere *Austropotamobius* (Allegato III).

Per le specie di interesse regionale vige, su tutto il territorio della Regione, il divieto di cattura, di uccisione intenzionale, di perturbazione durante tutte le fasi del ciclo riproduttivo o durante l'ibernazione e lo svernamento, di distruzione delle uova, di danneggiamento intenzionale dei siti di riproduzione, di scambio, commercio e detenzione. Tali divieti si riferiscono a tutte le fasi del ciclo biologico delle specie animali di interesse regionale.

Le normative sopra citate sono prevalentemente dirette a tutelare le specie autoctone di gamberi da comportamenti che potrebbero minacciare in modo diretto la conservazione delle loro popolazioni.

È tuttavia evidente che la diffusione delle specie alloctone invasive rappresenta un ulteriore fattore di minaccia, sul quale è necessario intervenire per perseguire il medesimo obiettivo di conservazione delle specie locali.

Il Progetto RARITY si è proposto, tra l'altro, l'obiettivo specifico di predisporre una normativa che consenta di disciplinare questi aspetti, previo esame della normativa vigente in Europa e in Italia. È stata così realizzata dall'ETP una disamina delle normative vigenti che ha messo in luce la grande eterogeneità delle disposizioni adottate nelle diverse regioni italiane e una generale carenza normativa per quanto attiene le specie alloctone, per la gestione delle quali molto spesso non è stato individuato alcun soggetto competente. Su queste basi, e soprattutto sulla base dell'esperienza maturata nella conduzione del progetto RARITY, è stata predisposta una norma specifica, approvata con la legge regio-

nale n. 27/2012 (Allegato I). Con tale disposizione è stato introdotto l'articolo 6-bis della legge regionale n. 19/1971, intitolato "Tutela del gambero di acqua dolce". La norma, che si prefigge di limitare la presenza di gamberi alloctoni invasivi, individua l'Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia quale struttura competente a promuovere ed attuare iniziative di prevenzione e di contrasto alla diffusione di tali specie. A tal fine l'ETP deve provvedere a predisporre un Piano d'azione in cui sono individuate:

- a) le specie invasive di gamberi di acqua dolce e le aree interessate dalla loro diffusione;
- b) le aree nelle quali si attuano interventi di contenimento;
- c) le aree nelle quali si attuano interventi di eradicazione;
- d) le tipologie degli interventi e i protocolli operativi per il monitoraggio delle specie invasive e per la prevenzione dei rischi correlati.

Le previsioni del Piano d'azione costituiscono linee guida per la gestione della fauna ittica nelle acque interne del territorio regionale e per la loro attuazione l'Ente tutela pesca promuove accordi con altri enti pubblici o con soggetti privati senza fini di lucro.

Al fine di rendere efficace l'azione di prevenzione e contrasto alla diffusione delle specie invasive di gamberi, la norma in parola vieta la cattura a scopo di pesca sportiva e di mestiere, nonché l'immissione e il rilascio in natura di esemplari vivi appartenenti alle specie medesime. La violazione di tale divieto è punita con una sanzione amministrativa da 25 euro a 500 euro per ogni esemplare di specie invasiva catturato o immesso. Gli esemplari oggetto della violazione sono sempre confiscati.

Il divieto di cattura dei gamberi invasivi è apparso a molti in contraddizione rispetto all'esigenza di rimuovere dal territorio questi animali. Deve però essere considerato che le indagini sulle vie di accesso (*pathways*) del gambero rosso della Louisiana, condotte nelle fasi preliminari di RARITY dall'Università di Firenze, hanno rilevato che spesso la liberazione di *P. clarkii* in natura viene operata da parte di persone che, con l'interesse di una futura cattura copiosa, effettuano delle sciagurate introduzioni. Vietandone la pesca, quindi, si è inteso togliere l'interesse all'introduzione.

Al momento il Piano d'azione, i cui contenuti sono destinati a dare continuità al Progetto RARITY, è in corso di redazione da parte di ETP.

La nuova legge non ha potuto porre alcun vincolo al commercio delle specie invasive di gamberi alloctoni. Si è così deciso di avviare una campagna di informazione sui rischi legati alla presenza del gambero rosso, attraverso la distribuzione di materiale stampato che ha interessato tutti i negozi di animali presenti in Friuli Venezia Giulia e diretta ai loro clienti. Inoltre ETP ha sottoscritto un protocollo di intesa con i soggetti che organizzano le principali sagre e manifestazioni gastronomiche friulane che riguardano i gamberi. Così, a fronte dell'impegno di ETP a presenziare alle sagre con materiale informativo e divulgativo, il Comune e la Pro-loco di Remanzacco, il Comune e la Pro-loco di Amaro, il Comune di Morsano al Tagliamento e la Pro-loco di Salletto di Morsano al T.to, il Comune di Zoppola e la Pro-loco "Il Tiglio" di Orcenico Superiore si sono impegnati a non acquistare e importare gamberi alloctoni vivi.

A NEW LEGISLATION

– M. Zanetti & M.R. Mulas –

Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine

email: massimo.zanetti@regione.fvg.it; mariarosa.mulas@regione.fvg.it

The reasons leading to tackling of the problem of invasion of our environments by the allochthonous species of crayfish are basically linked to the impact that they can have on preserving the species which have always been present in Italy's waterways (*Austropotamobius pallipes* and *A. torrentium*), on human health and on the maintaining of the equilibrium of the ecosystems. It is therefore important to understand the legislative context of the problem.

The *Austropotamobius pallipes* and *A. torrentium* freshwater crayfish are species found in Italy and safeguarded by European directive 92/43/EEC, known as the Habitats directive. The two species are listed in annex II to the directive among those which require the designation of special conservation areas. *A. torrentium* is also defined as a priority species due to the extreme localisation of its distributional area which in Italy is limited to some sites in Friuli Venezia Giulia. The freshwater crayfish which have always been present in the waterways of Friuli Venezia Giulia are therefore species of EU interest.

The Habitats directive was transposed in Italy with Presidential Decree no. 357/1997 instituting the *Natura 2000* network and, among other things, places strong restrictions on the introduction into the wild of non-local species. The 357/1997 lays down adoption by the regional authorities of all possible measures for maintaining in a satisfactory state of conservation the species of EU interest and monitoring of the relative populations. In Friuli Venezia Giulia the matter was governed by regional law no. 7/2008, which laid down the procedures for drafting the conservation measures and plans for management of the sites in the *Natura 2000* network: sites of EU importance, destined to become special conservation areas and special protection zones linked to safeguarding of bird fauna. Between 2011 and 2013 the measures for conservation of the *Natura 2000* sites in Friuli Venezia Giulia were approved.

During the RARITY project the fish protection agency of Friuli Venezia Giulia (ETP) took part in the process of drawing up and approving the measures of conservation of the *Natura 2000* sites affected by the presence of white clawed crayfish obtaining, as well as inclusion of a ban on fishing, introduction, rearing and possession of the most invasive

allochthonous decapod crustaceans (genera *Procambarus*, *Cherax*, *Orconectes*, *Pacifastacus*), also the definition of policies for monitoring the populations of white clawed crayfish and their reinforcement, also through restocking, as well as control of allochthonous species (Annex II).

Direct safeguarding of the autochthonous species of freshwater crayfish was also provided under regional forestry law no. 9/2007 and with the relevant executive regulation, approved with regional presidential decree no. 74/2009, which qualified the crayfish belonging to the *Austropotamobius* genus as "species of regional interest" (Annex III).

For species of regional interest there is a ban in force throughout the regional area on catching, intentional killing, disturbance during all the phases of the reproduction cycle or during hibernation and wintering, destruction of the eggs, intentional damage to the reproduction sites, exchange, trade and possession. These bans refer to all the phases of the biological cycle of the animal species of regional interest.

The laws cited above are mainly aimed at safeguarding the autochthonous crayfish against behaviour which could directly threaten conservation of their populations.

It is however clear that the spread of the invasive allochthonous species represents a further threat factor on which it is necessary to intervene in order to pursue the same objective of conservation of the local species.

The RARITY project has set, among other things, the specific objective of preparing legislation which allows these aspects to be disciplined, after examining laws in force in Italy and the rest of Europe. The ETP thus examined the laws in force which highlighted the wide variety of the provisions adopted in the various regions of Italy and a general lack of laws as regards allochthonous species, for whose management a competent body has often not been identified. On these bases, and above all on the basis of the experience gained in carrying out the RARITY project, a specific law was drawn up, approved by regional law no. 27/2012 (Annex I). With this provision article 6 bis of regional law no. 19/1971 was introduced, entitled "Protection of the freshwater crayfish". The law, which sets out to limit the presence of invasive allochthonous crayfish, defines the fish protec-

tion agency of Friuli Venezia Giulia as structure competent for promoting and implementing schemes for prevention and combating of the spread of these species. For this purpose the ETP must prepare an action plan which identifies:

- a) the invasive species of freshwater crayfish and the areas involved in their spread;
- b) the areas in which containment schemes are implemented;
- b) the areas in which eradication schemes are implemented;
- d) the types of schemes and the working protocols for monitoring the invasive species and for prevention of correlated risks.

The provisions of the action plan constitute guidelines for the management of the fish fauna in the inland waters of the regional area and for their implementation the ETP promotes agreements with other public bodies or with non-profit private entities.

In order to render the action of prevention and combating of the spread of the invasive species of crayfish effective,

the law in question bans catches for the purpose of sports fishing and fishing as a profession, as well as introduction and release into the wild of live specimens belonging to the same species. Violation of this ban is punished with a fine of 25 to 500 Euros for each specimen of invasive species caught or introduced. The specimens involved in the violation are always confiscated.

The ban on catching invasive crayfish appears to contradict the need to remove these animals from the area. It has however to be considered that the investigations into the pathways of the Louisiana red swamp crayfish, carried out in the preliminary phases of the RARITY project by the University of Florence, have shown that often the release of *P. Clarkii* into the wild is the work of people who, in the interest of future abundant catches, unfortunately introduce these species. By banning fishing therefore the aim was to remove interest in the introduction.

At the moment the action plan, whose contents are destined to create continuity for the RARITY project, is being drafted by the ETP.

IL MONITORAGGIO DELLE POPOLAZIONI SELVATICHE

– M. Zanetti¹, A. Rucli¹, F. Scapini², F. Giovannelli³ & L. Aquiloni³ –

¹ Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine

email: massimo.zanetti@regione.fvg.it; alessandro.rucli@regione.fvg.it

² Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, via Romana, 17 • I - 50125 Firenze

³ Itinera C.E.R.T.A. srl, via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

Tra le azioni del progetto RARITY, quella relativa al monitoraggio ha rivestito un ruolo fondamentale e costituisce la base conoscitiva necessaria a supportare le corrette scelte gestionali future.

Nel corso del triennio 2012-2014 sono state monitorate complessivamente 238 stazioni distribuite sull'intero territorio regionale. L'attività è stata realizzata grazie alla collaborazione dei volontari dell'ETP e ha richiesto la formazione preventiva degli operatori e l'adozione di un protocollo standardizzato messo a punto dall'Università degli studi di Firenze (UNIFI).

Questa è stata l'azione con il maggior impegno in termini di personale e risorse impiegate da parte di ETP, visto che per ogni sito sono state effettuate ogni anno catture ripetute di gamberi, registrati i parametri chimico-fisici delle acque e calcolati l'Indice di Funzionalità Fluviale (IFF) e l'Indice Biotico Esteso (IBE) (questi ultimi solo in alcune stazioni). Per la scelta delle stazioni di monitoraggio si è provveduto ad una prima individuazione dei siti operata sulla carta, da parte di personale esperto facente capo all'ETP. Tra i criteri di selezione adottati, si sono tenuti in considerazione la facilità di accesso al sito e di conduzione del lavoro per la si-

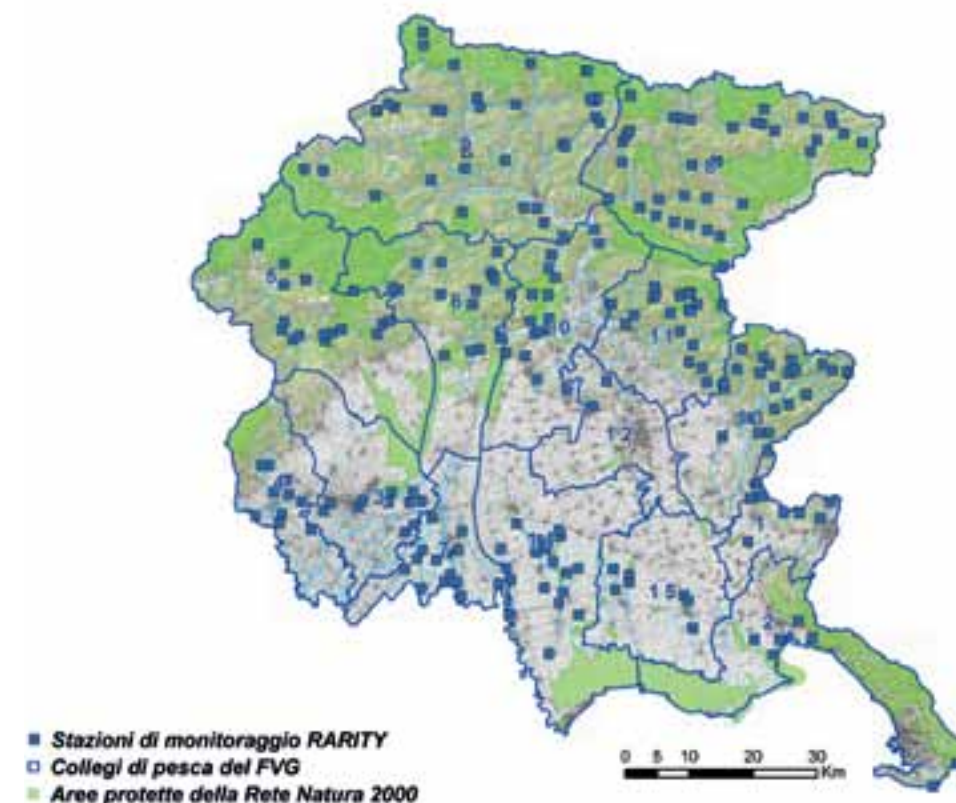


Fig. 53. La distribuzione delle stazioni di monitoraggio.
Fig. 53. Distribution of the monitoring stations.

curezza degli operatori, la disponibilità di dati pregressi su caratteristiche ambientali e/o presenza di gamberi indigeni ed alloctoni, la rappresentatività delle condizioni dell'habitat per i gamberi. Inoltre si è prestata particolare attenzione alla possibile sovrapposizione con i siti di monitoraggio individuati dall'Agenzia regionale per la protezione dell'ambiente (ARPA) nell'ambito del Piano regionale di tutela delle acque (PRTA), nonché all'inclusione di almeno una stazione all'interno del perimetro di ciascun sito della Rete Natura 2000. Tali criteri hanno consentito di disporre di dati sullo stato ecologico delle acque che possono rivelarsi utili non solo per le finalità del RARITY e possono contribuire alla raccolta di dati necessari agli aggiornamenti dei formulari standard dei siti Natura 2000.

In una seconda fase, la cartografia è stata consegnata ai volontari dell'ETP per una verifica sul campo mediante strumentazione GPS, al fine di confermare la validità delle scelte operate o eventualmente per proporre alternative valide. Nell'ultima fase, al termine dei sopralluoghi, ciascuna stazione è stata identificata con un codice univoco costituito

dal numero del collegio di pesca interessato (da 01 a 15), da un numero progressivo a tre cifre (da 001 a 238) e dal codice "RN" se ricadente in un sito della rete Natura 2000 o, diversamente, dal codice "00". Al fine di limitare la possibile confusione tra i vari punti, a ciascun codice è stato anche associato un nome, desunto dalla località o dal corso d'acqua, che è risultato comodo per l'individuazione da parte del personale operante sul campo.

Al termine del lavoro di individuazione delle stazioni di monitoraggio, 44 di esse sono risultate ricadere entro il perimetro di Siti Natura 2000 (Fig. 53) e 90 sovrapposte a punti di monitoraggio ARPA.

L'UNIFI ha quindi curato la rappresentazione cartografica di ciascun collegio di pesca con la localizzazione delle stazioni da campionare e la creazione di mappe particolareggiate di ciascuna stazione (Fig. 54). Queste mappe, riportanti il codice e il nome identificativi, sono state stampate a colori e consegnate alle squadre incaricate di effettuare i monitoraggi, unitamente all'apposita attrezzatura.

In corso d'opera si è reso necessario spostare o sostituire

alcune delle stazioni precedentemente individuate, a causa delle mutate condizioni ambientali che non hanno reso possibili i campionamenti. Altre stazioni di campionamento sono state aggiunte in base alle nuove segnalazioni pervenute all'ETP, soprattutto relative a siti colonizzati da *P. clarkii*. Non tutte le 238 stazioni individuate sono state monitorate ogni anno in quanto è stato necessario escluderne alcune rese impraticabili per carenza o eccesso di acqua, per atti vandalici o furto delle nasse.

I campionamenti sono stati realizzati tra l'inizio del mese di giugno e l'inizio di ottobre degli anni 2012, 2013 e 2014, interessando dapprima le stazioni di pianura e in seguito quelle montane.

Di ciascuna stazione è stata registrata la data di inizio del monitoraggio in modo che nei successivi anni fosse possibile effettuare le catture nello stesso periodo (con un'oscillazione massima di una settimana di anticipo o ritardo) e quindi disporre di dati confrontabili. Lo sforzo di campionamento è variato in relazione alla disponibilità di personale e di attrezzatura tra 2 e 23 stazioni/settimana.

Il monitoraggio è stato eseguito quindi da più squadre contemporaneamente e da un numero complessivo di persone coinvolte che supera la sessantina (Fig. 55 e 56).

Il protocollo standardizzato si è rivelato utile per eliminare il condizionamento dei risultati da parte della differente abilità degli operatori. Il protocollo consente quindi di raccogliere dati omogenei, utili a:

1) confrontare popolazioni diverse; 2) comparare popolazioni nel tempo; 3) individuare la relazione tra stato delle popolazioni e caratteristiche dell'habitat.

Per la redazione dei protocolli sono state utilizzate le buone pratiche già descritte in letteratura, opportunamente adattate (UNIFI) e dall'ETP al contesto presente in Friuli Venezia Giulia e alle diverse specie di decapodi da campionare. In particolare, sono stati utilizzati il manuale di Peay (2003), redatto per l'Unione europea a supporto del Programma LIFE Nature, e il protocollo di Reynolds (2010), utilizzato in Irlanda per il campionamento nei laghi.

Il lavoro è stato organizzato in squadre, composte da un numero minimo di 2 a un massimo di 5 volontari, a seconda dell'impegno richiesto e delle difficoltà per la rilevazione di ogni singola stazione. A ciascuna squadra è stato assegnato un numero predeterminato di stazioni di monitoraggio in base alla propria competenza territoriale.

Per ogni squadra è stato messo a disposizione da parte di ETP il seguente equipaggiamento:

- 1) automezzo;
- 2) un raccogliitore per ogni stazione di campionamento, contenente:
 1. schede da compilare per ciascuna stazione per registrare l'attività e le catture effettuate;
 2. mappa delle stazioni;
 3. guida sintetica delle attività di campo;
- 3) matite e penne;



Fig. 55. Operazioni di monitoraggio: conteggio, misurazione, marcatura degli esemplari catturati e contestuale tampone per accertare l'eventuale presenza di *Aphanomyces astaci*, responsabile della peste del gambero.

Fig. 55. Monitoring operations; counting, measuring, marking of the specimens captured and simultaneous swab to check on possible presence of *Aphanomyces astaci*, responsible for crayfish plague.



Fig. 56. Squadra ETP al lavoro per il monitoraggio delle popolazioni di *A. pallipes*.

Fig. 56. ETP work team for monitoring populations of *A. pallipes*.

- 4) nasse per la cattura ed esche;
- 5) cordino;
- 6) stivali e guanti;
- 7) sacchi neri per lo smaltimento delle esche;
- 8) secchi;
- 9) cartelli con avviso "Monitoraggio scientifico";
- 10) macchina fotografica;
- 11) termometro da campo;
- 12) carta assorbente e pennarello indelebile per marcatore;
- 13) calibro;
- 14) contenitori per il trasporto di animali;
- 15) contenitori con etanolo per la raccolta di pereiopodi di *A. pallipes* e/o *P. clarkii*;



Fig. 54. La mappa particolareggiata di una Stazione di monitoraggio.

Fig. 54. Detailed map of a monitoring station.

- 16) contenitore con etanolo per la raccolta di esemplari non identificati;
- 17) disinfettante e nebulizzatore a spruzzo;
- 18) forbici.

Sono state previste due tecniche di campionamento: il trappolaggio e il campionamento a mano.

Il trappolaggio o campionamento con nasse è stato di gran lunga il più utilizzato perché può essere utilizzato nella maggior parte delle tipologie di corso d'acqua e, soprattutto, perché assicura una facile standardizzazione della raccolta dei dati anche lavorando su ampie regioni e in un elevato numero di stazioni con operatori diversi. Tuttavia, occorre tenere in considerazione che le classi di taglia più piccole non vengono campionate, perché sfuggono dalle maglie della rete e dagli adulti eventualmente già presenti nelle trappole che li predano oppure perché tendono ad aggregarsi vicino agli argini in prossimità delle radici dove difficilmente vengono posizionate le nasse (Fig. 57).



Fig. 57. Posa delle nasse.
Fig. 57. Laying of fish traps.

In alternativa al trappolaggio, esclusivamente nei siti dove l'acqua è poco profonda, limpida, con corrente moderata e non consente l'immersione degli inganni della trappola, è stata prevista la possibilità di utilizzare la cattura a mano che permette di campionare anche gli individui di dimensione più piccola. Questo metodo presenta lo svantaggio di essere molto influenzato dall'abilità dello sperimentatore e quindi l'analisi dei dati non consente né un confronto rigoroso tra popolazioni né un'analisi predittiva esaustiva sulle popolazioni nel tempo. Per questo motivo, il campionamento a mano è stato utilizzato in sporadiche occasioni. In ogni stazione di campionamento sono state utilizzate 8 nasse (1 ogni 25 m, per circa 200 m di transetto) disponendole, ove possibile, a scacchiera lungo le sponde del corso d'acqua (Fig. 58).

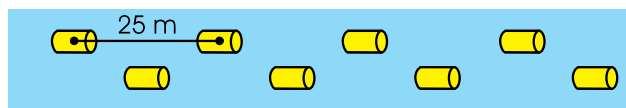


Fig. 58. Schema del transetto utilizzato per il monitoraggio.
Fig. 58. Transept scheme used for monitoring.

Le nasse sono state mantenute in acqua per un'intera settimana lavorativa all'anno, effettuando un totale di 4 pescate e prelevando i gamberi ogni giorno nella stessa fascia oraria. Ad ogni pescata sono state sostituite le esche in modo da mantenere la medesima capacità attrattiva tra i giorni di cattura. Dal secondo anno di monitoraggio, le attività nelle stazioni in cui non si sono catturati gamberi la stagione precedente è stata sospesa dopo tre giorni, in ulteriore assenza di catture. Ogni stazione è stata fotografata e georeferita ed è stata misurata la temperatura dell'acqua con un termometro da campo.

Le trappole sono costituite da nasse a doppio inganno, di forma cilindrica aventi maglie di 12 mm, di dimensioni 60x30 cm, costruite su una molla di filo armonico d'acciaio che ne consente la chiusura, utile per il trasporto. Al fine di consentire la sopravvivenza di specie non target si è cercato di posizionare la nassa in modo da non essere completamente sommersa e, nei siti in cui è stata segnalata la recente ricomparsa della lontra (anno 2014), gli ingressi delle nasse sono stati dotati di una griglia selettiva di 6,5x8,5 cm per eliminare il rischio di catture accidentali (Fig. 59). Per esca si è utilizzata una vaschetta di alluminio di cibo per gatti, della stessa marca, peso e gusto per tutta la durata del progetto. La vaschetta è stata opportunamente forata (ma non aperta) per permettere la fuoriuscita dell'odore per circa 24 ore (Fig. 60).

Tutti gli animali catturati, a prescindere dalla specie di appartenenza e dalla tecnica di campionamento, sono stati contati ogni giorno annotando il loro numero totale nell'apposito spazio della scheda di monitoraggio.

Il gambero di fiume, *Austropotamobius pallipes* complex, è stato marcato ad ogni cattura e immediatamente rilasciato nel sito di provenienza all'interno del transetto di cattura. Gli animali sono stati marcati con un pennarello resistente all'acqua, atossico (Fig. 61). La marcatura ha consentito di stimare la consistenza totale della popolazione.

Sul campo sono state raccolte da un campione casuale di circa 50 individui le informazioni sulla taglia (lunghezza del cefalotorace, Fig. 62), il sesso, il numero di chele, la presenza di parassiti, lo stato riproduttivo (uova o schiuse) e la muta, nonché sulla marcatura presente sul cefalotorace degli animali. Per ottenere un campione casuale sono stati esaminati tutti gli esemplari contenuti in una trappola, aprendone una alla volta fino al raggiungimento della dimensione ideale del campione.

Nelle stazioni con catture inferiori a 50 esemplari, si è proceduto all'esame di ciascun gambero catturato. Tutte le infor-



Fig. 59. Gli ingressi delle nasse posizionate in siti di accertata presenza di lontra sono stati appositamente protetti per limitarne il rischio di cattura.

Fig. 59. The entrances to the fish traps positioned in sites of known presence of otters were appropriately protected to limit the risk of capturing this species.



Fig. 60. Preparazione dell'esca. La vaschetta viene forata ma non aperta per consentire la durata dell'effetto attrattivo per almeno 24 ore.

Fig. 60. Preparation of the bait. The container is perforated but not opened in order to allow the lure effect to last for at least 24 hours.



Fig. 61. *A. pallipes* con marcatura temporanea impiegata per stimare la consistenza della popolazione, grazie alle successive ricatture.
Fig. 61. *A. pallipes* with temporary marking used to estimate the size of the population, thanks to subsequent re-catches.



Fig. 62. Operazioni di misurazione del cefalotorace di *A. pallipes*.
Fig. 62. Operations of measuring the cephalothorax of *A. pallipes*.

mazioni raccolte sono state registrate in un'apposita scheda. Inoltre, da circa 20 maschi di questo campione di individui è stato raccolto un pereiopode, tagliandolo con le forbici all'altezza della giuntura articolare. La rottura di un arto, sebbene possa sembrare una operazione molto dolorosa, è una forma di difesa per i gamberi che perdono naturalmente i propri arti bloccati da un predatore per riuscire a sfuggirgli. Tutti i pereiopodi del campione sono stati conservati in provetta (50 ml) con etanolo al 96% e sono stati inviati all'UNITS per caratterizzare geneticamente le popolazioni. Si è scelto di campionare solamente individui maschi per evitare di creare eccessivo stress nelle femmine in periodo riproduttivo. Il prelievo per le analisi genetiche è stato effettuato l'ultimo giorno di monitoraggio in modo da non alterare il comportamento dei gamberi e la loro catturabilità con le nasse, cosa che avrebbe compromesso una corretta stima della dimensione di popolazione con la tecnica marcatura/ricattura.

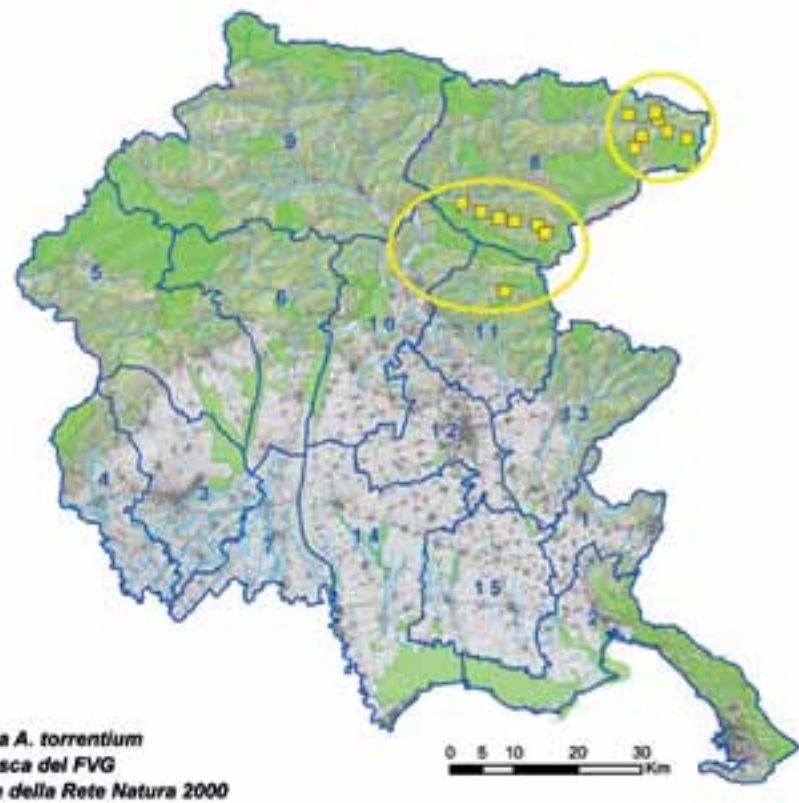


Fig. 63. Localizzazione dei siti in cui si è cercato *A. torrentium*.
Fig. 63. Locating sites where searches were carried out for *A. torrentium*.

Inoltre, in tutte le stazioni in cui gli operatori volontari hanno rilevato la presenza di gamberi sofferenti, sono stati tratti alcuni individui da inviare all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) per le analisi sullo stato sanitario.

In taluni rari casi è stato necessario, in relazione alla situazione contingente, accettare lievi scostamenti dai protocolli, annotati nelle rispettive schede di campo. Tali variazioni si sono rese necessarie per vari motivi. I più frequenti sono legati alle condizioni idrologiche dei corsi d'acqua (in condizioni di magra la lunghezza del transetto è stata condizionata dall'effettiva presenza di buche), a condizioni climatiche avverse (le piene improvvise dei torrenti montani hanno causato la perdita di numerose nasse e la necessaria interruzione del periodo di monitoraggio) o ad atti vandalici (asportazione di nasse, liberazione o sottrazione di gamberi). Nei siti per i quali la bibliografia indicava la possibile compresenza di *A. pallipes* complex e *A. torrentium* (ovvero in 14 delle stazioni monitorate) si è deciso, in accordo con l'Università di Firenze e con l'Università di Trieste, di adattare il protocollo. Lo scopo, in tali siti, era infatti quello di accertare l'eventuale presenza di entrambe le specie. Quindi, le nasse sono state innescate con fegato suino fresco, maggiormente attrattivo, e a tutti gli esemplari catturati è stato prelevato un campione di tessuto dal pereopode per le analisi

genetiche. Inoltre, in questi siti, il personale volontario ETP è stato supportato nel riconoscimento in campo delle due specie dal personale del Museo Friulano di Storia Naturale di Udine o dal consulente dott. Giorgio De Luise (Fig. 63). Le ricerche non hanno tuttavia consentito di catturare alcun esemplare di *A. torrentium*.

Terminate le attività di monitoraggio, nell'autunno 2014, una segnalazione qualificata ha consentito di rinvenire, in una località del tarvisiano, due esuvie, che le analisi genetiche svolte dall'UNITS hanno confermato appartenere a questa specie (Fig. 64).

Tutti i gamberi appartenenti alla specie alloctona invasiva *Procambarus clarkii*, una volta catturati, sono stati rimossi dal corso d'acqua e opportunamente soppressi e smaltiti come rifiuti speciali. Uno degli obiettivi principali del progetto RARITY è, infatti, la riduzione delle popolazioni di gamberi invasivi presenti nei corsi d'acqua del Friuli Venezia Giulia. Per la soppressione dei gamberi si è tenuto in considerazione che si tratta di animali ectotermi o, come vengono chiamati più comunemente, 'a sangue freddo'. Hanno cioè una temperatura corporea che varia con quella ambientale senza capacità di termoregolarsi per via fisiologica, caratteristica degli omeotermi, che invece mantengono una temperatura corporea costante. Infatti, man mano che il freddo invernale arriva, i gamberi riducono progressivamente le loro fun-



Fig. 64. Esopodite antennale di *A. torrentium*. A differenza di quello di *A. pallipes* è seghettato e rappresenta un carattere diagnostico per la specie. Foto L. Lapini.

Fig. 64. Antenna exopodite of *A. torrentium*. Unlike that of *A. pallipes* it is serrated and represents a diagnostic tool for the species. Photo L. Lapini.



Fig. 65 e 66. Rilievo di parametri chimici e idrometrici.
Fig. 65 and 66. Measurement of chemical and hydrometric parameters.

zioni metaboliche fino a cadere in uno stato di ibernazione da cui escono la primavera successiva con l'aumento della temperatura. Per questo motivo, i gamberi possono essere soppressi in modo ritenuto etico se esposti a temperature progressivamente più rigide e poi trasferiti e mantenuti in congelatore per almeno 48 ore. Per le attività del progetto RARITY ci si è attenuti a tale procedura.

Monitoraggio degli habitat

Per una corretta programmazione degli interventi di gestione delle popolazioni selvatiche di decapodi del Friuli Venezia Giulia si è ritenuto necessario analizzare le principali pressioni ambientali e antropiche alle quali le popolazioni sono sottoposte. Per questa ragione nel progetto RARITY si è operata la valutazione della idoneità degli habitat attraverso la rilevazione di parametri di tipo fisico-chimico, antropico e biologico.

Per questo peculiare aspetto sono stati talora utilizzati i dati raccolti da ARPA nelle stazioni di campionamento, ove disponibili. Nell'ottica di una prosecuzione delle buone pratiche sviluppate con RARITY anche oltre la chiusura del progetto, è stata necessaria ed opportuna la creazione di una rete di rapporti con Enti e Istituzioni locali.

Per alcune stazioni di interesse in cui non erano disponibili i dati ambientali per lo studio delle popolazioni astacole, si è proceduto alla raccolta degli stessi con un gruppo ristretto di operatori dell'ETP, opportunamente formati sui protocolli da seguire (Fig. 65 e 66).

Parametri fisico-chimici

Per ogni stazione di campionamento si è puntato a registrare pH, conduttività ($\mu\text{S}/\text{cm}$), temperatura dell'acqua ($^{\circ}\text{C}$) e ossigeno disciolto (mg/l), utilizzando uno strumento digitale dotato di sonde. La durezza carbonatica presente nell'acqua è stata invece misurata utilizzando il metodo colorimetrico. Inoltre, in un numero limitato di stazioni, sono state rilevate la velocità della corrente con un mulinello idrometrico e la profondità dell'acqua tramite un'asta graduata in un numero rappresentativo di punti nel sito di campionamento e, approssimativamente, l'ampiezza dell'alveo bagnato.

Fattori umani

Nelle stazioni di campionamento sono state registrate eventuali alterazioni idro-morfologiche, l'uso del suolo, le principali attività economiche, la densità di popolazione, il numero e la distanza dei centri abitati, la presenza di eventuali stabilimenti di acquacoltura, l'intensità delle attività di pesca. I

dati sono stati estrapolati, per quanto possibile, dalla cartografia regionale e integrati attraverso rilevazioni annuali sul campo e informazioni raccolte presso gli uffici competenti.

Indice biotico esteso (IBE)

Al fine di descrivere in modo sintetico la qualità degli habitat si è fatto ricorso all'indice IBE (Indice biotico esteso) che, rispetto alle classiche analisi di tipo chimico che rilevano con precisione solo il tipo e la quantità di inquinante, rileva gli effetti complessivi di tutti i fattori di stress ambientale, in atto o pregressi, che hanno contribuito ad alterare la comunità pristina di macroinvertebrati. In particolare questo indice, oltre a fornire una descrizione sintetica della qualità delle stazioni, consente di raccogliere un campione della comunità di macro-invertebrati attraverso cui è possibile comparare le stazioni con tecniche statistiche avanzate per l'analisi di dati ecologici.

Per misurare l'idoneità dei corsi d'acqua alla fauna astacicola attraverso i macroinvertebrati, sono stati utilizzati protocolli di ricerca del Trent Biotic Index (Woodwiss, 1964) rielaborati come "Extended Biotic Index" (EBI) e adattati per un'applicazione standardizzata ai corsi d'acqua italiani (Ghetti, 1997) e per le esigenze di progetto.

Scopo del progetto era, infatti, quello di raccogliere informazioni utili a descrivere l'idoneità ambientale delle stazioni per le specie oggetto di studio per poterne, successivamente, pianificare una corretta gestione sul territorio. Ad oggi, l'indice, benché non sia più accettato per la valutazione della qualità delle acque e sostituito da indici più complessi (DM 260/2010), rimane un ottimo metodo (per praticità di raccolta, tipo e comparabilità del dato) per valutare l'idoneità dell'habitat alla fauna astacicola.

Alcuni dati sono stati integrati con quelli raccolti da ARPA.

Indice di Funzionalità Fluviale (IFF)

L'indice IFF permette di valutare lo stato complessivo dell'ambiente fluviale e della sua funzionalità, intesa come risultato della sinergia e dell'integrazione di fattori biotici e abiotici presenti nell'ecosistema acquatico e in quello terrestre ad esso collegato. L'indice di funzionalità fluviale viene determinato sulla base di un manuale messo a punto dall'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (APAT), "Manuale IFF 2007". Esso fornisce una risposta concreta e tempestiva ai dettami della direttiva europea 2000/60/CE, che evidenziano l'importanza di valutare, per quanto riguarda i corsi d'acqua, "gli elementi idromorfologici a sostegno degli elementi biologici".

L'indice di funzionalità fluviale può essere applicato in qualunque ambiente d'acqua corrente, sia di montagna sia di pianura; non può essere applicato, invece, in ambienti di fo-

ce, sensibile all'azione delle maree e della risalita del cuneo salino, e in ambienti ad acque ferme (laghi, lagune, stagni, acque relittuali, ecc.).

Nell'ambito del progetto si è fatto riferimento all'IFF determinato dall'ARPA per i siti monitorati nell'ambito del Piano regionale di tutela delle acque.

Prevenzione della diffusione della peste del gambero

Opportuni protocolli per la disinfestazione di tutto il materiale da campo sono stati utilizzati al fine di impedire la trasmissione della peste del gambero alle popolazioni della specie indigena *A. pallipes* complex. Questa malattia è trasmessa attraverso le spore di *Aphanomyces astaci* che possono essere diffuse nei corsi d'acqua principalmente in due modi: attraverso la diffusione di gamberi invasivi nord americani, quali *P. clarkii*, che possono avere infezioni asintomatiche di peste, oppure utilizzando strumentazione contaminata e non opportunamente disinfestata in siti in cui la peste non è presente.



Fig. 67. Operazione di disinfezione dell'attrezzatura adoperata per il monitoraggio.

Fig. 67. Disinfecting of the equipment used for monitoring.

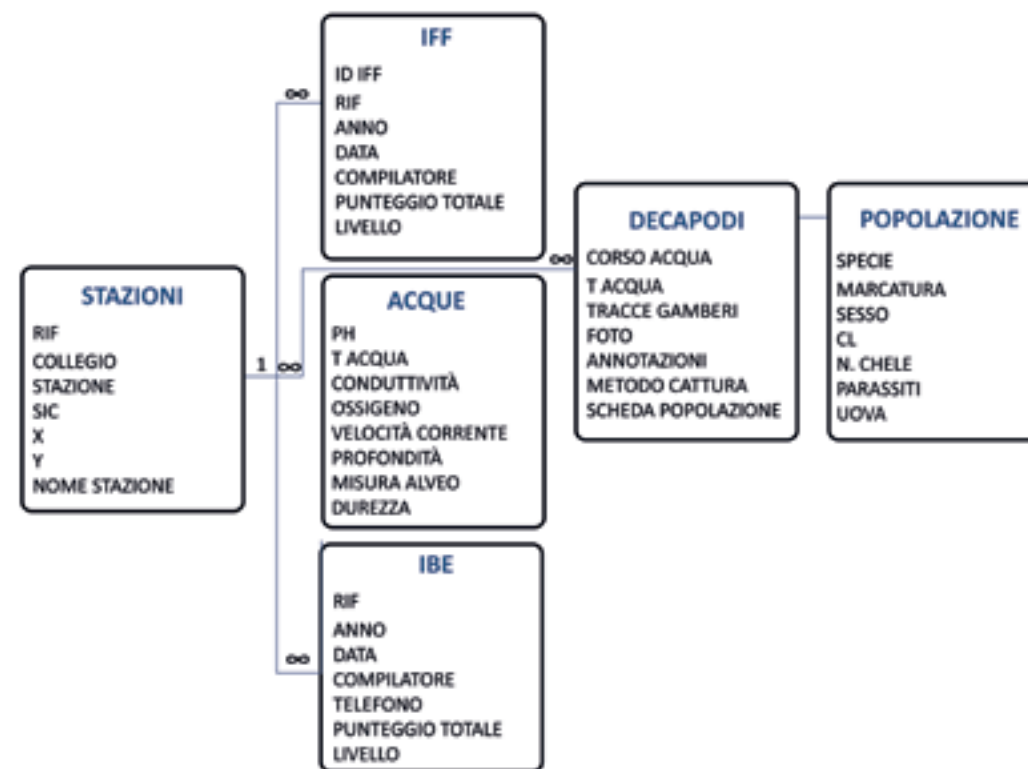


Fig. 68. Struttura della banca dati.

Fig. 68. Structure of the data base.

Per limitare il rischio di diffusione involontaria della patologia, l'attrezzatura necessaria per il campionamento è stata opportunamente disinfestata seguendo le indicazioni qui riportate:

- 1) spazzolare accuratamente il fango dall'attrezzatura, e in particolare dalle suole di scarponi e stivali, sciacquando il materiale da campo nel corso d'acqua per eliminarne eventuali residui;
- 2) aspergere gli stivali, le nasse, i retini ed eventualmente le ruote dei veicoli e quant'altro sia entrato in contatto con acqua o fango del sito con una soluzione di iodofori, ad una concentrazione di 500 ppm (prodotto commerciale Zoodyn, 28,6 ml/litro di acqua), da lasciare agire per almeno 10 minuti;
- 3) sciacquare con acqua di rubinetto al termine delle attività e lasciare asciugare le nasse al sole per almeno 48 ore.

Si è deciso di fare impiego di una soluzione di iodofori, tra quelle impiegabili, in quanto non rovina la gomma degli stivali ed è facilmente impiegabile con normali spruzzini (pompe irroratrici) (Fig. 67). La disinfezione ha riguardato tutti i materiali impiegati: nasse, secchi, stivali, retini, automezzi e barche.

Nell'ambito delle iniziative di divulgazione, è stata data ampia informazione sull'importanza di tali comportamenti,

auspicabilmente da adottarsi anche da parte di pescatori o operatori che intervengono a vario titolo in acqua (per manutenzione dei canali, campionamento scientifico ecc.).

L'organizzazione dei dati

Tutti i dati riguardanti le stazioni di campionamento e le caratteristiche delle popolazioni sono inseriti in un database Access. Tale database, ideato e implementato dal personale dell'UNIFI, è stato strutturato (Fig. 68) per organizzare le informazioni raccolte durante le attività di monitoraggio (secondo quanto previsto nei *Protocolli di Monitoraggio*), consentendone una facile gestione da parte del personale ETP anche oltre la chiusura del progetto RARITY.

Le principali informazioni contenute nel database di RARITY sono state georiferite e importate in un progetto cartografico in modo da essere visualizzate, elaborate e rappresentate graficamente utilizzando software GIS.

I risultati dei monitoraggi

Il monitoraggio condotto con metodo standardizzato nei tre anni di progetto ha permesso di descrivere in modo detta-

MONITORING

– M. Zanetti¹, A. Rucli¹, F. Scapini², F. Giovannelli³ & L. Aquiloni³ –

¹ Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine

email: massimo.zanetti@regione.fvg.it; alessandro.rucli@regione.fvg.it

² Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, via Romana, 17 • I - 50125 Firenze

³ Itinera C.E.R.T.A. srl, via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

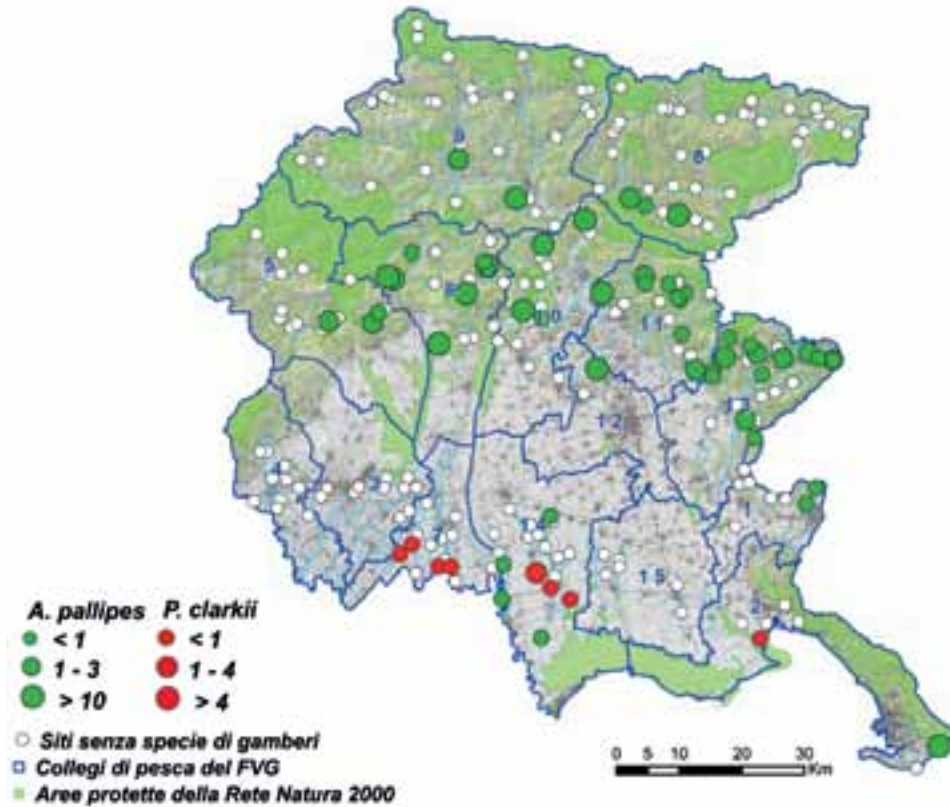


Fig. 69. Rappresentazione cartografica dell'esito dei monitoraggi dell'anno 2014.

Fig. 69. Cartographic representation of the results of monitoring of the year 2014.

gliato la distribuzione e l'abbondanza delle due specie nella regione Friuli Venezia Giulia (Fig. 69): il gambero indigeno *Austropotamobius pallipes* (più correttamente *A. italicus*) e il gambero invasivo *Procambarus clarkii*.

Per quanto riguarda la specie indigena, abbiamo rilevato una distribuzione molto meno ampia dell'atteso, a conferma della contrazione della specie registrata in questi anni anche nel resto d'Europa. La specie si concentra nella fascia pedemontana e, in particolare, nel collegio 6 - Spilimbergo in cui si trovano le popolazioni più numerose e ben strutturate. In questa fascia, come si è potuto rilevare grazie all'applicazione di un protocollo di monitoraggio standardizzato, le popolazioni si sono mantenute pressoché costanti sia come distribuzione che come abbondanza nei tre anni di attività del progetto RARITY. In alcune stazioni ido-

nee dal punto di vista ecologico a sostenere la specie, sono state effettuate delle immissioni di giovanili per contrastare il generale decremento del gambero nel suo areale naturale di distribuzione.

Il gambero invasivo è presente, invece, nel sud del Friuli Venezia Giulia in torrenti a valle delle risorgive, ma in un numero crescente di stazioni che presentano popolazioni piuttosto abbondanti. Seguendo i risultati del monitoraggio, le attività di contrasto si sono quindi concentrate in queste zone riuscendo a contenerne la diffusione. Inoltre, l'applicazione dei protocolli di risposta rapida ha consentito l'eradicazione di un piccolo nucleo della specie presente nella parte pedemontana sopra la linea delle risorgive (stazione Cellina Claut). Il monitoraggio 2013, e quello del 2014 confermano l'avvenuta eradicazione della specie in questa stazione.

Among the actions of the RARITY project the one relating to monitoring has played an essential role and constitutes the knowledge base necessary for supporting the correct future management decisions.

During the three-year period 2012-2014 a total of 238 stations distributed over the entire regional area were monitored. It was possible to carry out the activity thanks to assistance from the volunteers of the ETP and required prior training of the operatives and the adoption of a standardised protocol developed by the University of Florence. This was the action with the greatest commitment in terms of personnel and resources used by the ETP, seeing that for every site every year repeated catches of crayfish were carried out, the chemical and physical parameters of the waters recorded and the fluvial functionality index (FFI) and the extended biotic index (EBI) calculated (the latter indices only in some stations).

For the choice of the monitoring stations a first identification of the sites was carried out on paper by expert staff connected to the ETP. Among the selection criteria adopted consideration was made of the ease of access to the site and performance of the work for the safety of the operatives, availability of previous data on the environmental features and/or presence of indigenous and allochthonous crayfish and the representative nature of the conditions of the habitat for the crayfish. Moreover special focus was placed on the possible overlap with the monitoring sites identified by the regional environmental protection agency (ARPA) as part of the regional waters protection plan (PRTA) and the inclusion of at least one station within the perimeter of each site of the *Natura 2000* network. These criteria allowed past and future data to be produced on the ecological state of the waters which can be found to be useful not only for the aims of RARITY and can contribute to the collection of data necessary for updates of the standard models of the *Natura 2000* sites.

In a second phase the maps were handed out to the ETP volunteers for an inspection in field using GPS instruments, in order to confirm the validity of the choices made or possibly for proposing valid alternatives. In the final phase, at the end of the inspections, each station was identified with

a unique code made up of the number of the fishing area concerned (from 01 to 15), a three serial number (from 001 to 220) and the "RN" code if within a site of the *Natura 2000* network or, otherwise, by the code "00". In order to limit the possible confusion between the various points, each code has also been associated with a name, taken from the place or waterway, which was found to be convenient for identification by staff operating in field.

At the end of the work on identifying the monitoring stations, 44 of them were found to fall within the perimeter of *Natura 2000* sites (Fig. 53) and 90 overlapping ARPA monitoring points.

The University of Florence therefore handled the mapping of each fishing area with location of the stations for sampling and the creation of detailed maps of each station (Fig. 54). These maps, bearing the identification code and name, were printed in colour and handed out to the teams assigned monitoring, together with the appropriate equipment.

During the work it was necessary to move or replace some of the stations previously identified due to the change in weather conditions which prevented sampling. Other sampling stations were added on the basis of new reports received by the ETP, above all relating to sites colonised by *P. clarkii*. Not all the 226 stations identified were monitored every year in that it was necessary to exclude some made impassable due to a lack or excess of water, vandalism or theft of the fish traps.

The samplings were carried out between the start of June and the start of October 2012, 2013 and 2014, involving first of all the stations on the lowland and later the mountain ones. The monitoring start date was recorded for each station so that in later seasons it was possible to carry out the catches in the same period (with a maximum variation of a week early or late) and therefore have comparable data. The sampling effort varied in relation to the availability of staff and equipment between 2 and 23 stations/week.

Monitoring was performed therefore by several teams simultaneously and by a total number of people involved of over sixty (Fig. 55 e 56). The standardised protocol was found to be useful for preventing the results from being conditioned by the varying capability of the operatives. The protocol

therefore allows homogeneous data to be collected, useful for: 1) comparing different populations; 2) comparing populations over time; 3) identifying the relationship between the state of the populations and the features of the habitat. For drafting of the protocols good practices already described in literature were used, appropriately adapted by the UNIFI and by the ETP to the context of Friuli Venezia Giulia and the different species of decapods to be sampled. More particular the Peay handbook (2003) was used, drafted for the European Union as support for the LIFE Nature programme and the Reynolds (2010) protocol, used in Ireland for sampling in lakes.

The work was organised in teams, composed of a minimum of 2 to a maximum of 5 volunteers according to the commitment required and the difficulties in the detection of each individual station. Each team was assigned a predetermined number of monitoring stations on the basis of relevant territorial competency.

The ETP made available the following equipment for each team:

- 1) motor vehicle;
- 2) folder for every sampling station, containing:
 1. charts to be filled in for each station in order to record the work and catches performed;
 2. map of the stations;
 3. brief guide of field work;
- 3) pencils and pens;
- 4) fish traps for catches and baits in sufficient number;
- 5) rope;
- 6) boots and gloves;
- 7) black bags for disposal of baits;
- 8) buckets;
- 9) "scientific monitoring" warning signs;
- 10) camera;
- 11) field thermometer;
- 12) absorbent paper and indelible felt pen for markings;
- 13) gauge;
- 14) containers for transporting animals;
- 15) containers with ethanol for collecting pereopods of *A. pallipes* and/or *P. clarkii*;
- 16) container with ethanol for collecting unidentified specimens;
- 17) disinfectant and spray nebuliser;
- 18) scissors.

Two sampling techniques were foreseen: trapping and hand sampling.

Trapping or sampling with fish traps was by far the most used as it can be adopted in most types of waterway and, above all, because it ensures easy standardisation of the collection of the data even when working over extensive areas and in a high number of stations with different operatives. However it has to be taken into consideration that the smaller size classes are not sampled, as they escape from the meshes of the net and from the adults possibly already

present in the traps who prey on them or because they tend to aggregate close to the banks near the roots where the fish traps are difficult to position (Fig. 57).

As an alternative to trapping, only in sites where the water is not very deep and does not allow immersion of the trap lures, clear and with moderate current, has the possibility been foreseen of catching by hand which allows individuals of smaller size to be also sampled. This method has the disadvantage of being highly influenced by the skill of the tester and therefore the analysis of the data does not allow either a strict comparison among populations or an exhaustive prediction analysis of the populations in time. For this reason hand sampling was used on sporadic occasions. 8 fish traps were used in each sampling station (1 every 25 m, for about 200 m of transept) placing them, where possible, in a chequer pattern along the banks of the waterway (Fig. 58). The fish traps were kept in water for a whole working week per year, carrying out a total of 4 catches and taking out the crayfish every day in the same time range. At each haul the baits were replaced in order to maintain the same capacity for attraction among the days of catching. Starting from the second year of monitoring the activities at the stations where crayfish had not been caught the previous season were suspended after three days, in the further absence of catches. Each station was photographed and georeferenced and the temperature of the water measured with a field thermometer.

The traps were made up of double decoy fish traps, cylindrical in shape, with 12 mm meshes, measuring 60 x 30 cm, built on a spring of harmonic steel wire which allows their closure, useful for transport. In order to allow survival of non-target species it was attempted to position the fish trap so as not to be completely submerged and, in sites where the recent reappearance of the otter has been reported (in 2014), the entrances of the fish traps were fitted with a 6.5 x 8.5 cm selective grille to avoid the risk of accidental catches (Fig. 59). An aluminium tin of cat food was used as bait, of the same brand, weight and flavour throughout the project. The tin was appropriately perforated (but not opened) to allow the release of the odour for about 24 hours (Fig. 60).

All the animals captured, aside from the relevant species and the sampling technique, were counted each day, noting down their total number in the appropriate space on the monitoring chart.

The white clawed crayfish, *A. pallipes*, was marked at each catch and immediately released in the site of origin inside the transverse section of the trap. The animals were marked with a non-toxic and water-resistant felt pen (Fig. 61). Marking allowed an estimate of the total abundance of the population.

In the field, from a random sample of approximately 50 individuals, information was collected on size (length of the cephalothorax, Fig. 62), sex, number of pincers, the presence of parasites, reproductive state (eggs or hatched) and exuvia-

tion, as well as on the marking present on the cephalothorax of the animals. In order to obtain a random sample all the specimens contained in a trap were examined, opening one of them at a time until the ideal size of the sample was reached. Each crayfish caught was examined in the stations with catches of less than 50 specimens. All the information collected was recorded on a special chart. Moreover from approximately 20 males of this sample of individuals a pereopod was collected, cutting it with the scissors at the articular joint. The breaking of a limb, although it may seem a very painful operation, is a form of defence for crayfish who lose their limbs naturally if blocked by a predator in order to succeed in escaping from it. All the pereopods of the sample were kept in a test tube (50 ml) with 96% ethanol and were sent to the UNITS in order to characterise the populations genetically. It was decided to sample only male individuals in order to avoid creating excessive stress in the females during the reproductive period. Sampling for genetic analyses was carried out on the last day of monitoring so as not to alter the behaviour of the crayfish and their potential catching with fish traps, which would have jeopardised a proper estimate of the population size with the marking/recapturing technique.

Moreover, in all the stations where volunteer operatives noted the presence of diseased crayfish, some individuals were withheld in order to be sent to the ISZVe for analyses of the state of health.

In some rare cases it was necessary, in relation to the contingent situation, to accept slight departures from the protocols, noted on the respective field charts. These changes became necessary for various reasons. The more frequent ones are linked to the hydrological conditions of the waterways (in low water conditions the length of the transverse section was conditioned by the effective presence of holes), to adverse weather conditions (flash floods in mountain streams cause the loss of numerous fish traps and the necessary interruption of the monitoring period) or acts of vandalism (removal of fish traps, freeing or removal of crayfish). In the sites for which the bibliography indicated the possible joint presence of *A. pallipes* complex and *A. torrentium* (i.e. in 14 of the stations monitored) it was decided, in agreement with the UNIFI and with the UNITS, to adjust the protocol. The purpose at these sites was in fact that of ascertaining the possible presence of both species. Therefore the fish traps were baited with fresh pig's liver, more attractive, and from all the specimens captured a sample of tissue from the pereopod was taken for the genetic analyses. Moreover in these sites the voluntary ETP staff received back-up for the in-field recognition of the two species by staff from the Museo Friulano di Storia Naturale or from the consultant Mr. Giorgio De Luise (Fig. 63).

The research did not however allow the catching of any specimen of *A. torrentium*.

When monitoring ended in the autumn of 2014 a qualified

report allowed the finding, in a place in the Tarvisio area, of two exuviae which the genetic analyses performed by the UNITS confirmed as belonging to this species (Fig. 64).

All the crayfish belonging to the invasive allochthonous species *Procambarus clarkii*, once caught, were removed from the waterway and appropriately exterminated and disposed of as special waste. One of the main objectives of the RARITY project is in fact the reduction in the populations of invasive crayfish present in the waterways of Friuli Venezia Giulia.

For extermination of the crayfish account was taken of the fact that these are ectothermic animals or, as referred to more commonly, "cold-blooded", i.e. they have a body temperature which varies with the environmental one without the ability to regulate heat physiologically, a feature of homeotherms which instead maintain a constant body temperature. In fact, as the winter cold arrives, the crayfish gradually reduce their metabolic functions until they fall into a state of hibernation from which they come out next spring with the increase in temperature. For this reason crayfish can be killed ethically if exposed to gradually colder temperatures and then transferred and kept in a freezer for at least 48 hours. This procedure was observed for the activities of the RARITY project.

Monitoring of habitats

For correct programming of the work of management of the wild populations of decapods of Friuli Venezia Giulia it was considered necessary to analyse the main environmental and anthropic pressures on the populations. For this reason, in the RARITY project the suitability of the habitats was assessed through the measuring of physical and chemical, anthropic and biological parameters.

For this particular aspect the data collected by ARPA in the sampling stations, where available, were used on occasions. With a view to continuing the good practices developed with RARITY also beyond closure of the project, it was necessary and appropriate to create a network of relationships with local institutions and organisations.

For some stations of interest where environmental data for the study of the crayfish population were not available, they were collected with a small group of ETP operatives, appropriately trained in the protocols to be followed (Fig. 65 e 66).

Physical and chemical parameters

For each sampling station the aim was to record pH, conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$), water temperature ($^{\circ}\text{C}$) and dissolved oxygen (mg/l), using a digital instrument fitted with probes. The carbonate hardness present in the water was instead measured using the colorimetric method. Moreover, in a limited number of stations, the current velocity was measured with a rheometer and the depth of the water by means of a

graduated rod in a representative number of points in the sampling site and, approximately, the extent of the riverbed with water.

Human factors

In the sampling stations possible hydromorphological alterations, use of the land, main economic activities, population density, number and distance of towns, the presence of possible aquaculture plants and the intensity of fishing were recorded. The data were extrapolated, as far as possible, from the regional map and integrated via annual in-field surveys and information collected from the competent offices.

Extended biotic index (EBI)

In order to describe concisely the quality of the habitats use was made of the EBI (extended biotic index) which, compared to classic chemical analyses which detect with accuracy only the type and the quantity of pollutant, notes the overall effects of all the environmental stress factors, underway or previous, which have contributed to altering the former community of macroinvertebrates. In particular this index, as well as supplying a synthetic description of the quality of the stations, allows a sample to be collected of the community of macroinvertebrates through which it will be possible to compare the stations with advanced statistical techniques for the analysis of ecological data.

In order to gauge the suitability of the waterways for the crayfish fauna via the macroinvertebrates research protocols were used of the Trent Biotic Index (Woodwiss, 1964), reworked as "Extended Biotic Index" (EBI) and adapted for a standardised application to Italian waterways (Ghetti, 1997) and for the project needs.

The object of the project was in fact that of collecting information useful for describing the environmental suitability of the stations for the species studied in order to be able to plan subsequently their proper management in the area. To date the index, although it has never been accepted for assessing the quality of the waters and has been replaced by more complex indices (DM no. 260/2010), remains an excellent method (due to the practicality of collection, type and comparability of the data) for assessing the suitability of the habitat for the crayfish fauna.

Some data were integrated with those collected by ARPA.

Fluvial Functionality Index (FFI)

The FFI index allows assessment of the overall state of the river environment and its functionality, understood to be the result of the synergy and of the integration of biotic and

abiotic factors present in the aquatic ecosystem and in the terrestrial one connected to it.

The fluvial functionality index is determined on the basis of a manual produced by the agency for environmental protection and technical services (APAT), "IFF Manual 2007". It provides a specific and timely response to the dictates of the European directive 2000/60/EC, which highlight the importance of assessing, as regards the waterways, "the hydromorphological elements supporting the biological elements". The fluvial functionality index can be applied in any running water environment, both mountain and lowland. It cannot instead be applied in estuary environments, sensitive to the action of tides and the rise of the saline wedge and in still water environments (lakes, lagoons, ponds, relict water, etc.). As part of the project reference was made to the FFI determined by ARPA for the sites monitored as part of the regional waters protection plan.

Prevention of the spread of crayfish plague

Appropriate protocols for the disinfection of all the field material were used in order to prevent the transmission of the crayfish plague to the populations of the indigenous species *A. pallipes* complex. This disease is transmitted through the spores of *Aphanomyces astaci* which can be spread in waterways mainly in two ways: through the diffusion of invasive North American crayfish, such as *P. clarkii*, which can have asymptomatic plague infections, or using contaminated instruments not appropriately disinfected in sites where the plague is not present.

In order to limit the risk of accidental spread of the disease the equipment necessary for sampling was appropriately disinfected following the indications given here:

- 1) carefully brush the mud off the equipment and in particular from the soles of heavy shoes and boots, rinsing the field material in the waterway in order to eliminate any residues of it;
- 2) sprinkle the boots, fish traps, nets and optionally the wheels of vehicles and anything else that has come into contact with water or mud of the site with a solution of iodophors, at a concentration of 500 ppm (commercial product *Zoodyn*, 28.6 ml/litre of water), to be left to take effect for at least 10 minutes;
- 3) rinse with tap water at the end of the work and leave the fish traps to dry in the sun for at least 48 hours.

It was decided to use a solution of iodophors, among those usable, in that it does not ruin the rubber of the boots and can easily be used with normal sprays (spray pumps) (Fig. 67). Disinfection involved all the materials used: fish traps, buckets, boots, nets, motor vehicles and boats.

As part of promotion schemes ample information was given on the importance of this behaviour, hopefully to be adopted also by fishermen or operatives who work on various

bases in the water (for the maintenance of the canals, scientific sampling, etc.).

Data organization

All the data relating to the sampling stations and the features of the populations were entered into an Access database. This database, devised and implemented by staff at the University of Florence, was structured (Fig. 68) in order to organise the information collected during the monitoring work (according to what is provided in the Monitoring Protocols), allowing its easy management by ETP staff also after closure of the RARITY project.

The main information contained in the RARITY database was georeferenced and imported into a cartographic project so as to be displayed, processed and represented graphically using GIS software.

Monitoring results

The monitoring, conducted with standardized method during the three-years of the RARITY project, allowed us to describe in a detailed way the distribution and the abundance of both the target species in the Friuli Venezia Giulia region (Fig. 69): the indigenous crayfish, *Austropotamobius pallipes* (more correctly *A. italicus*) and the invasive one, *Procambarus clarkii*.

As regards the indigenous species, we found a distribution least wide than expected, in accordance to the general contraction of this species in these last years in the rest of Europe. This species mainly occupies the piedmont area, in particular, in the collegium 6- Spilimbergo there are the more abundant and well-structured populations. In this area, as we found with the application of the standardized monitoring protocols, the populations are keeping nearly constant both in the distribution and in the abundance during the three-years activities. In some stations, ecologically suitable for this crayfish, juveniles are released to contrast the general decrease of this species in its natural range of distribution. The invasive crayfish is present, on the contrary, in the South of FVG in streams that flow below the resurgences' area, but it occupies an increasing number of stations with abundant populations. According to the monitoring results, the contrast activities are so concentrated in these areas, allowing to contain its spread. In addition, the application of the Early Detection Rapid Response protocols allowed to eradicate a small nucleus of this species from piedmont area above the resurgences' line (Cellina Claut station). Both the monitoring in 2013 and that of 2014 confirm the eradication of this species from this station.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

- Aquiloni L, Tricarico E & Gherardi F. 2010. Crayfish in Italy: distribution, threats and management. Invited Review, International Aquatic Research, 2: 1-14.
- Burgiel S, Foote G, Orellana M & Perrault A. 2006. Invasive alien species and trade: integrating prevention measures and international trade rules. Center for International Environmental Law (CIEL) and Defenders of Wildlife.
- Copp G.H., Bianco P.G., Bogutskaya N. et al. 2005. To be, or not to be, a non-native freshwater fish? J. Appl. Ichthyol. 21: 242-262
- Ghetti PF. 1997. Indice Biotico Esteso (I.B.E.). I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque correnti. Manuale di applicazione. Provincia Autonoma di Trento, Trento, 1-222 pp.
- Peay S. 2003. Monitoring the White-clawed Crayfish *Austropotamobius pallipes*. Conserving Natura 2000 Rivers Monitoring Series No. 1, English Nature, Peterborough.
- Reynolds JD, O'Connor W, O'Keefe C & Lynn D. 2010. A technical manual for monitoring white-clawed crayfish *Austropotamobius pallipes* in Irish lakes. Irish Wildlife Manuals, No 45, National Parks and Wildlife Service, Department of the Environment, Heritage and Local Government, Dublin.
- Souty Grosset C, Holdich DM, Noël PY, Reynolds JD & Haffner P. 2006. Atlas of freshwater crayfish. Muséum national d'Histoire naturelle, Paris.
- Woodwiss FS. 1964. The biological system of stream classification used by the Trent River Board. Chemistry and Industry, 14:443-447.



PROTOCOLLI DI RISPOSTA RAPIDA (EDRR- EARLY DETECTION RAPID RESPONSE)

– M. Zanetti, A. Rucli & L. Aquiloni –

¹ Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine
email: massimo.zanetti@regione.fvg.it;

² Itinera C.E.R.T.A. srl, via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

In linea con quanto previsto nell'*European Strategy on Invasive Alien Species* da Genovesi & Shine (2004), uno degli strumenti più efficaci per la lotta alle specie invasive è l'organizzazione di un sistema di rapida individuazione e pronta risposta (anche indicato come *Early Detection and Rapid Response (EDRR)* o Protocollo di risposta rapida), che consenta di intervenire in modo tempestivo su nuove popolazioni che si stanno stabilizzando su un territorio. L'Università di Firenze (UNIFI), in collaborazione con l'Ente tutela pesca (ETP), ha sviluppato nell'ambito del progetto RARITY tale protocollo già nei primi mesi di lavoro in modo da dotare la Regione Friuli Venezia Giulia di un sistema efficace per fronteggiare l'espansione dei gamberi invasivi. Per la messa a punto di tale sistema EDRR non sono stati necessari ulteriori investimenti di denaro pubblico perché sono stati coinvolti enti ed organizzazioni già presenti in regione nei loro specifici ambiti di competenza. Per il corretto funzionamento del protocollo, oltre ad elencare nel modo più dettagliato possibile l'iter da seguire in caso di segnalazione, è stato strategico individuare i referenti degli Enti responsabili per le singole attività previste. Il sistema EDRR ha rappresentato anche un valido sistema per coinvolgere i cittadini che si sono sentiti "attori" del progetto e "custodi" del proprio territorio.

Fig. 70. Esemplare di *Procambarus clarkii*, gambero rosso della Louisiana.

Fig. 70. Specimen *Procambarus clarkii*, Louisiana red swamp crayfish.

LE SPECIE OGGETTO DEL SISTEMA EDRR

Il sistema di rapida individuazione e pronta risposta, in linea con gli obiettivi del progetto RARITY, ha come principale target il gambero invasivo *Procambarus clarkii* (Fig. 70), già presente in Friuli Venezia Giulia e in rapida diffusione ma la cui distribuzione non era ancora del tutto nota.

Esistono però altri potenziali gamberi che potrebbero arrivare nel prossimo futuro dalle regioni vicine: *Pacifastacus leniusculus* dalla provincia di Bolzano e *Orconectes limosus* dal Veneto (Aquiloni et al., 2010). Inoltre, altre specie a rischio di ingresso sono quelle vendute dal mercato *on-line*



o dai negozi di acquariofilia presenti in regione, riconosciuti come possibili vie di ingresso di specie alloctone. Tra queste specie merita particolare attenzione *Procambarus* sp., specie apprezzata dagli acquariofili per la sua colorazione marmorizzata ma potenzialmente invasiva sia per la sua tolleranza ad un ampio spettro di caratteristiche ecologiche sia per la riproduzione per partenogenesi.

LA SEGNALAZIONE

Al ritrovamento anche di un solo esemplare di gambero diverso da quelli locali o anche di semplici tracce di presenza (es. chele o parti di esoscheletro o resti nelle fatte di possibili predatori, tane) è prevista l'immediata segnalazione al responsabile incaricato dall'ETP per la raccolta e la gestione di queste informazioni, che è tenuto ad attivare le opportune procedure di pronta risposta.

RISPOSTA RAPIDA

In seguito a segnalazione della possibile presenza di specie alloctone invasive, il protocollo prevede, entro una settimana, l'attivazione delle seguenti azioni:

- 1) la verifica della segnalazione;
- 2) il monitoraggio della popolazione;
- 3) l'attività di eradicazione/controllo.

La verifica della segnalazione

Al fine di verificare la veridicità e l'attendibilità della segnalazione, il protocollo stabilisce che il personale ETP provveda a raccogliere ogni elemento utile, in particolare al riconoscimento della specie oggetto di segnalazione, per individuare, come si è più volte verificato, le segnalazioni infondate o quelle riferite alla specie autoctona, confusa con quella invasiva. Quando la segnalazione riguarda aree in cui la presenza delle specie non è nota, il protocollo prevede un sopralluogo, se necessario, e il posizionamento di nasse armate con esca trofica ad alta appetibilità. Anche in assenza di catture, la stazione viene comunque considerata come area ad alto rischio di arrivo di gamberi alloctoni e, nel corso del progetto, tali stazioni sono state inserite nel successivo piano annuale di monitoraggio.

Quando il riconoscimento della specie di appartenenza degli esemplari catturati risulta difficoltoso, è previsto di fotografarli e di inviare all'Università di Firenze (UNIFI) per una loro corretta identificazione.

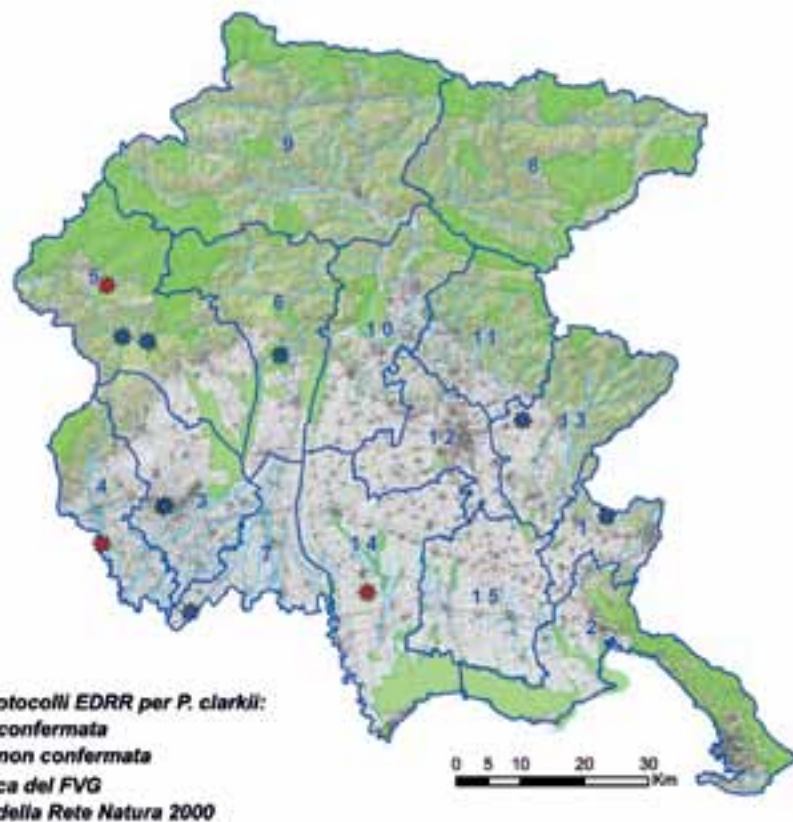


Fig 71. Mappa dei siti in cui si è attivato il protocollo di risposta rapida (EDRR) tra il 2012 e il 2014.

Fig. 71. Map of the sites where the EDRR protocol has been activated between 2012 and 2014.

Il monitoraggio della popolazione segnalata

Nonostante la necessità di procedere rapidamente alle attività di eradicazione/controllo della nuova popolazione, è indispensabile effettuare prima un monitoraggio della stessa per capire la reale dimensione del problema e descrivere la struttura della popolazione. Queste informazioni sono essenziali per comprendere se si tratta di un gruppo di individui non ancora stabilizzati – dove quindi un'eradicazione potrebbe essere ancora possibile – o se, viceversa, si tratta di una popolazione ormai ben strutturata. Inoltre, le informazioni derivanti dal monitoraggio sono necessarie sia per decidere se intraprendere o meno le attività di controllo e le eventuali modalità di intervento sia per effettuare una valutazione dell'efficacia delle azioni intraprese e, se opportuno, per cambiare le metodiche di eradicazione/controllo utilizzate. Nel caso si decida di intervenire, è opportuno che il monitoraggio della stazione venga ripetuto ogni anno in modo da valutare l'efficacia degli interventi di gestione messi in atto. Il monitoraggio relativo alle segnalazioni ha seguito, nell'ambito del progetto, lo stesso protocollo standardizzato previsto per tutte le stazioni di monitoraggio.

L'attività di eradicazione/controllo

Immediatamente dopo il periodo di monitoraggio è prevista una valutazione sull'opportunità o meno di un intervento di controllo o eradicazione. Nel caso tali attività siano ritenute fattibili, il sistema di risposta rapida ha previsto la cattura intensiva degli esemplari utilizzando trappole armate con esche trofiche ad alta appetibilità (=attrattività). Le trappole, nel maggior numero possibile, devono essere controllate ogni giorno cambiando l'esca e registrando il numero di esemplari catturati nell'apposita scheda di rilevamento. Il trappolaggio intensivo deve essere ripetuto fino a che le catture si riducono di almeno il 60% rispetto alle iniziali.

PROTOCOLLI EDRR ATTIVATI NEL CORSO DEL PROGETTO RARITY: UN BILANCIO

Nel corso del progetto RARITY, i protocolli EDRR sono stati attivati 10 volte in seguito alla segnalazione di cittadini, pescatori, personale di vigilanza. Di seguito, in forma schematica, il loro esito (Tab. 2 e Fig. 71).

Tab. 2. Esito dell'attivazione del protocollo EDRR.

Tab. 2. Result of the EDRR protocol.

Località Place	Periodo Period	Esito Result	Note Notes
Campomolle (Udine)	Agosto 2012 August 2012	Positivo Positive	Avviate attività di monitoraggio e catture massive. Actions of monitoring and mass capture launched
Preval (Gorizia)	Agosto 2012 August 2012	Negativo Negative	
Cellina stream, Claut (Pordenone)	Settembre 2012 September 2012	Positivo Positive	Effettuate attività di cattura massiva. Popolazione eradicata. Mass capture launched. Population eradicated.
Lago morto, Barcis (Pordenone)	Ottobre 2012 October 2012	Negativo Negative	
Varma stream, Barcis (Pordenone)	Gennaio 2013 January 2013	Negativo Negative	
Canale Ellero,	Aprile 2013 April 2013	Negativo Negative	
Sequals marsh (Pordenone)	Giugno 2013 June 2013	Negativo Negative	
Rorai ponds, Pordenone (Pordenone)	Novembre 2013 November 2013	Negativo Negative	
Ditches at Pravidomini (Pordenone)	Maggio 2014 May 2014	Negativo Negative	
Smorta del Livenza, Sacile (Pordenone)	Luglio 2014 July 2014	Positivo Positive	Zona di difficile accesso. Area with very difficult access.

EARLY DETECTION RAPID RESPONSE (EDRR)

– M. Zanetti, A. Rucli & L. Aquiloni –

¹ Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine
email: massimo.zanetti@regione.fvg.it;

² Itinera C.E.R.T.A. srl, via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

In line with the provisions of the *European Strategy on Invasive Alien Species* by Genovesi and Shine (2004), one of the most effective tools for the fight against invasive species is the organisation of an early detection and ready response system (EDRR or rapid response protocol), which allows timely intervention on new populations which are settling in a territory. The University of Florence, in collaboration with the ETP, developed this protocol as part of the RARITY project already in the first months of work so as to equip the Friuli Venezia Giulia region with an effective system for tackling the expansion of the invasive crayfish. Further investments of public money were not necessary for the development of this EDRR system as bodies and organisations already present in the region in their specific areas of competency were involved. For the proper functioning of the protocol, as well as listing in the greatest possible detail the procedure to be followed in the case of a report, it was strategic to identify the contacts at the organisations responsible for the single activities planned. The EDRR system was also an effective way of involving the public who felt like “players” in the project and “custodians” of their own area.

SPECIES COVERED BY THE EDRR SYSTEM

The main target of the early detection and rapid response system, in line with the objectives of the RARITY project, is the invasive crayfish *Procambarus clarkii* (Fig. 70), already present in Friuli Venezia Giulia and rapidly spreading yet whose distribution was not yet totally known. There are however other potential crayfish which could arrive in the near future from neighbouring regions: *Pacifastacus leniusculus* from the province of Bolzano and *Orconectes limosus* from Veneto (Aquiloni et al., 2010). Moreover other species at risk of entry are those sold on the online market or by the aquarium shops in the region, recognised as possible entrance routes for allochthonous species. Among these species *Procambarus* sp. deserves special attention, a species popular with aquarium enthusiasts due to its marbled colouring yet potentially invasive due to its tolerance to a wide spectrum of ecological features and reproduction by parthenogenesis.

REPORTING

On the finding of even only one specimen of crayfish different from the local ones or also simple traces of presence (e.g. pincers or parts of exoskeleton or remains in the droppings of possible predators, lairs) immediate reporting is foreseen to the person placed in charge by the ETP of the collection and the management of this information, who is bound to put into action the appropriate rapid response procedures.

RAPID RESPONSE

Following the report of the possible presence of invasive allochthonous species the protocol foresees, within one week, deployment of the following actions:

- 1) check on report;
- 2) monitoring of the population;
- 3) eradication/control.

Checking reports

In order to ascertain the accuracy and reliability of the report the protocol lays down that the ETP staff have to collect every element useful, in particular, for recognition of the species which is the subject of the report. This is in order to identify, as has occurred on several occasions, groundless reports or those relating to autochthonous species, confused with the invasive one. When the report relates to areas where the presence of the species is not known, the protocol provides for an inspection, if necessary, and the positioning of fish traps armed with a trophy bait with high appetising appeal. Even with no catches, the station is in any case considered as an area of high risk of arrival of allochthonous crayfish and, during the project, these stations were inserted in the subsequent annual monitoring plan. When the recognition of the relevant species of the specimens captured is found to be difficult, it is foreseen for them to be photographed and the photos sent to the University of Florence for proper identification.

Monitoring of the population reported

Despite the need to proceed rapidly with the work of eradication/control of the new population, it is essential to carry out first a monitoring of the same in order to understand the real dimension of the problem and describe the structure of the population. This information is essential for understanding whether it is a group of individuals not yet settled, where therefore eradication could still be possible, or whether vice versa this is a population which is now well structured. Moreover the information gained from monitoring is necessary both in order to decide whether to carry out or not control work and the possible methods of intervention and to assess the efficacy of the actions taken and, if appropriate, in order to change the methods of eradication/control used. In the event where it is decided to intervene, monitoring of the station should be repeated every year so as to evaluate the efficacy of the management actions implemented. Monitoring relating to reports has followed, within the project, the same standardised protocol foreseen for all the monitoring stations.

Eradication/control

Immediately after the monitoring period assessment is scheduled of the appropriate nature or otherwise of a control or eradication action. In the case where these activities are considered feasible, the rapid response system has provided for intensive capture of the specimens using traps armed with trophy baits with high appetising appeal (= attractiveness). The traps, in the largest number possible, have to be checked each day, changing the bait and recording the number of specimens caught on the special detection chart. Intensive trapping has to be repeated until the catches are reduced by at least 60% with respect to the initial ones.

EDRR IN RARITY: A BALANCE

During the RARITY project the EDRR protocols were activated 10 times following a report from the public, fishermen and surveillance staff. The following are, schematically, their results (Tab. 2 and Fig. 71).

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

- Genovesi P. & Shine C. 2004. European strategy on invasive alien species. Nature and Environment, n.137, Strasbourg.
- Aquiloni L., Tricarico E. & G. Gherardi F. 2010. Crayfish in Italy: distribution, threats and management. Invited Review. International Aquatic Research, 2: 1-14.



INDIVIDUAZIONE DELLE AREE A RISCHIO DI PROSSIMA STABILIZZAZIONE DI POPOLAZIONI DI *PROCAMBARUS CLARKII*

– M. Zanetti¹, F. Giovannelli² & L. Aquiloni² –

¹ Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine
email: massimo.zanetti@regione.fvg.it;

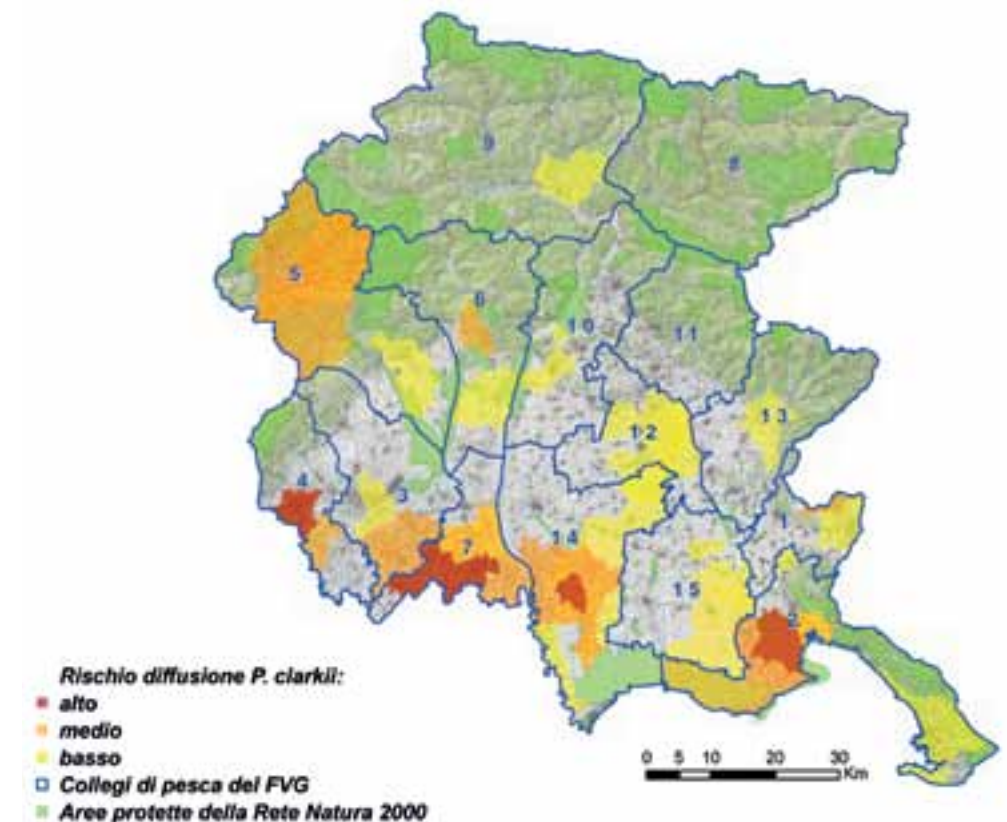
² Itinera C.E.R.T.A. srl, via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

Sulla base dei dati raccolti nel corso delle indagini preliminari sul territorio, sono state individuate le aree a rischio di prossima stabilizzazione di popolazioni del gambero invasivo, segnalando anche i siti in cui la specie potrebbe causare grossi impatti alle attività produttive quali la coltivazione del riso e la produzione di piante acquatiche. Per l'individuazione di tali aree si sono considerate non solo l'attuale distribuzione della specie nel territorio ma anche la presenza di *pet shop* in cui la specie viene venduta o di sagre che potrebbero costituire un canale di ingresso di gamberi invasivi in zone del FVG non ancora colonizzate e, in parti-

colare, in aree peri-urbane. Il rischio è stato poi rappresentato in una cartografia tematica su scala comunale con tre livelli: alto rischio di popolazioni stabilizzate della specie in presenza di alcuni esemplari catturati; medio rischio per aree a meno di un chilometro di distanza dai siti di cattura o per i centri abitati in cui la specie viene venduta; basso rischio per aree in cui la specie era segnalata o presente in passato ma la cui presenza non è stata confermata oppure è stata rimossa attraverso l'applicazione dei protocolli di risposta rapida attivati in modo tempestivo in seguito alla segnalazione (Fig. 72).

Fig. 72. Mappa del rischio di prossima stabilizzazione di *P. clarkii*.

Fig. 72. Map of the areas at risk of stabilisation of *P. clarkii* populations in the near future.



AREAS AT RISK OF INVASION OF THE POPULATIONS OF PROCAMBARUS CLARKII IN THE NEAR FUTURE

– M. Zanetti¹, F. Giovannelli² & L. Aquiloni² –

¹ Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia
via Colugna, 3 • I - 33100 Udine
email: massimo.zanetti@regione.fvg.it;

² Itinera C.E.R.T.A. srl, via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

On the basis of the data collected during the preliminary investigations in the area, the areas at risk of stabilisation of invasive crayfish populations in the near future were identified, also indicating the sites where the species could cause high impact on production activities such as the cultivation of rice and the production of aquatic plants. In order to identify these areas we considered not only the current distribution of the species in the area but also the presence of pet shops where the species is sold or fairs which could form an entry route for invasive crayfish in areas of Friuli Vene-

zia Giulia not yet colonised and, in particular, in peri-urban areas. The risk was then represented in a theme map on a communal scale with three levels: high risk of settled populations of the species in the presence of some specimens caught; average risk for areas less than a kilometre from the capture sites or for towns where the species is sold; low risk for areas where the species was reported or present in the past yet whose presence has not been confirmed or has been removed through the application of the rapid response protocols activated promptly following the report (Fig. 72).

GLI IMPATTI PRODOTTI DAL GAMBERO INVASIVO E LE PRINCIPALI VIE DI INGRESSO DELLA SPECIE IN FRIULI VENEZIA GIULIA

– L. Aquiloni¹, F. Giovannelli¹, G. Mazza², A. F. Inghilesi² & F. Scapini² –

¹ Itinera C.E.R.T.A. srl
via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

² Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, Firenze

GLI IMPATTI

A partire dagli anni '80, la letteratura internazionale relativa ai gamberi alloctoni (*Non-Indigenous Crayfish Species*, NICS) è particolarmente ricca di esempi circa l'impatto da essi provocato su ecosistemi, specie indigene, attività produttive e salute umana (e.g. Gherardi & Holdich 1999; Lodge et al., 2000). In particolare, il gambero rosso della Louisiana (*Procambarus clarkii*) è una delle specie maggiormente studiate nel mondo e quella che offre quindi il maggior numero di esempi di possibili impatti (Gherardi et al., 2010). Nell'ambito del progetto RARITY abbiamo ritenuto utile censire, già in fase preliminare di attività, tutte le segnalazioni dei possibili impatti da *P. clarkii* sui sistemi idrici del Friuli Venezia Giulia (FVG). Le segnalazioni erano state denunciate all'ETP negli anni dai cittadini che frequentano i corpi idrici regionali e, oltre a queste, abbiamo raccolto anche i danni rilevati dai partner di progetto e dai quattro Consorzi di Bonifica regionali (Bassa Friulana, Cellina Meduna, Ledra Tagliamento e Pianura Isontina) durante le loro attività sul territorio. Sono stati vagliati alcuni siti e blog amatoriali a cui contribuiscono naturalisti, biologi e appassionati di acquariofilia per intercettare segnalazioni "informali" di impatti sul territorio e sono stati predisposti appositi questionari per pescatori ed esercenti di *pet shop*/negozi di acquariofilia per valutare il livello generale di conoscenza su questa specie e gli impatti da essa prodotti.

In FVG, come nel resto d'Europa, uno dei principali impatti è costituito dalla trasmissione della peste alle specie indigene di gambero. L'agente eziologico di questa terribile malattia è *Aphanomyces astaci*, un Oomicete della famiglia Saprolegnaceae di cui *P. clarkii* è portatore sano e asintomatico. Già nei primi mesi di progetto, la peste aveva colpito popolazioni indigene lontane dalle aree di presenza del gambero invasivo, sul torrente Meduna e sul torrente Cosizza, accidentalmente contaminate con acqua o strumenti per la pesca utilizzati in zone di presenza del gambero invasivo. Anche alcuni impianti per la produzione di novellame della specie indigena *Austropotamobius pallipes* destinato al ripopolamento sono stati colpiti da peste: il centro ittiogenico di Flambro (UD) non più utilizzato per

la produzione del gambero, e il centro di Amaro, ancora in attività ma dove sono stati persi riproduttori selezionati e parte del novellame.

La diffusione del *P. clarkii* in FVG è ancora sufficientemente limitata da non aver determinato impatti rilevanti a livello di comunità. Su un campione di 498 pescatori, solo l'8% riconosce *P. clarkii* come responsabile di una diminuita pescosità nelle aree in cui è presente, a fronte di un 21% che non apprezza alcuna variazione di pescosità (Fig. 73).

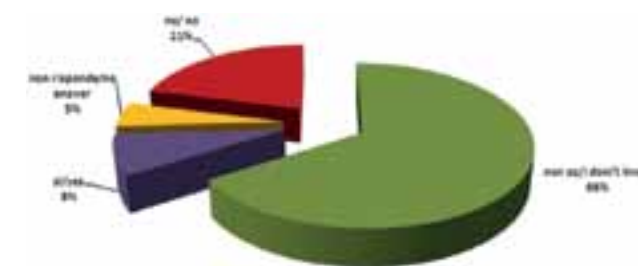


Fig. 73. Diagramma a torta relativo alle risposte dei pescatori alla domanda: "Ha mai riscontrato una diminuzione del pescato nelle acque in cui il gambero rosso della Louisiana è presente?" Possibilità di risposta: sì; no; non so (n=498).

Fig. 73. Pie chart showing fishermen's replies to the question: "Have you ever noticed a reduced catch in waters where the red Louisiana crayfish is present? Possible replies: yes; no; don't know (n =498).

Analogamente, non sono stati rilevati impatti sugli ecosistemi e la salute umana legati al gambero invasivo, mentre le attività produttive del FVG già risentono della sua presenza. In particolare, si rilevano indebolimenti e cedimenti di capezzagne ed argini di canali per l'irrigazione a causa della sua attività di scavo e conseguente infiltrazione di acqua. Il Consorzio di Bonifica della Bassa Friulana, nel cui territorio di competenza ricadono molte segnalazioni di *P. clarkii*, si è già interfacciato con la Protezione Civile proprio per il danno alle arginature nella pianura verso Grado. Anche nella zona di Alberoni, gli agricoltori segnalano il cedimento di capezzagne proprio legato all'attività di scavo del gambero (Fig. 74). Purtroppo non è stato possibile una stima dei costi sostenuti per il ripristino di questo tipo di dan-



Fig. 74. Crollo di capezzagne dovuto all'attività di scavo del gambero invasivo *Procambarus clarkii* nella Bassa Friulana (zona Alberoni).
Fig. 74. Collapsed headland caused by the digging activities of invasive crayfish *Procambarus clarkii* in the Bassa Friulana (Alberoni area).

no perché non è disponibile un registro degli interventi effettuati dalle autorità competenti. La produzione del riso in Regione così come le attività per la produzione e la vendita di piante acquatiche e pesci ad uso ornamentale potrebbero essere colpite in un prossimo futuro in seguito ad una ulteriore espansione della specie, già presente in aree a loro limitrofe. La coltivazione del riso a Pocenja (UD) si trova infatti a meno di 8 Km da Campomolle in cui il gambero è già presente con abbondanti popolazioni. Analogamente, a Perteole (UD) è situata una delle aziende che produce e vende pesci e piante acquatiche che dista pochi chilometri dalle popolazioni nelle stazioni Brancolo (10 km) e Alberoni (<15 km).

VIE DI INGRESSO E CAUSE DI INTRODUZIONE

Un'attenta valutazione delle dinamiche d'introduzione di *Procambarus clarkii* (così come di altri gamberi alloctoni) in riferimento alle peculiarità economico-culturali del Friuli Venezia Giulia costituisce un valido strumento di indirizzo per prevenire e contrastare la diffusione di tali specie sul territorio regionale attraverso azioni mirate di monitoraggio, controllo e, se necessario, di adeguamento normativo. Non ultimo, un quadro esaustivo delle possibili vie di ingresso di questa specie consente di indirizzare le attività di informazione e disseminazione verso *target* strategici dell'opinione pubblica. In biologia delle invasioni, per "via di ingresso" (*pathway*) si intende il processo (attenzione, non il mezzo!) che determina l'introduzione di una specie alloctona in un luogo al di fuori del suo areale naturale di distribuzione (Hulme et al., 2008). La ragione economica, sociale o tecnica che determina o promuove tale introduzione vie-

ne invece indicata come "causa di introduzione" (ing. *driver of use*) (Occhipinti-Ambrogi et al., 2008). Le cause di introduzione sono spesso così strettamente legate alle vie di ingresso che questi termini possono essere utilizzati come sinonimi ma, in generale, c'è molta ambiguità sul loro significato anche nella letteratura scientifica. Per esigenze pratiche, anche per la necessità di elaborare un testo chiaro, facilmente leggibile e privo di ambiguità, si parlerà d'ora in avanti esclusivamente di "vie di ingresso". Molti importanti autori a livello internazionale, quali Hulme et al (2008) e Pyšek et al. (2009), hanno lavorato per individuare e definire le possibili vie di ingresso di specie alloctone. Nel caso specifico del gambero in FVG abbiamo utilizzato le vie di ingresso per le specie acquatiche disponibili in DAISIE (www.europe-aliens.org; Gherardi et al., 2009), indicando con una crocetta quali tra queste, hanno maggiormente contribuito alla presenza della specie in regione (Tab. 3). In FVG, l'introduzione di *P. clarkii* sembra essere essenzialmente un processo di tipo intenzionale che potrebbe essere legato a interessi commerciali che risentono inevitabilmente di un *background* culturale che vede il gambero di fiume (senza distinzione tra autoctono e alloctono) ben radicato nella cultura popolare friulana. Le sagre e le feste popolari incentrate sul consumo di gamberi d'acqua dolce sono molto diffuse in questa regione, come segnalato dai pescatori attraverso i questionari che sono stati loro somministrati (Tab. 4). I gamberi utilizzati per queste sagre sono importati dall'estero. Il gambero turco *Astacus leptodactylus* è la specie più utilizzata e non sono noti casi in cui sia stato acquistato *Procambarus clarkii*. Tuttavia, dato che questi eventi costituiscono sicuramente un possibile canale per l'ingresso di NICS in FVG, nel 2013 il progetto RARITY ha promosso un

Vie di ingresso Arrival pathways	Descrizione Description	In FVG
Acquacoltura (Aquaculture)	La specie è introdotta in impianto per scopi commerciali Species introduced in aquaculture facilities for commercial purposes	
Canali (Canals)	La specie arriva attraverso canali Species arrived through canals	X
Pesca (Angling)	Specie introdotta per pesca sportiva o professionale, questa categoria include le specie utilizzate come cibo per pesci o esche Species introduced for professional or sport fishing, in this category are also included species used as fish food or fish bait	X
Imbarcazioni (Vessels)	La specie è introdotta da imbarcazioni, da acque di zavorra o vasche di sedimentazione Species introduced by boats, ballast water, or sedimentation tanks	
Svago (Leisure)	La specie è introdotta per attività di svago Species introduced for leisure activities	
Fughe (Escapes)	Gli individui fuggono dalla cattività, da laboratori e da allevamenti Escapes of some specimens from captivity, laboratory, or aquaculture facilities	X
Ornamentale (Ornamental)	Specie importata per acquariofilia o in associazione ad altro materiale vivo usato per scopi ornamentali Species imported for aquariophily or together with other materials for ornamental purposes	X
Controllo biologico (Biocontrol)	La specie è rilasciata in natura come agente di controllo biologico per altre specie Species released in the wild as control agents of other species	
Aumento biodiversità (Fauna improvements)	Specie introdotta per riempire una nicchia ecologica rimasta vuota o per arricchire la biodiversità locale Species introduced to fill an ecological empty niche or to increase the local biodiversity	

Tab. 3. Elenco delle vie di ingresso per le specie acquatiche (DAISIE, www.europe-aliens.org) e vie di ingresso del *Procambarus clarkii* in Friuli Venezia Giulia.

Tab. 3. List of entry pathways for aquatic species (DAISIE, www.europe-aliens.org) and the entry pathways for *Procambarus clarkii* in Friuli Venezia Giulia.

protocollo di intesa, sottoscritto da ETP insieme ai Comuni interessati, alle pro-loco e alle associazioni del territorio, in cui gli Enti preposti alla organizzazione di tali eventi si impegnano a non importare animali vivi e a promuovere attività che possano favorire la protezione dei gamberi indigeni e l'informazione dei cittadini su questi temi. Non sono noti allevamenti di gamberi alloctoni sul territorio regionale. L'allevamento più vicino al FVG di gamberi alloctoni (*Cherax destructor*) è situato in Veneto, in provincia di Treviso (G. De Luise, comunicazione personale). Sono segnalati da alcuni pescatori ed enti legati a pesca e regimentazione idrica piccoli nuclei del gambero *P. clarkii* in stagni privati che costituiscono piccoli allevamenti ad uso familiare o, comunque, locale.

Il commercio a scopo ornamentale in FVG, come nel resto d'Europa (Chucholl 2012), è sicuramente un'altra via d'ingresso importante per questa specie. Una percentuale degli esemplari acquistati, infatti, viene rilasciata in natura dove può stabilizzarsi e diventare invasiva. Numerose sono le specie di gamberi (e più in generale di decapodi) esotici che si possono reperire nei *pet shop* del FVG a prezzi accessibili (Tab. 5). Si noti che tra le specie vendute è presente sia *P. clarkii* sia *Cherax* sp., altro gambero la cui invasività è ormai comprovata, ed altre come *Cambarellus* sp. potenzialmente invasive. Infine, come riportato anche in Chucholl (2012), e come abbiamo potuto verificare direttamente negli esercizi commerciali della regione FVG, numerose sono le inesattezze

Sagre e Feste popolari segnalate dai pescatori Folk Fests reported by fishermann	Numero di segnalazioni Number of reports
Sagra del gambero, Amaro (UD)	31
Sagra dei gamberi e del forno rurale, Remanzacco (UD)	21
Sagra dei gamberi, Orcenico Superiore (PN)	18
Sagre d'Avost e dai gjambars di flum, Castions delle Mura (UD)	10
Ferragosto in giardino (Festa dei gamberi di fiume), Caporiacco (UD)	8
Sagra del gambero, Saletto, Morsano al Tagliamento (PN)	5
Sagra del gambero, Redona, Tramonti di sopra (PN)	3
Sagra dei gamberi, Savorgnano, San Vito al Tagliamento (PN)	1
Vivaro (PN)	2
Joannis, Aiello del Friuli (UD)	1
Ovaro (UD)	1
Nimis (UD)	1
Ovoledo, Zoppola (PN)	1
Tamai (PN)	1
Travesio (PN)	1

Tab. 4. Elenco delle sagre, feste popolari e località segnalate dai pescatori nei questionari a loro sottoposti nell'ambito del progetto RARITY. A fianco il numero di segnalazioni ricevute per ciascuna sagra. Domanda aperta a cui ha risposto il 21% del campione (questionari n=498).

Tab. 4. List of festivals, popular events and places indicated by fishermen in the questionnaire distributed as part of the project RARITY with the number of markings for each event. Open question answered by 21% of the sample (no. of questionnaires distributed = 498).

Gruppo Group	Famiglia Family	Genere (specie) Genus (species)
Granchi / Crabs	Gecarcinidae	<i>Cardisoma (armatum)</i>
	Sesarmidae	<i>Geosesarma (sp.)</i>
	Sesarmidae	<i>Perisesarma (bidens)</i>
Paguri / Hermit crabs	Coenobitidae	<i>Coenobita (sp.)</i>
Gamberi / Crayfish	Atyidae	<i>Atyopsis (gabonensis, molluccensis)</i>
	Atyidae	<i>Caridina (sp., breviata, babaulti, denticulata, gracilirostris, multidentata, cfr. propinqua, serrata)</i>
	Atyidae	<i>Neocaridina (sp., heteropoda)</i>
	Cambaridae	Cambarellus (puer, patzcuarensis, montezumae)
	Cambaridae	Pracambarus (clarkii, vioscai)
	Desmocaridae	<i>Desmocarid (trispinosus)</i>
	Euryrhynchidae	<i>Euryrhynchus (amazoniensis)</i>
	Hippolytidae	<i>Lysmata (sp.)</i>
	Palemonidae	<i>Macrobrachium (sp., kiukianensis, scabriculum, peguensis)</i>
	Parastacidae	Cherax (sp.)

Tab. 5. Elenco dei crostacei decapodi venduti nei pet shop. In grassetto le specie invasive accertate o potenziali.

Tab. 5. List of decapods sold in pet shops, with potentially or ascertained invasive species marked in bold.



Fig. 75. Esemplare di *Procamburus clarkii* venduto, con il nome di *Cambarus affinis*, nei negozi di una nota catena del settore presente anche in Friuli Venezia Giulia.

Fig. 75. Specimen of *Procamburus clarkii* sold, under the name of *Cambarus affinis*, in the stores of a well-known chain in the sector present also in Friuli Venezia Giulia.

tassonomiche sugli esemplari in vendita a livello specifico o, addirittura, di genere. Nei negozi di una nota catena del settore, esemplari di *P. clarkii* erano venduti come *Cambarus affinis* (Fig. 75) un sinonimo di *Orconectes limosus* per meno di 10 euro. La scarsa conoscenza di alcuni esercenti sulle specie vendute e sulle loro caratteristiche biologiche si traduce anche in una scarsa informazione degli acquirenti che possono portare a casa una specie potenzialmente pericolosa per l'ambiente (ma anche per le altre specie in acquario). Nelle interviste effettuate in 14 negozi, gli esercenti affermano di sconsigliare l'acquisto di *P. clarkii* alla loro clientela data la sua aggressività e voracità. Tuttavia, dato che la specie è comunque richiesta e facilmente venduta se esposta in negozio, gli esercenti ritengono utile un'iniziativa che ne consenta il recupero (67%) in seguito alle richieste di restituzione (50% dei casi) e una corretta campagna informativa (91%). Interessante rilevare che gli esercenti, in apparente contraddizione rispetto ai loro interessi, sono favorevoli ad una normativa che ne regolamenti il commercio o ne proibisca del tutto la vendita.

L'analisi del mercato *on line* a livello nazionale, svolta sempre nell'ambito del progetto RARITY, descrive uno scenario ancora più preoccupante in quanto molte specie appartenenti a vari taxa e la cui invasività è ormai nota possono essere acquistati da casa per pochi euro con un semplice click (Tab. 6).

Famiglia Family	Genere Genus	Specie Species	Sottospecie Sub-species	Area di origine Native area	Prezzo medio (€) Medium price (€)	Prezzo massimo (€) Maximum price (€)	Prezzo minimo (€) Minimum price (€)
Plagusiidae	<i>Percnon</i>	<i>gibbesi</i>		Pacifico, Atlantico / Pacific, Atlantic	14	14	14
Emydidae	<i>Trachemys</i>	<i>scripta</i>	<i>elegans</i>	Nord America / North America	16	25	8
Poeciliidae	<i>Gambusia</i>	<i>holbrooki</i>		Nord America / North America	2,9	2,9	2,9
Cambaridae	<i>Procamburus</i>	<i>clarkii</i>		Nord America / North America	10,1	12	6,4
Pipidae	<i>Xenopus</i>	<i>laevis</i>		Africa / Afrika	6,03	7,3	4
Emydidae	<i>Trachemys</i>	<i>scripta</i>	<i>scripta</i>	Nord America / North America	19,3	43,5	9
Cyprinidae	<i>Cyprinus</i>	<i>carpio</i>		Europa, Asia / Europe, Asia	9,8	38,7	2
Cyprinidae	<i>Carassius</i>	<i>auratus</i>		Asia / Asia	9,2	45	0,6

Tab. 6. Specie invasive vendute nei negozi *on line* in Italia. Analisi completa nel Report "La vendita online di animali da acquariofilia: una via di introduzione di specie alloctone" disponibile sul sito del progetto.

Tab. 6. Invasive species sold online in Italy. Full analysis in the Report "The online sale of aquarium animals: a way of introducing non-indigenous species" available on the project website.

L'utilizzo da parte dei pescatori di *P. clarkii* come esca viva per la cattura di alcune specie ittiche è stata una delle spiegazioni addotte alla luce della distribuzione relativa ai primi ritrovamenti del gambero rosso della Louisiana in FVG (De Luise 2010). Non vi sono molti dati in letteratura in proposito né conferme di un tale utilizzo da parte dei pescatori, tuttavia è diffusa l'opinione che il gambero costituisca un'ottima esca per alcuni pesci. La contaminazione di stock di pe-

sci da reintrodurre può avere un ruolo importante nella diffusione di gamberi alloctoni, in quanto essi potrebbero essere presenti in stadi non facilmente visibili. La dispersione naturale da regioni limitrofe potrebbe costituire una via di ingresso probabile su piccola scala nelle zone di confine con il Veneto dove la specie è diffusa (non risulta essere segnalato in Trentino Alto-Adige, Austria e Slovenia; www.europe-aliens.org).

IMPACT

– L. Aquiloni¹, F. Giovannelli¹, G. Mazza², A. F. Inghilesi² & F. Scapini² –

¹ Itinera C.E.R.T.A. srl
via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

² Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze, Firenze

Since the 1980s international literature on Non-Indigenous Crayfish Species, NICS has been particularly rich in examples of their impact on ecosystems, indigenous species, production activities and human health (e.g. Gherardi & Holdich 1999; Lodge et al., 2000). This is particularly true of the red Louisiana crayfish (*Procambarus clarkii*) one of the species that is studied most throughout the world and which therefore offers the most examples of possible effects of their presence (Gherardi et al., 2010). Right from the initial stages of research in the project RARITY we considered it useful to survey all reported possible impacts of *P. clarkii* on water systems in Friuli Venezia Giulia (FVG). Over the years, findings have been reported to the ETP by people who frequent the regional watercourses and, in addition, we have also gathered information on damage reported by our project partners and by the four regional land reclamation and water management consortia (Bassa Friulana, Cellina Meduna, Ledra Tagliamento and Pianura Isontina) during their activities in the area. Some amateur websites and blogs that receive contributions from naturalists, biologists and aquarium enthusiasts were also examined to intercept “informal” reports of impact on the territorial environment, and dedicated questionnaires for fishermen and pet/aquarium shop managers were drawn up to evaluate the general level of awareness of this species and its impact.

As in the rest of Europe, one of its main impacts in FVG is the transmission of crayfish plague to indigenous crayfish species. The cause of this terrible disease is *Aphanomyces astaci*, an Oomycete in the Saprolegniaceae family of which *P. clarkii* is an immune, asymptomatic carrier. Already in the initial period of the project, crayfish plague had affected indigenous populations far away from the areas where the invasive crayfish was present, on the Meduna torrent and the Cosizza torrent, which had been accidentally contaminated by water or fishing equipment used in areas where the invasive crayfish was present. Some fry production plants for the repopulation of the indigenous species *Austropotamobius pallipes* have been hit by the plague: the fish farm in Flambro (UD) is no longer used for the production of crayfish, and the fish farm in Amaro is still active but has lost selected breeding specimens and much of its fry.

The diffusion of *P. clarkii* in FVG is still limited enough not to have determined heavy repercussions at community level. Out of a sample of 498 fishermen, only 8% recognise *P. clarkii* as responsible for a reduction in the fish population in the areas where it is present, compared to 21% who are not aware of any variation in fish quantities (Fig. 73). Analogously, no impact on ecosystems and human health associated with the invasive crayfish was reported, while production activities in FVG are already affected by its presence. In particular, weakening and subsidence of headlands and the banks of irrigation channels have been noticed, caused by crayfish digging and consequent infiltration of water. In the Bassa Friulana, where there have been many reports of *P. Clarkii* presence, the Land Reclamation Consortium has already contacted the Civil Protection Department about damage to river banks on the plain near Grado. In the Alberoni area too, farmers have reported subsiding headlands due to crayfish digging (Fig. 74). Unfortunately it has not been possible to estimate repair costs for such damage because there is no available record of operations carried out by the authority in charge.

Rice production in this region could be hit in the near future, as could activities for the production and sale of aquatic plants and ornamental fish, by the further expansion of the species that is already present in neighbouring areas. The rice cultivation in Pocenia (UD) is less than 8 km from Campomolle where there is already an abundant population of the crayfish. Similarly, one of the companies producing and selling fish and aquatic plants is located in Perteole (UD), just a few kilometres from the populations in Brancollo (10kms) and Alberoni (<15kms).

ENTRY PATHWAYS AND CAUSES OF INTRODUCTION

Carefully examining the introduction dynamics for *Procambarus clarkii* (and other non-indigenous crayfish species) in relation to the economic and cultural peculiarities of Friuli Venezia Giulia is a valid start to preventing the diffusion of this species in the region through targeted monitoring

and control and, if necessary, updating legislation. No less important, a full picture of possible entry pathways for the species enables us to steer information and communication channels towards strategic public opinion *targets*. In invasion biology, by “pathways” we mean the process (and, we would stress, we mean the process.....not the means!) that introduces a non-indigenous species into an area outside its natural area of distribution (Hulme et al., 2008). The economic, social or technical reason that determines or fosters this introduction is called the “*driver of use*” (Occhipinti-Ambrogi et al., 2008). The causes of introduction are often so closely bound up with the entry pathways that the terms can be used synonymously, but generally their meaning is rather ambiguous even in scientific literature. So, for practical reasons, including the need to produce a clear, easily readable, unambiguous text, from now on we shall speak exclusively of “entry pathways”.

Many important authors at international level, like Hulme et al (2008) and Pyšek et al. (2009), have worked to identify and clarify the possible entry pathways for non-indigenous species. In the specific case of crayfish in FVG we have used the entry pathways for aquatic species available in DAISIE (www.europe-aliens.org; Gherardi et al., 2009), indicating with a cross those which have contributed most to the presence of the species in the region (Tab. 3).

In FVG, the introduction of *P. clarkii* seems to be essentially an intentional process, one possibly linked to commercial interests that are inevitably influenced by a cultural background that sees freshwater crayfish (without distinguishing between indigenous and non-indigenous) as well-rooted in the popular culture of Friuli. Folk festivities and events centring on the consumption of freshwater crayfish are widespread in the region, as the fisherman indicate in the questionnaire distributed among them. (Tab. 4).

The crayfish used for these festivals are imported from abroad. The Turkish crayfish *Astacus leptodactylus* is the most frequently used and there are no known cases of *Astacus leptodactylus* being purchased. However, since these events certainly constitute a possible entry channel for NICS in FVG, in 2013 RARITY promoted a memorandum of understanding (MoU) endorsed by ETP together with the municipalities concerned, pro-locos in the area and local associations, in which the bodies organising such events undertake not to import live animals and to foster activities that will facilitate the protection of indigenous crayfish and raise awareness of these issues among local citizens.

There are no known breeding farms for non-indigenous crayfish in the region. The nearest non-indigenous crayfish (*Cherax destructor*) farm is located in Veneto, in the province of Treviso (G. De Luise, personal communication). Small nuclei of *P. clarkii* in private pools have been reported by some fishermen and by fishing and water management related authorities, which constitute small breeding farms for family, or at any rate local, use.

As in the rest of Europe (Chucholl 2012), trading for ornamental purposes is certainly another important entry pathway for this species into FVG. A certain percentage of these purchased specimens are in fact released in the wild where they may colonize and become invasive. Numerous species of exotic crayfish (and decapods in general) can be found at accessible prices in pet shops in FVG (Tab. 5).

Both *P. clarkii* and *Cherax* sp., another proven invasive crayfish, appear in the list with others like *Cambarellus* sp. that are potentially invasive. Finally, as also reported in Chucholl (2012), and as we have been able to verify directly in commercial enterprises in the FVG region, there are numerous taxonomic inaccuracies, both of species and genus, among specimens on sale. In the stores of a well-known chain in the sector, specimens of *P. clarkii* were sold as *Cambarus affinis* (Fig. 75) a synonym for *Orconectes limosus* for less than 10 Euros. Inadequate knowledge on the part of some store holders about the species sold and their biological characteristics leads to insufficient information being given to purchasers, who may take home a species that is potentially dangerous for the environment (but also for other species in the aquarium).

In interviews carried out in 14 shops, the storekeepers said they advised their clients not to purchase *P. clarkii* because of its aggressive, voracious behaviour. However, since the species is nevertheless in demand and easily sold if displayed in the shop, they believe it would be useful to have an initiative in place that provides for recovery (67%) following a request to return specimens (50% of cases) and a correct information campaign (91%). It is interesting to note that, against their own interests, storekeepers are favourable towards legislation that would regulate or totally prohibit sale of the species.

Online market research at national level, carried out within the project RARITY, outlines an even more worrying scenario in which many species belonging to various taxa, and whose invasiveness is now well-known, can be purchased from home for just a few Euros with a simple click (Tab. 6). The use of *P. clarkii* as live bait by fishermen for the capture of water species was one of the explanations put forward in the light of the distribution of the first red Louisiana crayfish findings in FVG (De Luise 2010). There is little data in literature relevant to this, nor confirmation of such a use by fishermen, however the opinion that the crayfish makes an excellent bait is widespread.

The contamination of fish stock for repopulation may play an important role in the spread of non-indigenous crayfish, since it may be present at stages of development that are not easily visible.

Natural dispersion from neighbouring regions could well constitute an entry pathway on a small scale from areas bordering with Veneto where the species is widespread (there are no reports of this in Trentino Alto-Adige, Austria and Slovenia; www.europe-aliens.org).

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

- Chucholl C. 2012. Invaders for sale: trade and determinants of introduction of ornamental freshwater crayfish. *Biological Invasions*, doi:10.1007/s10530-012-0273-2.
- DAISIE European Invasive Alien Species Gateway, 2008. *Procambarus clarkii*. Available from: www.europe-aliens.org/speciesFactsheet.do?speciesId=53452 [Accessed 29th September 2012].
- De Luise G. 2010. Il Gambero rosso della Louisiana. Aspetti ecologici, biologici e gestionali in Friuli Venezia Giulia. *Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia*, Udine: pp 1-52.
- Gherardi F & Holdich DM, editors. 1999. *Crayfish in Europe as alien species: How to make the best of a bad situation?* A. A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.
- Gherardi F, Gollash S, Minchin D, Olenin S & Panov VE. 2009. Alien Invertebrates and Fish in European Inland Waters. In: DAISIE, *Handbook of Alien Species in Europe*, Springer Science + Business Media B.V., pp 81-92.
- Gherardi F, Souty-Grosset C, Vogt G, Diéguez-Urbeondo J & Crandall K.A. 2010. Infraorder Astacidea Latreille, 1802 P.P.: The Freshwater Crayfish, Chapter 67. In: *Treatise on Zoology*

- Anatomy, Taxonomy, Biology - The Crustacea, Decapoda, Volume 9 Part A -Eucarida: Euphausiacea, Amphionidacea, and Decapoda (partim). Edited by F.R. Schram and J.C. von Vaupel Klein, Advisory Editors: J. Forest and M. Charmantier-Daures. Brill, Leiden, The Netherlands. Pp 269-423.

- Hulme PE, Bacher S, Kenis M, Klotz S, Kühn I, Minchin D, Nentwig W, Olenin S, Panov V, Pergl J, Pyšek P, Roques A, Sol D, Solarz W & Vilà M. 2008. Grasping at the routes of biological invasions: a framework for integrating pathways into policy. *Journal of Applied Ecology*, 45:403-414.
- Lodge DM, Taylor CA, Holdich DM & Skurdal J. 2000. Non-indigenous crayfishes threaten North American freshwater biodiversity: lessons from Europe. *Fisheries*, 25, pp 7-20.
- Occhipinti-Ambrogi A, Savini D, Cowx IG, Copp GH & Nunn AD. 2008. Analysis of drivers of the use of introduced species and dispersal mechanisms from aquaculture related activities. Report to EC, 26 pp. <http://www2.hull.ac.uk/science/biology/research/hifi/impasse/documents.aspx>
- Pyšek P, Hulme PE & Nentwig W. 2009. Glossary of the Main Technical Terms Used in the Handbook. In: DAISIE, *Handbook of Alien Species in Europe*, Springer Science + Business Media B.V., pp 375-379.



MESSA A PUNTO DI METODI INNOVATIVI PER IL CONTENIMENTO E LA CATTURA DI *P. CLARKII*

– F. Piazza¹, L. Aquiloni², C. Manfrin¹, S. Simi³, M. Duse Masin⁴, F. Florian¹,
L. Marson¹, L. Peruzza¹, M. Borgogna¹, S. Paoletti¹, L. Bonzi¹, F. Scapini⁴, P. Faraoni³,
M. Balzi³, P. Edomi¹, P. G. Giulianini¹ –

¹ Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste,
via L. Giorgeri, 5 (Edificio Q) • I - 34127 Trieste
email: giuliani@units.it

² Itinera C.E.R.T.A. srl, via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

³ Dipartimento di scienze biomediche sperimentali e cliniche, Università degli Studi di Firenze (Italy)

⁴ Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze (Italy)

1. 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 di 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 sia per l'ambiente, poiché agisce solo sulla specie bersaglio senza alterare gli equilibri del bioma presente, sia per l'uomo, e soddisfa tutti i requisiti indicati in letteratura per una ottimale tecnica di controllo compresa l'eticità e l'elevata accettabilità del largo pubblico (Lodge et al., 2006). Da notare poi che il suo utilizzo è compatibile con altre tecniche di controllo, non risulta particolarmente dispendiosa e non richiede tempi lunghi di esecuzione. Inoltre, 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 e, pertanto, risulta l'unica tecnica attualmente applicabile in piccole popolazioni tipiche dei primi stadi di colonizzazione di un nuovo ambiente.

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 *Procambarus clarkii* come specie di indagine. 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. A partire dal 2005, l'unità fiorentina ha condotto una serie di indagini per la messa a punto dei protocolli per la sterilizzazione e per la valutazione del danno istologico e comportamentale, nonché per poter confrontare gli effetti prodotti utilizzando dosaggi diversi di radiazioni. Nel 2009, utilizzando una dose irraggiante pari a 20 Gy, sono stati prodotti maschi adulti di *P. clarkii* con sterilità permanente (ovvero le gonadi non sono in grado di "ripararsi" nella successiva stagione riproduttiva) e ridotta del 43%, senza determinare significative alterazioni del comportamento sessuale (Aquiloni et al., 2009). Con questo studio, dopo 4 anni di ricerche, sono stati elaborati efficaci protocolli di trattamento e di valutazione del danno dose-dipendente. Studi comportamentali sulla scelta sessuale femminile hanno inoltre dimostrato una preferenza per maschi dominanti (Aquiloni et al., 2008) di grandi dimensioni (Aquiloni & Gherardi, 2008 a,b), suggerendo quindi i requisiti morfologici dei maschi da sottoporre a trattamento irraggiante in modo da favorire la loro selezione da parte delle femmine ed aumentare quindi le probabilità di successo della SMRT. 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 del gambero invasivo.

OBIETTIVI PER L'IMPLEMENTAZIONE DELLA TECNICA NELL'AMBITO DEL PROGETTO RARITY

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 maggiore sarà la probabilità che in natura una femmina scelga un maschio sterile come partner e quanto maggio-

re sarà il livello di sterilità raggiunto dal maschio. Per implementare la tecnica sono stati quindi condotti, nell'ambito del progetto RARITY, indagini sia (1) per valutare quanto la preferenza femminile per i maschi di grandi dimensioni e dominanti (già dimostrata con esperimenti di scelta binaria, Aquiloni & Gherardi, 2008 a,b; Aquiloni et al., 2008) fosse espressa anche in un contesto sociale più vicino alla situazione naturale e sia (2) per individuare la dose di trattamento più efficace, ovvero quella in grado di garantire la maggiore sterilità maschile senza produrre significative alterazioni comportamentali.

INDAGINI PROPEDEUTICHE ALL'APPLICAZIONE DELLA SMRT IN NATURA

Comportamento riproduttivo in un contesto sociale

In un contesto sociale altri fattori, diversi dalla taglia dei maschi e legati all'interazione tra gli individui, potrebbero influenzare la scelta femminile. È quindi strategico per implementare la SMRT valutare le possibili alterazioni di questa scelta in un contesto il più vicino possibile a quello naturale. Dieci gruppi a sex ratio bilanciata con 18 individui di tre classi di taglia sono stati osservati interagire durante il periodo riproduttivo in arene circolari con densità comparabile a quella di popolazioni naturali (20 ind/m², Gherardi et al., 1999). Tutti i comportamenti e le interazioni sono stati registrati per 1 ora e quindi visualizzati utilizzando il software NetDraw 2.123 (Borgatti, 2002). Le analisi mostrano che 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 solo il 21% sono interazioni di tipo sessuale (tentativo di monta, ribal-

tamento, blocco della femmina, copula e pseudo-copula), di cui la copula rappresenta un evento raro. Le attività di disturbo alla copula (3%) e la guardia alle coppie eterosessuali (1%) sono meno frequenti. 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. In generale, in ogni tipo di interazione si evidenzia un appaiamento per taglia, ma le femmine e i maschi che copulano più spesso appartengono alle classi di taglia medio-grande (CL>44.74 mm) (Fig. 76).

La dinamica e la durata delle interazioni varia molto tra le reti osservate, ma la taglia rappresenta una caratteristica importante per riuscire a conquistare un partner sessuale: i maschi di dimensioni maggiori interagiscono di più e riescono ad accoppiarsi con le femmine più grandi (e quindi capaci di produrre un maggior numero di uova/piccoli). Inoltre, tali maschi risultano dominanti nelle interazioni per l'accesso o la difesa della partner e anche nelle azioni di disturbo alla copula.

La dose di irraggiamento ottimale

Altre indagini sono state condotte per quantificare la sterilità raggiunta e le possibili alterazioni comportamentali indotte su maschi di *P. clarkii* a dosi irraggianti crescenti, seguendo i protocolli già sviluppati da Aquiloni et al. (2009) allo scopo di individuare il dosaggio in grado di indurre la maggiore sterilità senza alterare il comportamento riproduttivo. Gli animali sperimentali (circa 300 tra maschi e femmine) sono stati pescati prima dell'inizio della stagione riproduttiva. 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. Dopo la marcatura, gli animali di entrambi i sessi sono stati 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 da sottoporre a trattamento irraggiante sono stati suddivisi in 4 gruppi sperimentali di 30 individui ciascuno, corrispondenti alle tre dosi irraggianti scelte per l'indagine (20-40-60 Gy) e al controllo. L'irraggiamento è stato eseguito presso il reparto di radiobiologia dell'ospedale di Careggi (Firenze). Variando i tempi di esposizione è stato possibile raggiungere il dosaggio richiesto. I controlli hanno subito le stesse manipolazioni dei gruppi trattati al fine di provocare gli stessi livelli di stress nei 4 gruppi di indagine e 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).

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, parametri che misurano la durata del ciclo cellulare e delle sue fasi e quelli che misurano la frazione complessiva di cellule proliferanti, la velocità di proliferazione e la perdita 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. L'analisi del ciclo è effettuata da una workstation 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 ModFitTM (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. Il grado di ploidia della popolazione esaminata si ricava dal confronto con uno standard diploide di riferimento (nel nostro caso è stato utilizzato il tessuto dell'epatopancreas) ed è calcolato come il rapporto tra il canale modale di fluorescenza del picco G₀/G₁ della popolazione in esame e quello del picco G₀/G₁ dello standard di riferimento diploide, riportati nelle ascisse del grafico. Il parametro che si ottiene è il DNA Index (DI), sulla base del quale si assegna il grado di ploidia delle cellule del campione.

L'analisi condotta per ogni trattamento e per il controllo ha rilevato una totale assenza di tessuto proliferativo già a 20 Gy (Fig. 77). Questi risultati confermano quindi la possibilità di utilizzare radiazioni ionizzanti per ottenere maschi sterili indicando che già a 20 Gy è possibile ottenere un abbattimento completo della proliferazione cellulare.

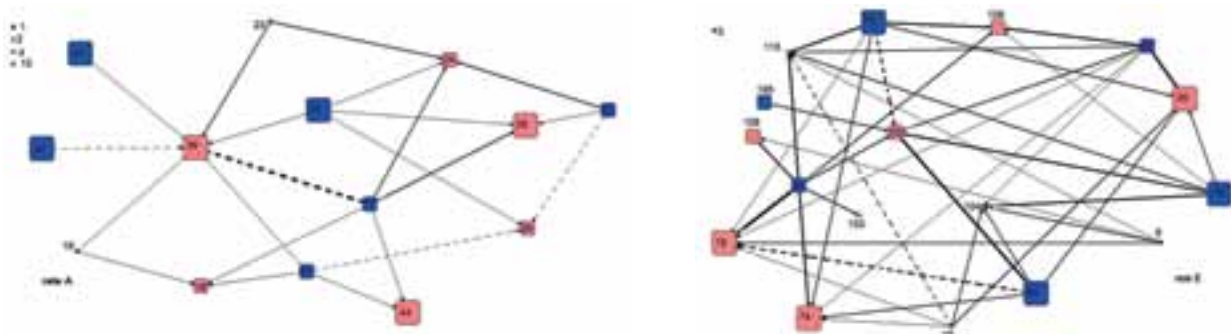


Fig. 76. Reti sociali in due gruppi sperimentali. Ogni nodo indica un individuo maschio (quadrato blu) o femmina (quadrato rosa). La dimensione dei quadrati indica la classe di taglia dell'individuo (piccola, media e grande) mentre il diverso spessore delle frecce di collegamento tra nodi indica la quantità 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.

Fig. 76. Social networks in two experimental groups. Each node indicates a male (blue square) or female (pink square) individual. The size of the squares indicates the size class (small, medium and large) while the thickness of the arrow linking the nodes indicates the amount of interaction between two individuals. Copulation is represented by a dotted line between two individuals. Individuals that do not interact are shown as separate nodes in the top left of the diagram.

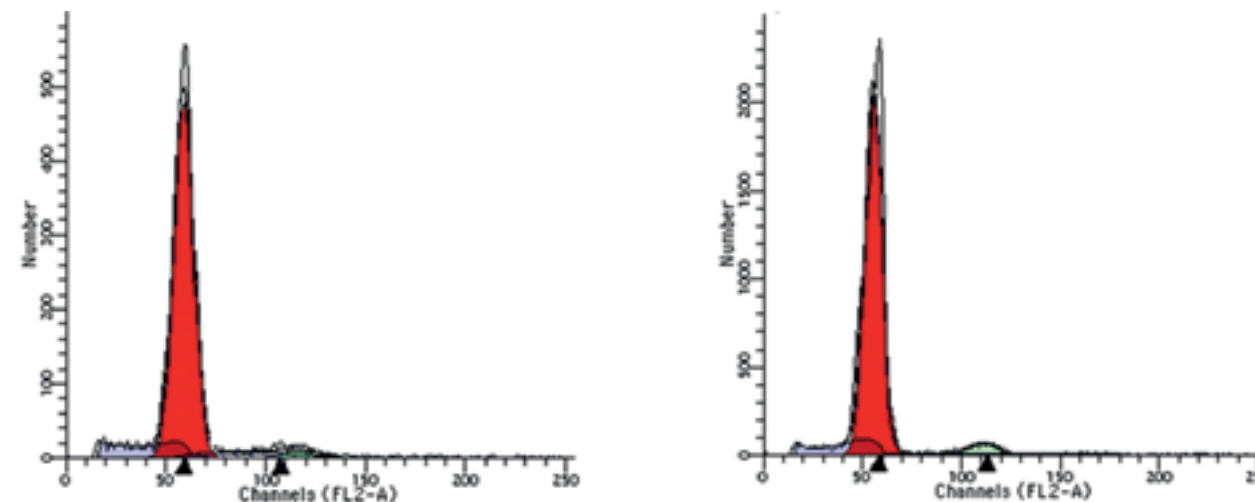


Fig. 77. Citofluorimetria a flusso. Istogramma di frequenza dei valori di fluorescenza rilevati nell'epatopancreas, utilizzato come tessuto di riferimento diploide, (a sinistra) e nelle gonadi (a destra) di gamberi irraggiati a 20 Gy.

Fig. 77. Flow cytometry. Frequency histogram showing the fluorescence values measured in the liver and pancreas, analysed as diploid reference tissue (left), and in the gonads (right) of crayfish irradiated at 20Gy.

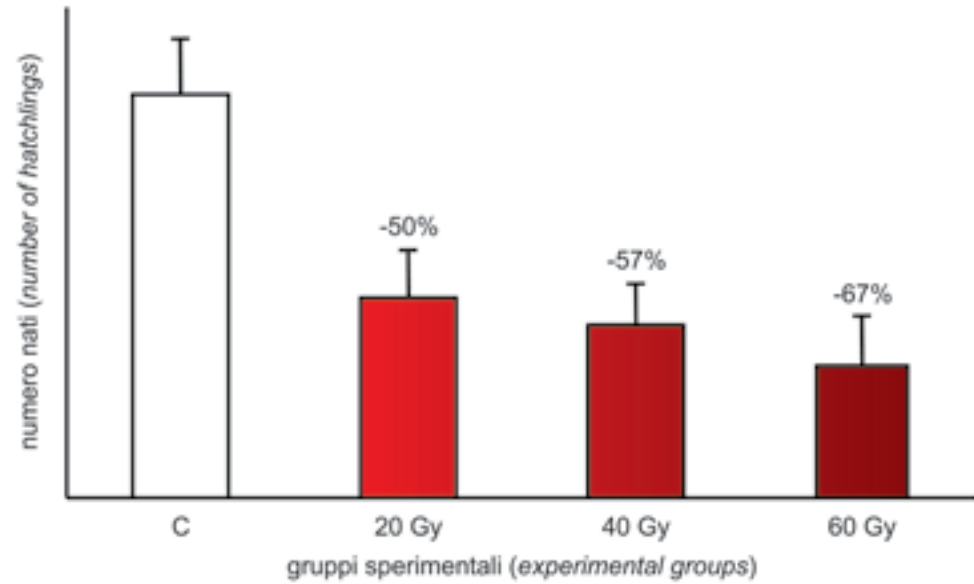


Fig. 78. Numero nati in coppie con maschio appartenente ai diversi gruppi sperimentali.
Fig. 78. Number of births to pairs with males from the different experimental groups.

Analisi comportamentale e output riproduttivo di maschi irradiati a 20, 40 o 60 Gy

Nessuno dei gruppi sperimentali ha manifestato alterazioni della motilità, dell'appetenza e del comportamento in seguito al trattamento. Sono state quindi osservate per 30 minuti 23 coppie di controllo e 18, 22 e 21 per i trattamenti 20, 40 e 60 Gy, rispettivamente, registrando i principali parametri comportamentali di confronto fino alla copula (Aquiloni et al., 2009). Successivamente, il maschio era destinato alle analisi istologiche e citofluorimetriche mentre la femmina rimaneva nell'acquario fino alla schiusa delle uova. Il numero dei piccoli nati da ciascuna coppia è stato utilizzato per quantificare la capacità riproduttiva nei diversi gruppi sperimentali.

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, anche se nel gruppo 60 si nota un lieve –ma non significativo– decremento. L'irraggiamento ha determinato una significativa riduzione nel numero delle nascite in tutti i trattamenti che aumenta al crescere della dose di trattamento: meno 50% di nuovi nati a 20 Gy, meno 57% a 40 Gy, fino a meno 67% a 60 Gy (Fig. 78).

Analisi morfometrica e citologica del danno testicolare

Gamberi irradiati sono stati sacrificati dopo 10 e 30 giorni dall'irraggiamento per valutare il danno a livello istologico. I testicoli sono stati disecati, fissati, disidratati e inclusi in resina epossidica. Sezioni semifini sono state colorate con blu di toluidina e osservate con un microscopio Olympus BX50. Per l'analisi ultrastutturale le sezioni sono state contrastate con citrato di piombo e acetato di urani-

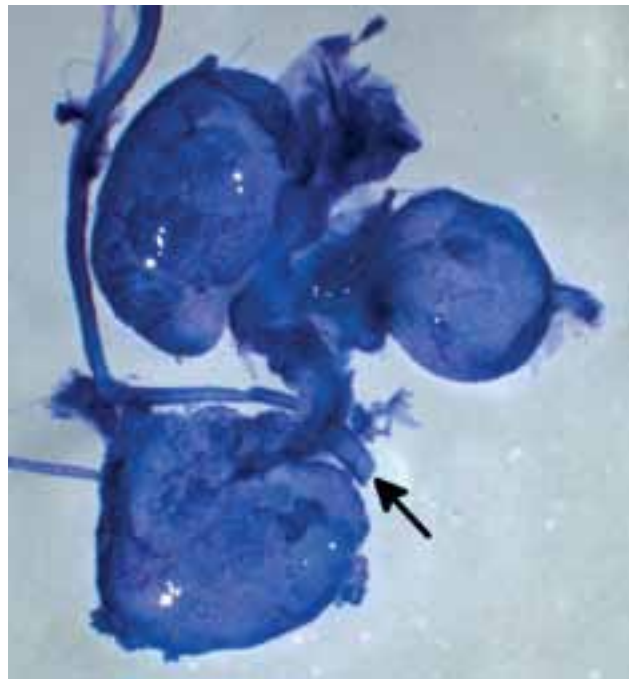


Fig. 79. Testicolo di *P. clarkii*. Struttura del testicolo trilobato a fresco colorato con blu di toluidina. L'emergenza del vaso deferente destro è indicata con la freccia.
Fig. 79. Testis of *P. clarkii*. Structure of the trilobed testis stained with toluidine blue. The emergence of the right vas deferens is indicated by the arrow.

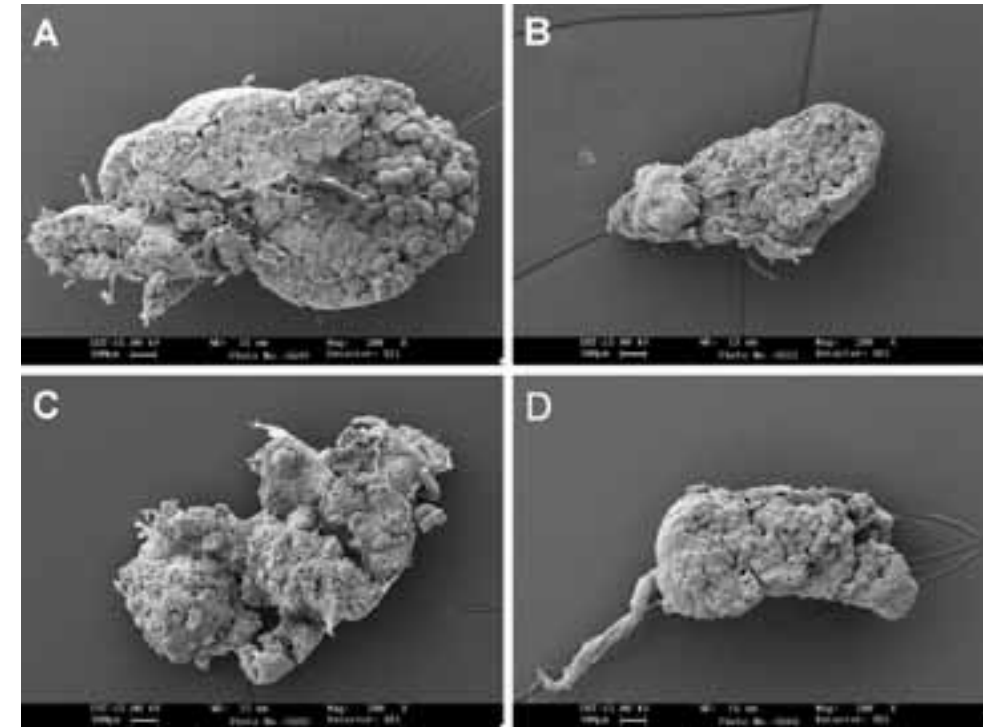


Fig. 80. Vista generale al microscopio elettronico a scansione di lobi testicolari fratturati lungo il piano sagittale mediale di: A – controllo; B – animale irradiato con 20 Gy; C – 40 Gy; D – 60 Gy.
Fig. 80. SEM general view of the medial-sagittal fractures of the testicular lobes: A - control; B - animal irradiated with 20 Gy; C - 40 Gy; D - 60 Gy.

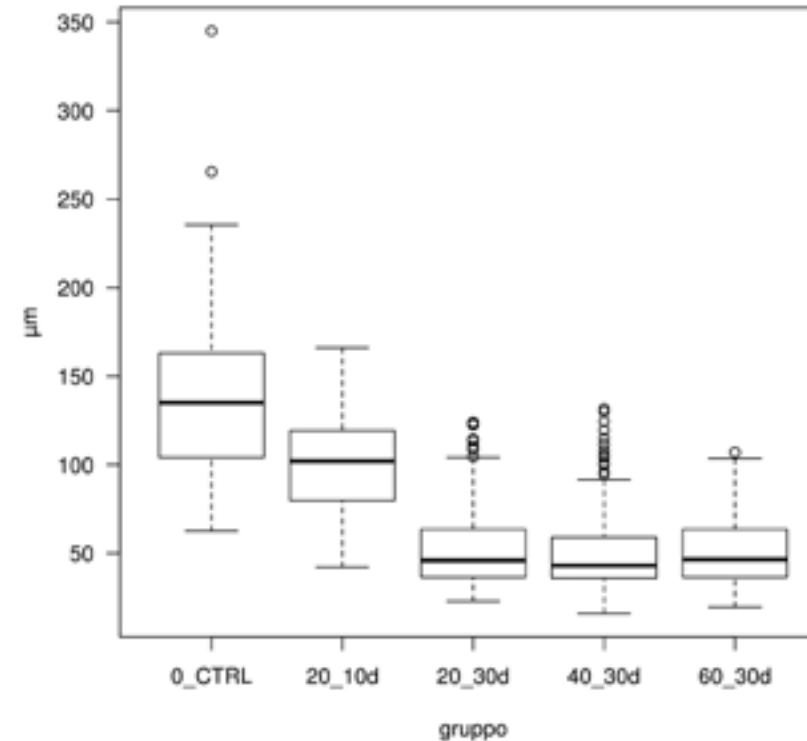


Fig. 81. Boxplot dei diametri di acini testicolari in sezioni semifini di animali di controllo (0_CTRL), di animali irradiati con 20 Gy dopo 10 giorni dal trattamento (20_10d), di animali irradiati con 20 Gy (20_30d), 40 Gy (40_30d) e 60 Gy (60_30d) dopo 30 giorni di trattamento.
Fig. 81. Boxplot of the mean diameters of testicular acini in semithin sections of control animals (0_CTRL), of animals irradiated with 20 Gy after 10 days from the treatment (20_10d), of animals irradiated with 20 Gy (20_30d), 40 Gy (40_30d) and 60 Gy (60_30d) after 30 days of treatment.

le e osservate con un microscopio Philips TEM 208. Per la microscopia elettronica a scansione, i campioni sono stati disidratati al punto critico, metallizzati con oro e osservati con un microscopio Leica Stereoscan 430i. 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 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 (Fig. 79). 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). L'analisi al microscopio elettronico a scansione ha evidenziato 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 rispetto a quelli dei lobi testicolari degli animali irradiati in cui si presentano più piccoli, compatti, collassati e fusi tra di loro a causa dei fenomeni di necrosi e di rimaneggiamento cellulare indotti dalle radiazioni (Fig. 80).

Per ogni gruppo (di controllo, 20 Gy 10 giorni dopo l'irraggiamento, 20 Gy, 40 Gy e 60 Gy 30 giorni dopo l'irraggiamento) sono stati misurati i diametri maggiori e minori di 250 acini in sezioni semifini di lobi testicolari di 5 animali per gruppo. È stato poi calcolato il diametro medio e i dati sono stati confrontati con metodi statistici. L'analisi ha evidenziato differenze altamente significative tra gli acini degli animali di controllo non irradiati e quelli provenienti da animali irradiati (Kruskal-Wallis, $p < 2.2 \times 10^{-16}$). In particolare i confronti a coppie evidenziano che gli acini testicolari di animali irradiati con 20 Gy dopo 10 giorni (diametro medio di $100.9 \pm 2.6 \mu\text{m}$) si presentano già significativamente più piccoli di quelli degli animali di controllo (diametro medio di $135.9 \pm 4.6 \mu\text{m}$) e dopo 30 giorni, a tutte le dosi (diametri medi: 20 Gy $53.2 \pm 1.5 \mu\text{m}$, 40 Gy $49.9 \pm 1.4 \mu\text{m}$, 60 Gy $52.0 \pm 1.3 \mu\text{m}$), gli acini sono significativamente ancora più piccoli degli acini degli animali irradiati da 10 giorni. Non esiste invece differenza significativa tra le dimensioni medie degli acini testicolari alle 3 dosi di raggi X dopo 30 giorni dal trattamento (Fig. 81).

Per indagare con maggior dettaglio i danni a livello della spermatogenesi sono stati allestiti preparati per microscopia ottica ed elettronica. In un lobo testicolare di un animale di controllo in sezione sagittale si evidenzia una maturazione graduale degli acini a partire dalla zona distale germinativa (ZG), con progressivo aumento del 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. 82).

Ad ingrandimenti maggiori si possono osservare tutti gli stadi della spermatogenesi che vengono illustrati nella Fig.

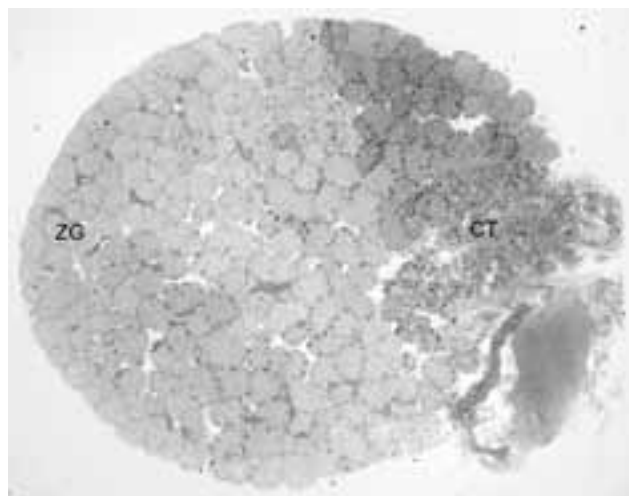


Fig. 82. Sezione semifine ($1 \mu\text{m}$ – blu di toluidina) sagittale mediale di un lobo testicolare di un animale di controllo.

Fig. 82. Sagittal medial semithin section ($1 \mu\text{m}$ - toluidine blue) of a testicular of a testis of a control animal.

83 (a sinistra) 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: spermatozoi I (A e B), spermatozoi II (C), spermatozoi precoci e maturi (D ed E) e spermatozoi (F) (Fig. 83, a sinistra).

Gli acini testicolari di animali irradiati con 20 Gy dopo 10 giorni dal trattamento presentano un gradiente di maturazione meno chiaro e molti acini contenenti cellule germinali e di supporto fortemente vacuolizzate con quadri evidenti di morte cellulare programmata (apoptosi) (Fig. 83, a destra; A, B e C). 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. 83 a destra; D, E e F). Dopo 30 giorni dall'irraggiamento, a tutte le dosi, la necrosi delle cellule germinali e di supporto è diffusa lungo tutto il lobo testicolare. Non è più possibile apprezzare la spermatogenesi perché gli acini contengono solo cellule con quadri di apoptosi degenerativa quali: condensazione citoplasmatica, indentazione nucleare con gemmazione, condensazione della cromatina e periferizzazione, nuclei picnotici frammentati intensamente colorabili e corpi apoptotici. L'analisi ultrastrutturale evidenzia un lamina basale fortemente convoluta intorno all'acino residuale indice della coartazione di questa unità funzionale della spermatogenesi a seguito della morte cellulare al suo interno. All'interno dell'acino sono evidenziabili solo alcuni nuclei di cellule vitali di supporto che presentano un citoplasma este-

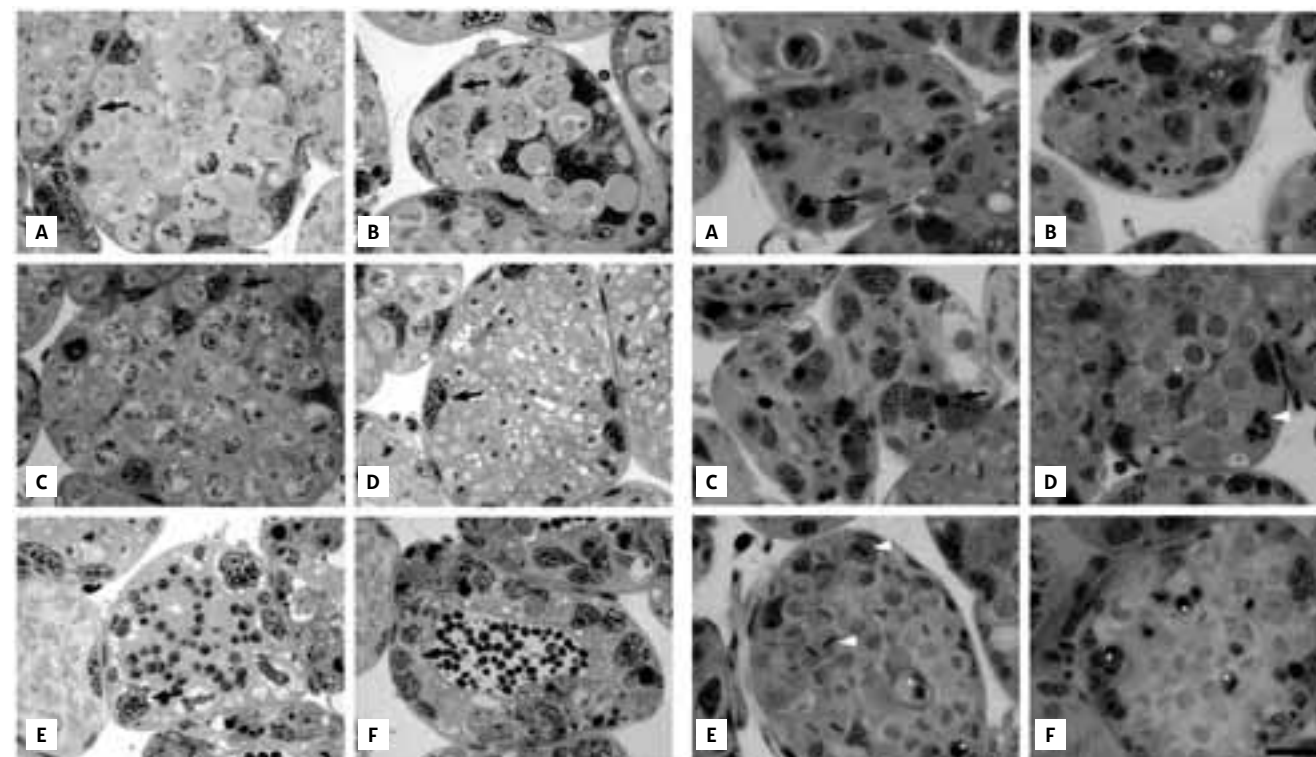


Fig. 83. A-F (a sinistra) Sezioni semifini ($1 \mu\text{m}$ – blu di toluidina) di acini testicolari di un animale di controllo a vari stadi di maturazione. Nel lume degli acini sono presenti spermatozoi I (A e B), spermatozoi II, spermatozoi (D e E) e spermatozoi maturi (F). Alcune cellule di Sertoli sono evidenziate con la freccia. A-F (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 (freccie - in necrosi) e le cellule germinali con divisioni meiotiche anomale (punte di freccia) e cromosomi addensati (asterischi). Barra di calibrazione = $20 \mu\text{m}$.

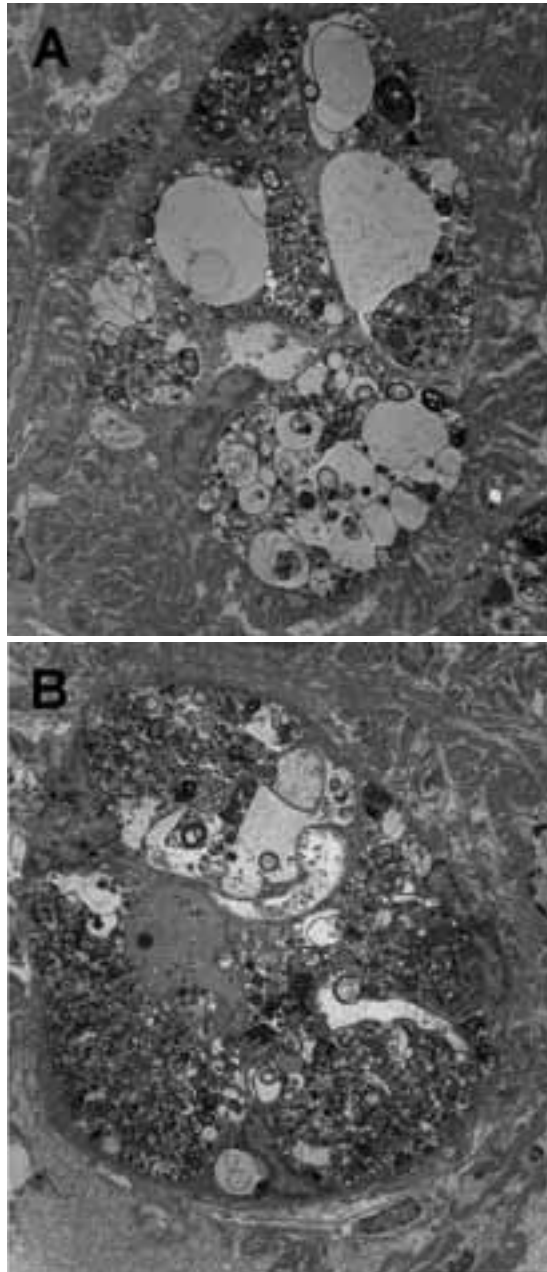
Fig. 83. A-F (left plate) Semithin sections ($1 \mu\text{m}$ - toluidine blue) of testicular acini of a control animal at various stages of maturation. In the acinar lumen are present: spermatozoi I (A and B), spermatozoi II, spermatozoi (D and E) and mature sperm (F). Some Sertoli cells nuclei are indicated by the arrow. A-F (right plate). Semithin sections ($1 \mu\text{m}$ - toluidine blue) of testicular acini of an animal irradiated with 20 Gy. Sertoli cells with micronuclei (arrows - necrosis) and germ cells with abnormal meiotic divisions (arrowheads) and thickened chromosomes (asterisks) are evident. Calibration bar = $20 \mu\text{m}$.

samente vacuolizzato con fagosomi contenenti corpi apoptotici derivanti da cellule germinali e altre cellule di supporto morte a seguito dell'irraggiamento (Fig. 84).

Prospettive e conclusioni sull'applicabilità della tecnica SMRT

Dall'analisi dell'output riproduttivo e dei danni istologici riportati alle gonadi è evidente come la capacità riproduttiva sia compromessa già a 20 Gy senza un incremento sensibile dell'effetto a dosi crescenti. L'analisi comportamentale mostra la possibilità di aumentare la dose irraggiante per l'applicazione in campo fino a 40 Gy (ovvero fino a una dose doppia rispetto a quella precedentemente utilizzata su popolazioni naturali; Cecchinelli *et al.*, 2010), senza incorrere nel rischio di alterazioni comportamentali. 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 lo stesso trattamento ha prodotto un maggiore effetto sulle gonadi raggiungendo il 50% di sterilità. A parità di dosaggio esiste quindi una grande variabilità nella risposta alle radiazioni a cui concorrono numerosi altri fattori ambientali e individuali, primo tra tutti lo stadio di maturazione delle gonadi. Piuttosto che utilizzare dosi più elevate di trattamento, sarebbe quindi opportuno trattare gli animali quando le gonadi sono in stadi precoci della spermatogenesi (spermatozoi e spermatozoi), fase che deve essere individuata caso per caso perché dipende dal contesto ambientale della popolazione target. Nonostante il livello di sterilità indotto ad un certo dosaggio possa presentare un certo range di variabilità, la SMRT costituisce, ad oggi, la tecnica di controllo del gambero invasivo meno impegnativa dal punto di vista economico e



gestionale: sterilizzazione e rilascio dei maschi trattati possono essere realizzate in un unico giorno con frequenza, al massimo, annuale e, da un punto di vista economico, il costo è decisamente inferiore rispetto a quanto necessario per un trappolaggio intensivo.

2. ESCHIE FEROMONALI

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, 1997; Stebbing et al., 2003a; b; Belanger e Moore, 2006; Corkum e Belanger, 2007), sullo sviluppo per l'accelerazione della crescita e il differen-



Fig. 85. Foto dei nefropori di *P. clarkii*.
Fig. 85. *P. clarkii*'s nephropores picture.

Fig. 84. Ultrastruttura di acini testicolari coartati dopo irradiazione con 60 Gy. Sezione fine (120nm – citrato di piombio, acetato di uranile). Barra di calibrazione = 10 µm. Cellule di supporto vitali con aspetto macrofagico presentano un citoplasma completamente occupato da quadri di fagocitosi di corpi apoptotici (residui di cellule germinali e altre cellule di supporto).

Fig. 84. Ultrastructure of coarctated acini after irradiation with 60 Gy (thin section, 120nm – lead citrate, uranyl acetate). Calibration bar = 10 µm. Viable macrophage-like supporting cells are filled by phagosomes with apoptotic bodies (residual germ cells and other supporting cells).

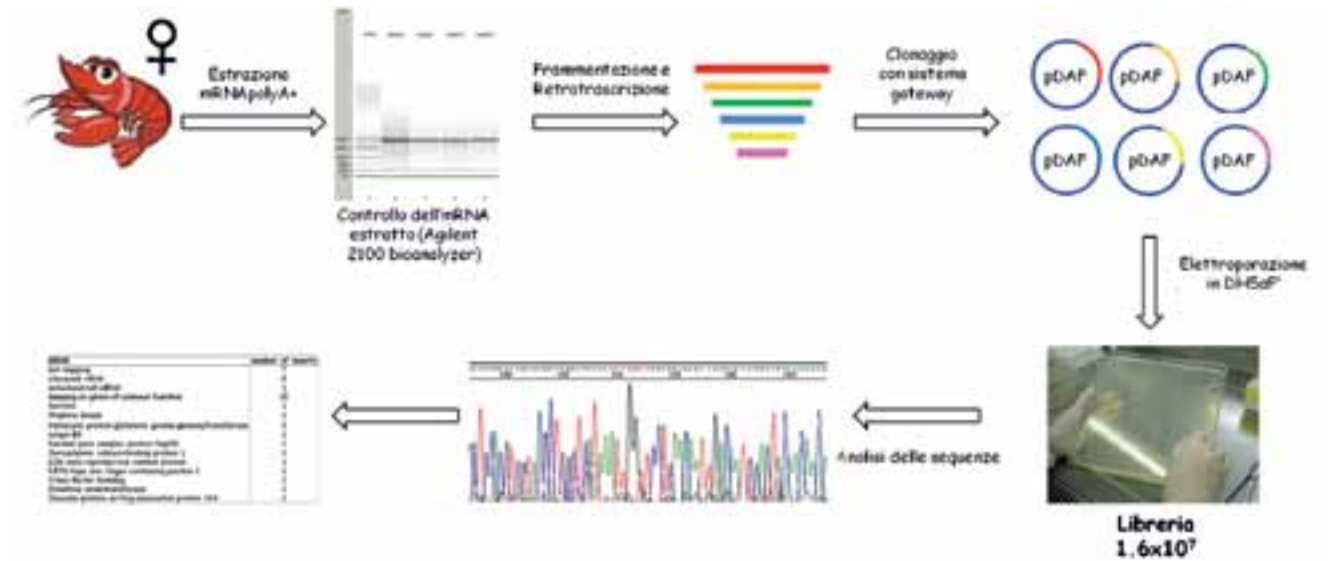


Fig. 86. Schema della costruzione della libreria di feromoni sessuali di *P. clarkii*.
Fig. 86. Main steps for the *P. clarkii* sexual pheromones library construction.

ziamento 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. 85) (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). 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 feromonalie permetterebbe di catturare selettivamente 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 dome-



Fig. 87. Preparazione delle antennule per la selezione.
Fig. 87. Antennula preparation for the selection.

stici 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. 86) 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). 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 1.6×10^7 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 (Montecclaro et al., 2010). Il flagello laterale viene usato per la ricerca di cibo (Atema et al., 1988; Laverack, 1988; Giri and Dunham, 1999; Steullet et al., 2001, 2002), per captare i feromoni sessuali (Ameyaw-Akumfi and Hazlett, 1975; Gleeson, 1982; Kamio et al., 2005) e le molecole di comunicazione sociale, media la percezione degli odori (Giri and Dunham, 1999) e la discriminazione del sesso (Ameyaw-Akumfi and Hazlett, 1975; Dunham and 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. 87).

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 col-

laborazione con UNIFI sono stati allestiti dei saggi comportamentali per valutare la capacità attrattiva dei pool fagici su maschi di *P. clarkii* in periodo recettivo.

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 fagici). 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. 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. 88a). Come per la locomozione, anche i movimenti antennali aumentano significativamente solo in seguito alla somministrazione del pool L (Fig. 88b).

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).

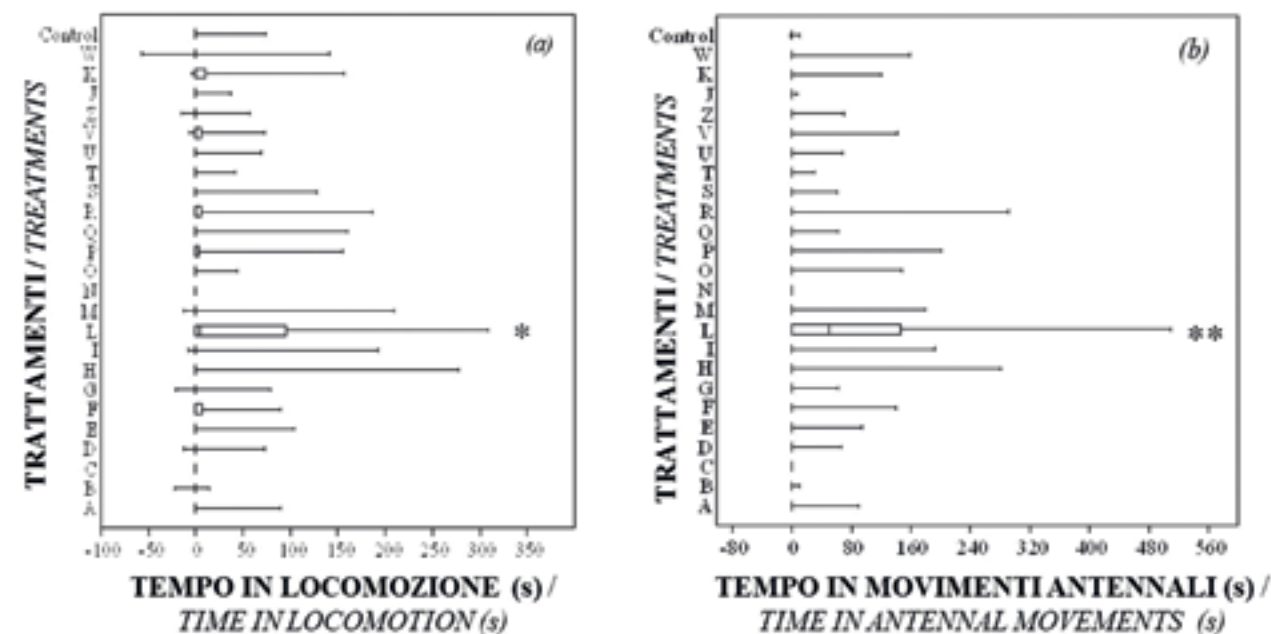


Fig. 88. Box plot relativi al tempo netto speso in locomozione orientata (a) e in movimenti antennali (b) in seguito alla somministrazione del trattamento. Il confronto tra trattamenti (N=24 per pool) è stato analizzato con il Friedman test seguito da un pairwise Wilcoxon test. Uno e due asterischi denotano una differenza significativa dal controllo di $P < 0.01$ e $P < 0.001$, rispettivamente.

Fig. 88. Box plot of the net time spent in orientated locomotion (a) and in antennae movement (b) following administration of the treatment. The comparison between treatments (N=24 per pool) was analysed using the Friedman test followed by a pairwise Wilcoxon test. One or two asterisks denote a significant difference from the control group of $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

Allestimento di esche feromonal e prova 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). 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 feromonal e le ultime 10 contenenti l'esca usata per i monitoraggi (scatoletta di cibo per gatti forata). La prima prova ha evidenziato che le nasse contenenti le esche feromonal 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).

Prospettive e conclusioni sull'applicabilità dei feromoni sessuali

Le potenzialità di esche specie-specifiche per maschi maturi in stagione riproduttiva sono dupli (1): impatto minimo sulla flora/fauna locale dovuto esclusivamente al disturbo della collocazione delle trappole (2) 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 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 feromonal 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 ti-

pico di una molecola idrofobica e, da un punto di vista 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. A conferma di questa ipotesi i risultati raccolti in campo non evidenziano una attività feromonale in grado di attrarre maschi nelle trappole in modo significativo. 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.

3. ESCHIE ORMONALI CONTENENTI L'ORMONE GONADO-INIBITORIO

Con i risparmi di spesa ottenuti dalle 2 precedenti tecniche si è proceduto alla messa a punto di una tecnica (non prevista nel piano del progetto) che, se sviluppata, presenta tutti i requisiti per poter divenire un metodo innovativo di eradicazione per le specie invasive di Crostacei. La tecnica 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.

L'ormone gonado-inibitorio

Ad oggi il GIH è stato caratterizzato nell'astice americano (*Homarus americanus*) (De Kleijn, 1994), nell'astice europeo (*Homarus gammarus*) (Ollivaux et al., 2006), nell'aragosta norvegese (*Nephrops norvegicus*) (Edomi et al., 2002), e nel gambero indopacifico (*Penaeus monodon*) (Treerattrakool et al., 2008). Per caratterizzare il GIH di *P. clarkii* abbiamo sequenziato il trascrittoma dei tessuti neuroendocrini peduncolari, sede di produzione degli ormoni dei Decapodi. Su 87 milioni di sequenze ottenute solo 2 codificavano per il GIH. Si è così confermato che in animali con gonadi allo stato quiescente, l'espressione del GIH è molto bassa e questo dato, nonostante abbia reso più difficoltosa la caratterizzazione del trascritto, è un elemento di grande interesse perché significa che l'ormone esplica la sua azione inibitoria a concentrazioni minime. L'impiego quindi, su larga scala, non richiederebbe grandi quantità di peptide sinte-

tico e questo permetterebbe di contenere i costi di produzione delle esche. Per poter completare l'informazione nucleotidica del trascritto sono state applicate metodiche di biologia molecolare che permettono di ricostruire la parte di trascritto mancante e di ottenerne la sequenza completa. In Fig. 89 sono riportati gli allineamenti delle sequenze proteiche dei GIH riportati in letteratura con il GIH caratterizzato in *P. clarkii*. È in corso la sintesi chimica in fase solida del peptide per procedere alla somministrazione del GIH per testarne l'attività biologica in saggi omospecifici.

Dimostrazione del ruolo dell'ormone gonado-inibitorio in *P. clarkii* mediante interferenza dell'RNA

La metodica di silenziamento di un singolo gene prende il nome di interferenza dell'RNA ed 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). Tale tecnica, si basa su un meccanismo presente in tutti gli organismi viventi, mediante il quale l'espressione genica viene regolata o repressa grazie all'attività di un complesso denominato RISC. 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. Per validare il ruolo inibitorio del GIH sulle gonadi di *P. clarkii* abbiamo proceduto al silenziamento di questo ormone mediante l'iniezione di RNA a doppio filamento (dsRNA) codificante per una porzione del GIH.

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. Abbiamo sottoposto gli animali ad un esperimento di 14 giorni con iniezioni a giorni alterni. I gruppi sperimentali erano costituiti da: un gruppo di controllo (S) che è stato iniettato con una soluzione fisiologica compatibile con l'osmolarità dell'emolinfa dei gamberi, un secondo gruppo è stato epeduncolato bilateralmente per eliminare la fonte endogena di GIH (ESA) e un terzo gruppo è stato iniettato con 20 µg di RNA a doppio filamento di GIH (RNAi). Inoltre, una decina di animali è stata sacrificata all'inizio dell'esperimento per valutare lo stadio di maturità (To). Al termine dell'esperimento sono stati analizzati gli indici gonado- (GSI) ed epato-somatici (HSI) dei diversi gruppi, ovvero si sono pesati gli ovari o l'epatopancreas e il peso è stato rapportato alla massa totale dell'animale. Dopo il trattamento gli animali iniettati con RNA a doppio filamento, codificante per

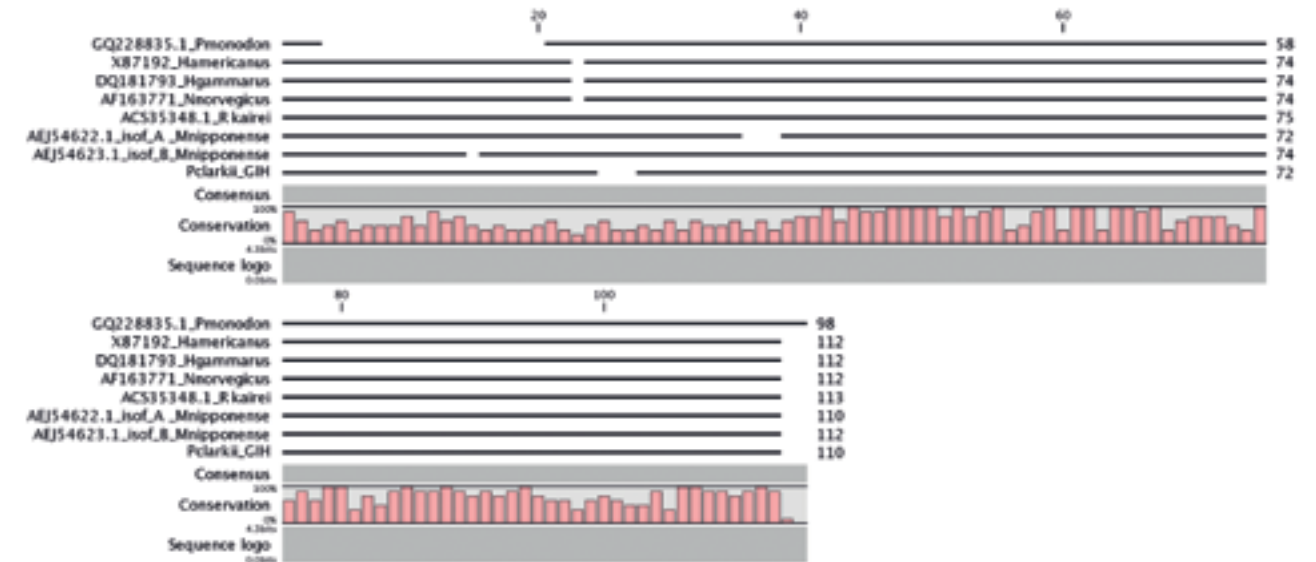


Fig. 89. Allineamento delle sequenze proteiche dei GIH caratterizzati in organismi appartenenti all'ordine Decapoda. Sono presenti inoltre gli identificativi di GenBank per poter risalire alla sequenza del trascritto.

Fig. 89. Alignment of protein sequences of GIHs characterized in organisms belonging to the order Decapoda. The GenBank IDs are shown.

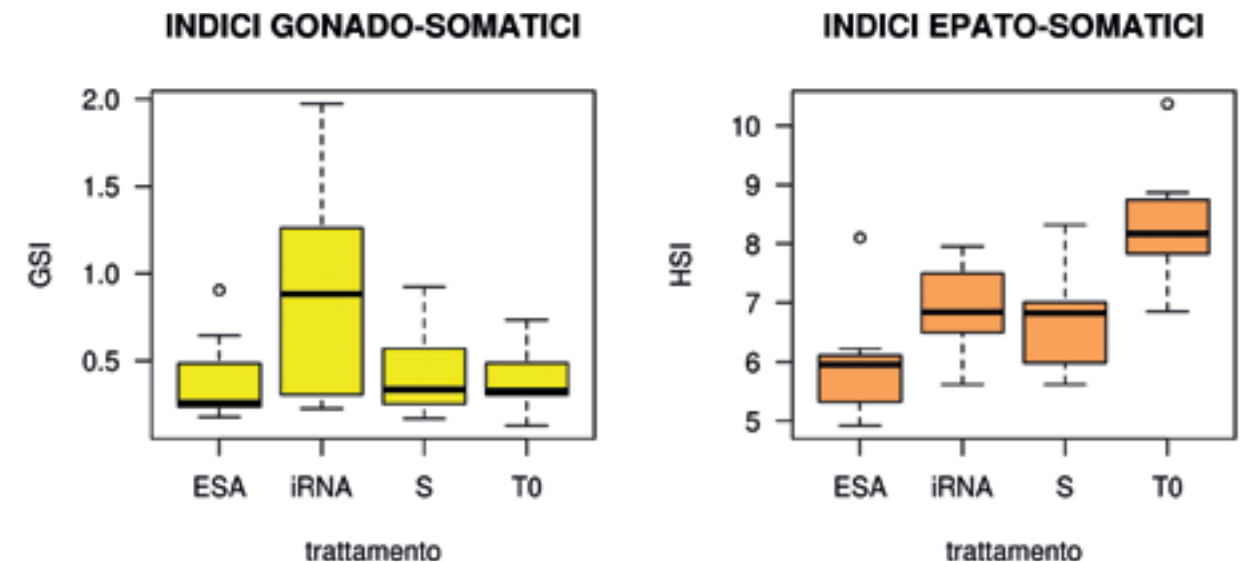


Fig. 90. Indici Gonado- ed Epato-somatici riscontrati nei gruppi sperimentali. ESA: gruppo epeduncolato; RNAi: gruppo iniettato con doppio filamento GIH; S: gruppo di controllo; To: gruppo valutato all'inizio dell'esperimento.

Fig. 90. Gonado- and Hepato-somatic indexes in the experimental groups. ESA eyestalk-ablated animals; RNAi: animals injected with dsGIH; S: control animals; To: animals at the beginning of the experiment.

il GIH, presentavano un valore medio di indice gonado-somatico (GSI) raddoppiato rispetto ai valori del GSI sia del gruppo di controllo che degli animali ablati (Fig. 90). Nonostante l'analisi statistica non abbia evidenziato differenze significative tra i GSI dei diversi gruppi a fine trattamento rispetto ai valori iniziali, il gruppo trattato presentava valo-

ri di GSI più elevati (1/3 degli animali con GSI >1.25) e con una tendenza alla significatività nel confronto con i GSI del gruppo iniettato con tampone sterile (p=0.10). Mediante l'utilizzo di metodiche PCR Real Time quantitative, abbiamo valutato i livelli di espressione delle vitellogene di *P. clarkii*. Queste proteine vengono prodotte nell'e-

patopancreas e successivamente raggiungono gli ovari attraverso la circolazione emolinfatica.

Esse costituiscono i precursori delle componenti proteiche dell'uovo e sono prodotte quando gli ovari diventano attivi; perciò l'espressione delle vitellogenine è stata presa in considerazione come marcatore di attività o inattività ovarica a seguito dell'iniezione di doppio filamento di RNA-GIH. Nella Fig. 91 è possibile osservare, nell'ovario, una diminuzione dell'espressione delle vitellogenine nel gruppo RNAi rispetto al gruppo ablatato (ESA).

Nell'epatopancreas, invece, avviene esattamente il contrario. Ciò significa che il silenziamento del GIH ha un ruolo inibitorio sulla vitellogenesi ovarica andando ad influenzare la sintesi di vitellogenine nell'epatopancreas: il silenziamento provoca un aumento dell'espressione sia rispetto agli animali di controllo che a quelli epeduncolati. I nostri dati confermano il ruolo inibitorio del GIH sulla maturità ovarica in *P. clarkii*.

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 (Aspden et al., 1997; Rao e Sharma, 1997; Onishi e Machida, 1999). Il chitosano è un polisaccaride presente nell'esoscheletro di Insetti e Crostacei. Questa sostanza ha particolari proprietà chimiche che 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 polisaccaridi estratti dalle alghe marine brune (es. *Laminaria hyperbore* e *Ascophyllum nodosum*) che si trovano nelle acque poco profonde di

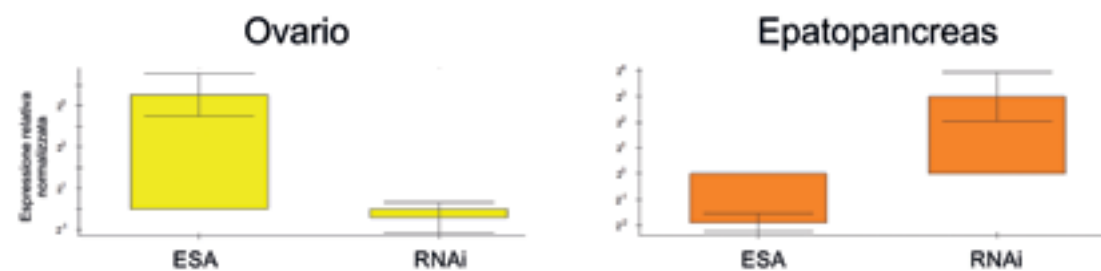


Fig. 91. Espressione normalizzata delle vitellogenine riscontrata nei gruppi di animali ablatati (ESA) e di animali iniettati con il doppio filamento di GIH (RNAi) negli ovari e nell'epatopancreas. Il gruppo di controllo (S) e un gene di riferimento sono stati utilizzati per normalizzare i valori di espressione delle vitellogenine.

Fig. 91. Normalized expression of vitellogenins observed in the ovaries and in the hepatopancreas of eyestalk-ablated animals (ESA) and of animals injected with dsGIH (RNAi). The control group (S) and a reference gene were used to normalize the values of expression of vitellogenins.

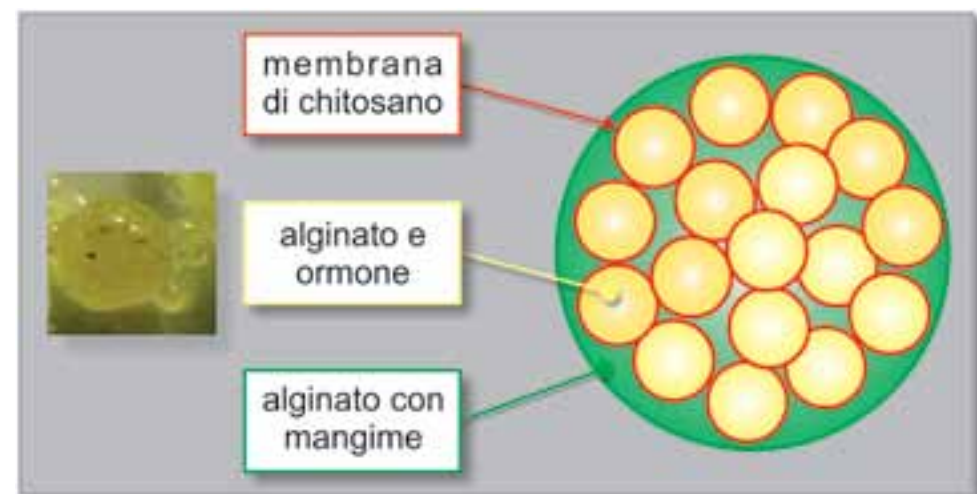


Fig. 92. Rappresentazione schematica dell'esca ormonale nella sua formulazione finale.
Fig. 92. Schematic representation of the hormone baits in its final formulation.

zone temperate. Abbiamo deciso di utilizzare l'alginato per la sua particolare proprietà di gelificare (Smidsrød e Skjåk-Braek, 1990) in presenza di cloruro (sale) di calcio, per cui se è "gocciolato" da una siringa tende a formare delle strutture sferiche. Questo sistema di incapsulazione, ovvero lo sviluppo di beads con alginato e chitosano, 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; Chotigeat, 2013). Le prove, per verificare la funzionalità del sistema, sono state effettuate con l'ormone iperglicemizzante dei Crostacei (cHH) che consente un saggio biologico semplice poiché basta rilevare un aumento della glicemia nell'emolinfa per verificarne l'assorbimento.

Preparazione dell'esca per veicolare peptidi

Per rendere appetibili le sfere di alginato/chitosano contenenti gli ormoni 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 la perdita di peptidi nell'acqua. Le microsfere sono state preparate con un generatore elettrosta-

tico di beads (Strand et al., 2002). 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, ottenuta per gelificazione in situ, e mangime omogeneizzato in acqua. Così strutturata, la matrice di alginato può attraversare lo stomaco, mantenendo al suo interno le molecole di ormone microincapsulato, per poi disgregarsi 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. 92).

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 Branconetto (Lido di Staranzano, Friuli Venezia Giulia) catturati con l'ausilio di nasse e acclimatati per una settimana. Per verificare la funzionalità delle beads si è deciso 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. Nello specifico, per valutare la presenza di quantità bioattive di questo ormone nell'emolinfa è suf-

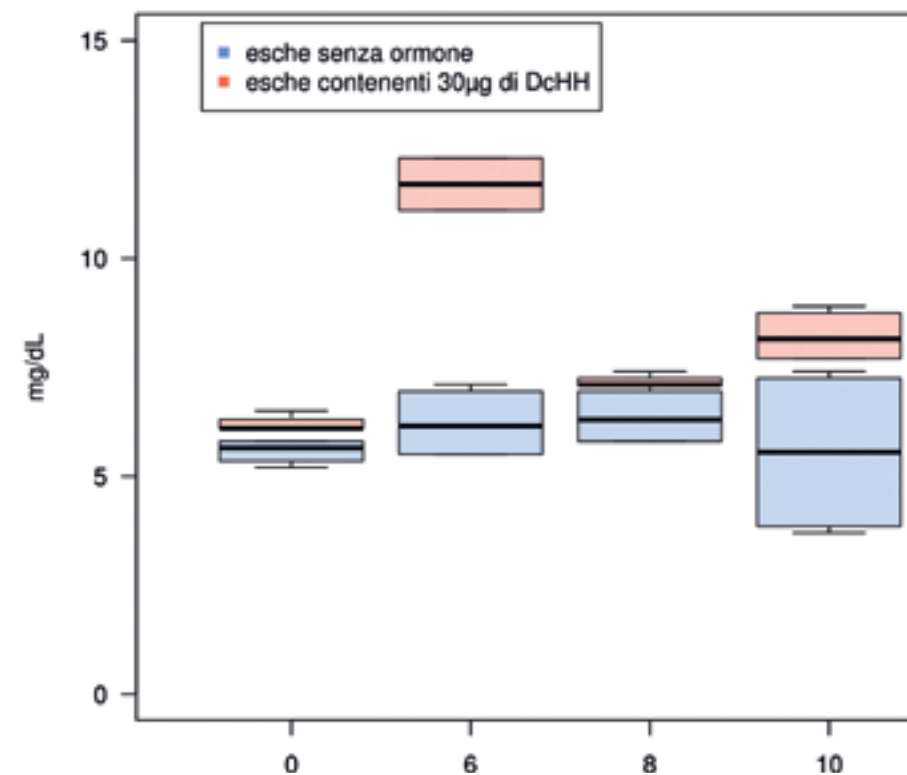


Fig. 93. Andamento temporale della glicemia degli animali nutriti con esche contenenti cHH (rosa) e animali nutriti con le stesse esche ma senza l'ormone (azzurro) nelle prime 10 ore dopo la somministrazione.
Fig. 93. Temporal trend in the blood glucose of the animals fed with baits containing CHH (pink) and animals fed with baits without the hormone (blue), in the first 10 hours after oral delivery.

ficiente misurare i valori di glicemia, che aumentano grazie alla sua funzione iperglicemizzante. Sono stati utilizzati 10 gamberi ependuolati bilateralmente (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 µg 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 alla sesta ora: quelli successivi sono stati eseguiti ogni due ore fino alla ventiduesima.

Alla 6ª ora dopo la somministrazione gli animali nutriti con esche ormonali presentavano una glicemia di 11.7±0.35 mg/dL, statisticamente più alta rispetto agli animali nutriti con le esche senza l'ormone (6.22±0.42 mg/dL) (Wilcoxon rank sum test, p-value = 0.02747) (Fig. 93). Viene così dimostrata la funzionalità del sistema delle beads di alginato/chitosano per la somministrazione orale di ormoni peptidici specie-specifici in Crostacei Decapodi.

Prospettive e conclusioni sull'applicabilità di esche ormonali basate sul GIH

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 spiegare la sua attività biologica. 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 in corso 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.

DEVELOPMENT OF METHODS FOR THE CONTAINMENT AND THE CAPTURE OF *P. CLARKII*

– F. Piazza¹, L. Aquiloni², C. Manfrin¹, S. Simi³, M. Duse Masin⁴, F. Florian¹, L. Marson¹, L. Peruzza¹, M. Borgogna¹, S. Paoletti¹, L. Bonzi¹, F. Scapini⁴, P. Faraoni³, M. Balzi³, P. Edomi¹, P. G. Giulianini¹ –

¹ Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste, via L. Giorgeri, 5 (Edificio Q) • I - 34127 Trieste
email: giuliani@units.it

² Itinera C.E.R.T.A. srl, via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

³ Dipartimento di scienze biomediche sperimentali e cliniche, Università degli Studi di Firenze (Italy)

⁴ Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Firenze (Italy)

1. STERILE MALE RELEASE TECHNIQUE - SMRT

This population control technique involves releasing sterile, but sexually active, males into the wild. These specimens are able to compete with untreated males for mating and display behaviour typical of wild crayfish.

Already used successfully since the 1950s to control invasive insects (Knipling 1960; Curtis 1985), this technique also has high application potential for the management of invasive populations of decapod crustaceans. SMRT is safe for both the environment, since it acts only on the target species without altering the balance of biomes present, and human beings. It also meets all the requirements indicated in literature for an optimum control technique, including ethical aspects, and is widely acceptable to the public at large (Holdich et al., 1999; Lodge et al., 2006). Also noteworthy is that its use is compatible with other control techniques, is not particularly costly and becomes effective relatively quickly. In addition, unlike traditional control techniques like intensive trapping, the effectiveness of SMRT increases when the population density is low, since for a given number of sterile males released their probability of mating with the females grows as the size of the population decreases. It is therefore at present the only technique applicable in the small populations typical of the early stages of colonization in a new environment.

CURRENT KNOWLEDGE OF SMRT FOR CONTROLLING *PROCAMBARUS CLARKII*

The possibility of applying this technique to the management of invasive crayfish has recently been explored using *Procambarus clarkii* as the species to investigate. Ionizing radiation is the most effective way of inducing sterility in adult males of this species while at the same time guaranteeing environmental safety requirements. Starting in 2005, the Florentine unit has conducted a series of investi-

gations to set up protocols for sterilization and the assessment of histological and behavioural damage, and also to be able to compare the effects of using different doses of radiation. In 2009, using a radiation dosage of 20Gy, were produced adult male *P. clarkii* specimens with permanent sterility (meaning the gonads are unable to “repair themselves” in the following reproductive season) and fertility reduced by 43%, without determining significant alterations in sexual behaviour (Aquiloni et al., 2009). With this study, after 4 years of research, effective protocols were elaborated for the treatment and assessment of dose-dependent damage. Behavioural studies on female sexual choice also demonstrated a preference for large males (Aquiloni & Gherardi 2008, a,b), dominant (Aquiloni et al., 2008), therefore indicating the morphological requisites of males to undergo radiation treatment in order to foster their selection by females and thus increase the probabilities for success of SMRT. More recently, the release of males into the wild with these characteristics, treated with 20Gy, has determined a significant reduction in the young population the following season (Cecchinelli et al., 2010), demonstrating the great potential of this technique in the control of invasive crayfish.

AIMS WITHIN THE PROJECT RARITY FOR THE IMPLEMENTATION OF SMRT

Since a female that mates with a sterile male will lay eggs destined to degenerate, the reproductive success of a population will be lower the greater the probability is of a female in the wild choosing a sterile male as partner, and the more sterile he is. Therefore, to implement the technique, investigations were carried out within RARITY both (1) to assess the extent to which the female preference for a large, dominant male (already demonstrated with binary choice experiments, Aquiloni & Gherardi, 2008 a,b; Aquiloni et al., 2008) was also expressed in a social context closer to the natural situation and (2) to identify the most effective treatment

dosage, meaning the dosage that will guarantee the highest male sterility rate without producing significant behavioural alterations.

PREPARATORY INVESTIGATIONS FOR THE APPLICATION OF SMRT IN THE WILD

Reproductive behaviour in a social context

In a social context factors other than male size, and linked to the interaction between individuals, may influence female choice. It is therefore strategic, before implementing SMRT, to assess possible alterations to this choice in a context that is as close as possible to a natural one. Ten groups of a balanced sex ratio, with 18 individuals of three size classes, were observed interacting during a reproductive period, in circular arenas with a population density comparable to that in the wild (20 individuals/ m², Gherardi et al., 1999). All behaviour and interaction was recorded for 1 hour and then visualized using NetDraw 2.123 software (Borgatti, 2002). The analyses show that 44% of the behaviour observed in the social context is aggressive (threatening displays, touching, pushing, hitting and blocking), 31% is evasive and only 21% is sexual action (mounting attempts, falling off, blocking the female, copulation and pseudo-copulation), of which copulation is a rare event. Disturbing copulation (3%), and guarding heterosexual couples is less frequent. Around 40% of females that copulate do so with at least two different males while only 3% of males manage to copulate with two females. In general, pairings by size are evident in every kind of interaction, but the females and males that copulate most frequently belong to the medium-to-large size class (CL>44.74 mm) (Fig. 76).

The dynamic and duration of interactions varies considerably between the networks observed (GLM, F=12.561, df=9, P<0.0001), but size is evidently an important characteristic in winning over a sexual partner: the larger males interact more and manage to mate with the larger females (which are able to produce more eggs/fry). In addition these males are dominant in interactions for access to or defence of their partner and also in actions of copulation disturbance.

Optimum radiation dosage

Further investigations were carried out to quantify the level of sterility achieved and the possible behavioural alterations induced in male *Procambarus clarkii* by increasing dosages, following protocols already developed by Aquiloni et al (2009), to identify the dosage able to induce the highest sterility level without altering reproductive behaviour. The experimental animals (about 300 including males and females) were caught before the start of the reproductive season. Such forethought offers the dual advantage of radiating the animals' gonads when they are most radiosensitive (with the cells in meiosis for the production of sperm

to use in the imminent reproductive season) and of collecting individuals that are unlikely to have mated before their behaviour is observed. After marking, the animals of both sexes were isolated in individual aquariums (26 x 16 cm; water depth 5 cm) to eliminate previous social experience before observing their behaviour (Hemsworth et al., 2007). The males which were to undergo radiation treatment were subdivided into 4 experimental groups of 30 individuals each, corresponding to the three radiation dosages chosen for the investigation (20-40-60-Gy), and the control group. Radiation was undertaken in the department of radiology at Careggi hospital (Florence). By varying the exposure times it was possible to reach the required dosage. The control specimens were handled in the same way as the treated specimens in order to provoke the same stress levels in the 4 groups investigated and avoid distorting quantification of the radiation effects. The experimental animals were replaced in the isolation aquariums pending morphometric and cytological analyses (Trieste University), cytofluorimetric analyses (Florence University) and behaviour tests (Florence University).

DNA content in flow cytofluorometry

The application of *cytofluorometry* to the analysis of DNA content enables us to obtain parameters for the percentage of cells at the various stages of the cycle and in particular the proportion of cells in DNA synthesis. These are parameters that measure the duration of the cell cycle and its various stages and that measure the overall portion of proliferating cells, the speed of proliferation and the cell loss. This kind of analysis, used for the first time in decapods, enabled us to measure the proliferative activity of *P. clarkii* gonads and therefore to measure, to good approximation, the effect of radiation on sperm production. The Cell biology and Radiobiology Laboratory of the University of Florence, where the analysis was carried out, is equipped with a FACScan Becton Dickinson air-cooled flow cytofluorometer, with a 15mWatt argon laser. The cycle is analysed from a work-station linked to the cytofluorometer. It consists of an Apple Macintosh Power Mac G4 PC with a Mac OSX operating system. The distribution of cells at the various stages of the cell cycle is analyzed with ModFitTM (Verity Software House) software that enables suspensions to be assessed that contain more than two nondiploid clones. The instrument shows the distribution of cells at various stages of the cycle in a frequency distribution histogram, which is obtained according to the fluorescence emitted and therefore by the DNA content. The ploidy level of the population examined is calculated by comparison with a standard reference diploid (in our case hepato-pancreas tissue was used) as the ratio of the peak modal channel of fluorescence G_0/G_1 for the population under examination to that of the G_0/G_1 peak for the standard reference diploid, shown on the x-axis of the graph. The parameter obtained is the DNA Index (DI),

from which the ploidy level of the cell sample is assigned. The analyses carried out for every treatment and for the control group showed a total absence of proliferative tissue already at 20 Gy (Fig. 77). So these results confirm the possibility of using radiation to obtain sterile males, indicating that even at 20 Gy it is possible to achieve total destruction of proliferating cells.

Behaviour analysis and reproductive output of radiated males

None of the experimental groups showed alterations in movement, appetite or behaviour following treatment. 23 control pairs and 18, 22 and 21 pairs respectively for 20, 40 and 60 Gy were then observed for 30 minutes, recording the main behavioural parameters right up to copulation (Aquiloni et al., 2009). Subsequently, the males underwent histological and cytofluorometric analyses and the females remained in the aquarium until the eggs hatched. The number of fry born to each couple was used to quantify the reproductive capacity of the various experimental groups. Over 80% of the males for each treatment were able to copulate with the female assigned to them, in just the same way as the control males, and the duration of copulation was similar in all the experimental groups (F=0.9445, df=35.83, P=0.4294), although in the 60 group a slight – but not significant – decrease was noted. The radiation determined a significant reduction in births for all treatments, which increased with larger doses: 50% fewer births at 20Gy, 57% fewer at 40Gy, 67% fewer at 60 Gy (Fig. 78).

Cytological and morphometric analysis of testicular damage

Irradiated crayfish were sacrificed after 10 and 30 days after the irradiation to assess the damage at histological level. The testes were dissected, fixed, dehydrated and embedded in epoxy resin. Semithin sections were stained with toluidine blue and observed with an Olympus BX50 microscope. For the ultrastructural analysis the sections were counterstained with lead citrate and uranyl acetate and observed with a microscope Philips TEM 208. For scanning electron microscopy, the samples were dehydrated in a graded ethanol series, sputter coated and examined with a Leica Stereoscan 430i. The mature testis has two cephalic lobes and one posterior lobe located dorsal to the midgut. Lobes are connected through the fusion of their stalks from which emerge the paired *vasa deferentia* (Word and Hobbs, 1958). The right *vas deferens* is more developed than the left one, which appears thinner and atrophic. Each lobe has an acinar structure and resembles a bunch of grapes, where berries are its acini and the stalk corresponds to its protubules (distal) and collecting tubules (proximal) (Fig. 79). The scanning electron microscopy (SEM) analysis showed that the testes of animals irradiated at 3 doses were smaller than those of the control group. In addition, the medial-

sagittal fractures of testicular lobes showed a loss of the acinar organization. In the control group acini were more distinguishable and bigger than those present in the testicular lobes of irradiated animals; in fact, the latter were compact and infused due to the necrosis induced by radiation (Fig. 80). For each group (control animals, of 20 Gy irradiated animals after 10 days and of 20 Gy, 40 Gy and 60 Gy irradiated animals after 30 days) major and minor diameters of 250 acini from 5 different testicles were measured. Subsequently, the average of two diameters was calculated to perform non-parametric statistics. The statistical analysis using Kruskal-Wallis test showed highly significant differences between control and irradiated groups (Kruskal-Wallis, p-value < 2.2e-16). In particular, pairwise comparisons show that testicular acini of animals irradiated with 20 Gy after 10 days (average diameter of $100.9 \pm 2.6 \mu\text{m}$) are significantly smaller than those of the control animals (average diameter of $135.9 \pm 4.6 \mu\text{m}$) and after 30 days, at all doses (mean diameters: 20 Gy $53.2 \pm 1.5 \mu\text{m}$, 40 Gy $49.9 \pm 1.4 \mu\text{m}$, 60 Gy $52.0 \pm 1.3 \mu\text{m}$), the acini are significantly smaller than those of animals irradiated by 10 days. There is, however, no significant difference among groups of animals irradiated after 30 days (Fig. 81).

In order to further investigate damages at spermatogenesis level through light and electron microscopy, semithin sections of testicular lobes have been prepared. A sagittal section of a lobe of unirradiated animal presents a gradual maturation of acini from distal germinal zone (ZG), with a progressive increase in the diameter moving towards the proximal region. This area revealed a testicular pedicle formed by a group of collecting tubules/ducts (CT), into which mature acini release the newly formed sperm (Fig. 82).

At higher magnifications all stages of spermatogenesis which are illustrated in Fig. 83 (left plate) can be observed as already described in the literature for other decapods (Erkan et al., 2009a; Erkan et al., 2009b; Rotllant et al., 2012; Word and Hobbs, 1958). Acini were delimited by basal lamina and presented a layer of supporting cells (Sertoli cells) and germinal cells at various maturation stages inside: primary spermatocytes (A and B), secondary spermatocytes (C), early and mature spermatids (D and E) and spermatozoa (F) (Fig. 83, left plate).

Testicular acini of animals irradiated by 20 Gy, after ten days, did not show the gradient of maturation — as control animals did — and presented highly vacuolated supporting cells with degenerative signs. Interestingly, the apoptotic supporting cells are not limited to fully matured acini but they are present at all acinar stages (Fig. 83 A, B and C, right plate). The acini show germ cells with condensed chromatin, binucleated cells and cells showing anomalous meiotic division with incomplete chromosomes segregation (Fig. 83 D, E and F, right plate). After 30 days of irradiation, at all doses, necrosis of germ cells and of support is widespread throughout the testicular lobe, thus making it impossible to

see the gradient of development stages of spermatogenesis. It is no longer possible to appreciate the maturation of spermatogenesis because the acini contain only cells with degenerative apoptotic features such as cytoplasmic condensation, nuclear indentation with budding, chromatin condensation, fragmented pyknotic nuclei and apoptotic bodies. The ultrastructural analysis showed a highly convoluted basal lamina around the residual acini, index of the coarctation this functional unit of the spermatogenesis as a result of cell death in it. Inside the acini are present only a few nuclei of viable support cells presenting an highly vacuolated cytoplasm with phagosomes containing apoptotic bodies derived from germ cells and from other died supporting cells as a result of irradiation (Fig. 84).

Prospects and conclusions for the applicability of SMRT

From the analyses of reproduction output and histological damage to the gonads it is evident that reproductive capacity is already jeopardised at 20Gy with no significant increase at larger doses. The behavioural analyses show the possibility of increasing radiation dosage for field application up to 40 Gy (i.e. up to double the dosage applied previously on natural populations; Cecchinelli et al., 2010), without running the risk of altering behaviour. In comparison with data from Aquiloni et al. (2009), in which treatments of 20Gy determined a 43% reduction in births, the same treatment produced a greater effect on the gonads, achieving 50% sterility. Thus at the same dosage there is a wide variability in the result of radiation, to which numerous other environmental and individual factors may concur, above all, gonad maturity. Therefore, rather than using larger treatment dosages, it would be advisable to treat animals when their gonads are in the early stages of spermatogenesis (spermatocytes and spermatogonia), a phase that must be identified case by case because it depends on the environmental context of the target population.

Although the sterility level induced by a given dosage may have a certain range of variability, today SMRT constitutes the least demanding invasive crayfish control technique in terms of cost and management: sterilization and release of treated males can take place on the same day with, at most, a yearly frequency and from an economic point of view, it costs decidedly less than intensive trapping.

2. PHEROMONAL BAITS

The pheromones are very small molecules (Hardege et al., 2002; Kamio et al., 2002; Zhang et al., 2010) present in specific biological fluids. They take part in all the major organisms function: reproduction, sex and species recognition, lure of mature individuals, synchronization of reproduction (Atema and Voigt, 1995; Belanger and Moore, 2006; bushman and Atema, 1994, 1997; Belanger and Corkum, 2007; Dunham

and Oh, 1992; Stebbing et al., 2003), acceleration of embryonic growth and differentiation, parental care, detection of warning signs and predators, group protection (Hazlett 1990, 1994; Keller and Moore, 1999, Schneider and Moore, 2000; Willman et al., 1994), territory's boundaries identification, social structure determination (Bergman et al., 2003, Schneider et al., 2001), food detection and spatial orientation (Kraus-Epley and Moore, 2002). A special kind of pheromone called "sexual pheromone", is used by sexually mature females to attract males (Stebbing et al., 2003). The *P. clarkii* males stimulated by these substances, even without female, show reproductive behavioral patterns (Gleeson et al., 1987). These substances are produced in the Rosetta's glands associated with the urinary bladder and released with the urine through 2 nephropores at the base of the second antennula (Fig. 85) (Ryan, 1966; Ameyaw-Akumfi and Hazlett, 1975; Gleeson, 1980, 1982; Seifert, 1982; Tierney et al., 1984; Atema, 1986; Schneider and Moore, 2000; Hardege et al., 2002; Kamio et al., 2002; Stebbing et al., 2003a; b). It has been observed that *P. clarkii* males are equally attracted both to sexually mature females and elements like sponges, stones and even other males treated with female urine (Ekerholm and Hallberg, 2005). The pheromonal baits have 2 specific advantages: they are highly species-specific and allow to catch selectively young males with several breeding seasons still ahead (Stebbing et al., 2003; Kites and Gherrardi, 2010). In addition, "the invasive population control methods should be acceptable from the social, cultural and ethical point of view; they should be efficient, non polluting, without effects on local flora and fauna, healthy a wellness of human, pets and crops" (Stebbing et al., 2003). The species-specific pheromones baits would respect all this points. Moreover, this methods should dramatically reduce the effort for the invasive species containment and the management costs, nowadays very high.

Development of a phage display library

It has used a technique called library in phage-display (Fig. 86) to isolate, produce and characterize the attractiveness molecules that are produced and released by sexually mature females of *P. clarkii*. To create the library was extracted total RNA from tissues (rosetta glands associated with the green gland) dissected from females of *P. clarkii* in the reproductive period (tested with behavioral experiments by the University of Florence).

The messenger RNA was heat fragmented to obtain fragments encoding for small peptides (250-500 bp). This fragments were reverse transcribed, amplified and then cloned in accordance with gateway system. It was obtained a library with a 1.6×10^7 clones. The library quality was assessed by sequencing of random clones and we decided to start with the library selections. The selection were conducted on antennules, the seat where there are receptors for sexual pheromones in *P. clarkii* males, in particular when males are in

reproductive phase with morphotype F1 stage E. In crustaceans decapods antennules are the olfactory organ that plays a key role in food searching, mating behavior and social interactions. The antennula bifida is composed of a medial and a lateral flagellum (Monteclaro et al., 2010). The lateral flagellum, that brings chemoreceptors, is used for food searching (Laverack, 1988; Atema 1995; Giri and Dunham, 1999; Steullet et al., 2001; Steullet et al., 2002), for the detection of sexual pheromones (Ameyaw -akumfi and Hazlett, 1975; Gleeson, 1982; Kamio et al., 2005) and molecules for social communication, it mediates the odor perception (Giri and Dunham, 1999) and the sex discrimination (Ameyaw-akumfi and Hazlett, 1975, Dunham and Oh, 1992). For each selection were used 3 males, anesthetized in ice. From each animal was taken the right antennula, cutting at the base. The antennule thus obtained were included in a immunotube and fixed to its base with paraffin (Fig. 87). The library obtained is a collection of millions of phages (viruses that infect bacteria), each of which expresses a different peptide (putative pheromone). Phages can be selected through their specific binding to receptors on the antennules. At the end of the selection, the library is composed by a fraction of phage that bind to the receptors. Were set up 24 selections of which 22 of antennule, 1 of pereopod and 1 of the antenna, the latter considered as negative controls. The selected libraries that were collected and used for the production of specific phages that were then quantified and lyophilized. In collaboration with the University of Florence the behavioral assays were set up to assess the attractiveness of the pool of phage by males of *P. clarkii* in receptive period.

Bioassay to select library expressions in phase-display

The bioassay consisted of behavioural observations of 25 sexually reproductive males in two successive phases: (1) a control phase in which 20 mL of physiological solution was released into the water on the opposite side of the aquarium from the occupied burrow, using a sterile syringe, and (2) an experimental phase in which 20 mL of treatment solution (physiological with one of the 24 phage pools) was administered in the same way as in the control phase. Behaviour was observed for three minutes in each of the phases (sufficient time for the crayfish to display any alterations in behaviour in response to the stimulus; see Acquistapace et al., 2002) starting with the first reaction of the animal tested. The time elapsing between solution release and the first reaction of the animal was recorded as latency time. Subsequently, the difference was calculated between the duration of the parameters recorded for the experimental phase and those of the control one and the net time obtained was analysed through appropriate statistical tests. The average latency time was 245 seconds (ranging from 120 to 475), independently of the phage pool administered (H: 22.98, P=0.4). The administration of the solution gener-

ally determined an overall increase in locomotion, but without significant differences from the control group except for pool L where there was a notable escalation (Fig. 88a). As for locomotion, antennae movement also increased significantly only after the administration of pool L (Fig. 88b). No apathetic or anorexic behavioural alteration was observed in the entire duration of the tests, neither were there deaths among the experimental animals. When the animals were near the stimulus release zone, they moved their antennae mainly on the surface of the water, tracing wide circular areas and beating their antennae rhythmically. This movement was often accompanied by the animal raising itself along the wall of the aquarium and by rapid movement of its maxillipeds and chelipeds, pushing water towards their mouths. These actions were carried out in a stereotyped fashion and appeared frequently only in certain treatments: in L in 77% of the cases (10 out of 13 reactive animals), in K in 50% of the cases (3 out of 6 reactive animals) and in F 40% of the cases (2 out of 5 reactive animals).

Preparation of pheromonal baits and field test

Given the results of the bioassay, it was decided to prepare baits with alginate and phage selection no. 9 (corresponding to the L pool in the Bioassay) to test their ability to attract in the field. Now is necessary to incorporate the attractiveness molecules, that have been found, in a gel matrix which allows a gradual release for several hours in water in order to maximize the catches. It was decided to use a matrix of alginate for its particular property of gelling in the presence of calcium chloride (Smidsrød and Skjåk-braek, 1990a). The alginate is a very versatile substance for the immobilization of all the biologically active materials, such as proteins, nucleic acids, cells and other, allowing protection and controlled release (Smidsrød and Skjåk-braek, 1990b). In collaboration with the ETP have been set up 2 trapping tests at a small stream (Villutta, Pordenone) with 30 traps, placed at a distance of 10 m from each other in the direction of the current. 10 without bait, the next 10 with pheromonal baits and the last 10 with the bait used for monitoring (box with cat food). The first test showed that the traps with pheromonal bait have enabled the capture of 20 specimens of *P. clarkii* with a male / female ratio of 3/1, but the low number of animals captured (62 in total) has prevented statistical analysis of the data. In the second experiment, the number of animals caught in the 30 traps was even lower (38 in total).

Prospects and conclusions for the applicability of sexual pheromones

The potential of species-specific baits for the capture of mature males in the breeding season are twofold: minimal impact on the local flora/fauna exclusively due to the disturbance of the placement of traps and the management of intensive trapping much easier because it is not required

the sorting of not-target species present in the trap that is of fundamental importance with food baits. The analyses and behaviour observations showed that pool L was the only one capable of increasing both animal locomotion and antennae movements and, along with pools K and F, of producing stereotypical behaviour near the stimulus release source. However, these putative pheromone substances seem mainly to spread on the water surface: on average it takes 4-5 minutes in an aquarium of 5.5 litres of water for the animal to perceive something on the surface, while part of the chemical stimulus remains concentrated near the release zone becoming attached to the tank walls. This chemical behaviour seems to be typical of hydrophobic molecules and from an eco-evolutionary point of view it could function as a useful contact pheromone for short distance sex recognition between members of the same species but it is non applicable as a long distance attraction. Further information is necessary to assess the applicability of this substance for the control of natural populations, but the technique here used to identify these molecules represents a significant turning point in the research of pheromones.

3. HORMONAL BAITS CONTAINING THE GONAD INHIBITING HORMONE

By using the cost savings obtained from the two previous techniques, we worked on the development of a new method (not foreseen in the initial project) which possess all the requirements to become an innovative method for eradicating the non-indigenous crayfish species. Such technique would permit the control of the sexual maturity of decapods through the use of a specific hormone.

The main negative modulator that affects the final gonads maturation, is the Gonad Inhibiting Hormone (GIH), both in females and males, which acts even at low concentrations (Giulianini and Edomi, 2006). Recent papers demonstrated how peptides may be conveyed through the oral delivery when sheltered with suitable protections. Starting from these findings we developed baits containing the GIH which once released, during the reproductive season, may decrease the fertility of the red swamp crayfish populations.

The Gonad Inhibiting Hormone

To date, the GIH has been characterized in the American lobster (*Homarus americanus*) (De Kleijn et al., 1994), in the European lobster (*Homarus gammarus*) (Ollivaux et al., 2006), in the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*) (Edomi et al., 2002), and in the giant tiger prawn (*Penaeus monodon*) (Treerattrakool et al., 2008). In order to characterize the GIH of *P. clarkii* we sequenced the transcriptome of the eyestalk, site of production of such neurohormone in decapods. Out of 87 millions of reads, only two codified for por-

tions of the GIH. This data confirmed that in animals with gonads in a quiescent state the GIH expression is low and despite this made difficult the GIH full-length characterization, it represented an element in support to the fact that the GIH hormone works at a very low concentrations. The use of such neurohormone, on a large scale, would thus not require high amounts of synthetic peptide and this would restrain the costs of production of the baits. In order to complete the full-length of the transcripts we applied specific techniques that permitted the reconstruction of the missing part of the nucleotide sequence. In Fig. 89 is shown the multiple alignment of the translated protein sequences of the known GIHs along with the one characterized in *P. clarkii*. The chemical synthesis in solid-phase of the GIH is ongoing, with the aim of testing its biological activity by oral administration.

Demonstration of the gonad-inhibiting hormone role by means of RNA interference

The method to silence a target gene is named RNA interference (RNAi) and it has revolutionised the recently applied functional assays (Dorsett e Tuschii, 2004) also on decapods (Ventura et al., 2012; Shechter et al., 2008; Meja-Ruiz et al., 2011; Pamuru et al., 2012). This technique is based on a mechanism present in all the living organisms, in which the gene expression is regulated or suppressed by the activity of a specific complex named RNA-induced silencing complex (RISC). This multiprotein complex is able to bind a RNA-strand (named guide-strand) and searching, within the cell, for the complementary strand (named passenger strand) which is further degraded. In order to confirm the inhibiting role of the GIH on gonads of *P. clarkii* we silenced this hormone by injecting double-strand RNA (dsRNA) codifying a portion of the GIH. This method allows the *in vivo* observation of the knocking-down of a specific transcript, within a specific time span, without the need of sacrifice the specimen and reactivating the existing situation before the dsRNA injection. All the while it is possible to evaluate also the gene expression of molecules directly- or indirectly- associated to the GIH, with the aim of studying molecular patterns involved in the regulation and in the activity of such neurohormone. We treated *P. clarkii* specimens in a 14 days-lasting experiment with dsGIH-RNA injection every two days. The experimental groups were formed of: control group (S) injected with crustacean saline solution compatible with the haemolymph osmolarity of crayfish, a second group bilaterally eyestalk-ablated (ESA) which permitted to observe the effects of the complete depletion of the endogenous GIH source and a third group treated with 20 µg of dsGIH (RNAi). In addition, tens individuals were sacrificed at the beginning of the experiment to evaluate the initial gonads maturity (T₀). At the end of the experiment we analysed the Gonad-Somatic-Index value (GSI) and the Hepato-Somatic-Index value (HSI) the gonad/hepatopan-

creas mass as a proportion of the total body mass. After the treatment animals belonging to the RNAi group had an average GSI doubled in respect to both the S and ESA groups (Fig. 90). Despite the statistical analysis did not point out significant GSI differences among groups, RNAi had higher GSI values (1/3rd animals GSI>1.25) with a tendency to the significance in comparison to the GSI from S group (p=0.10). Through the use of the quantitative Real-Time PCR we quantified the expression level of vitellogenins of *P. clarkii*. These proteins are produced in the hepatopancreas and they reach ovary by means of haemolymphatic circulation. They represent the egg yolk precursors and are produced when ovaries become active; for this reason the expression of vitellogenins has been considered as a marker of the ovary state following dsGIH-RNA injection. In Fig. 91 it is possible to observe a decrease, in ovary, of the vitellogenin expression within the RNAi group in respect to the ESA group. On the contrary, in the hepatopancreas the situation is reverse. This means that the GIH silencing plays an inhibitory role on the esogenous vitellogenesis by influencing its synthesis in the hepatopancreas: the GIH interference triggers an increase of vitellogenin expression in comparison to both S and ESA groups. These findings confirm the inhibitory role of the GIH on the gonad maturity in *P. clarkii*.

Matrices of gonad-inhibiting hormone for oral delivery

In order to deliver the gonad-inhibiting hormone (GIH) orally, we decided to use chitosan and alginate because they are not toxic and are biodegradable (Aspden et al., 1997; Rao and Sharma, 1997; Onishi and Machida, 1999). Chitosan is a polysaccharide that can be found in the exoskeleton of insects and crustaceans. This substance has particular chemical properties that allow its use in many fields such as the food industry, cosmetics, textile industry, pharmaceutical research aimed at developing beads and nanoparticles for drug delivery, i.e., the controlled release of drugs, and biomedical materials science for the development of artificial skin and wound healing bandages (Dodane and Vilivalam, 1998). Alginate is a polysaccharide extracted from brown seaweeds (eg. *Laminaria hyperborea* and *Ascophyllum nodosum*) that are found in the shallow waters of the temperate zones. We decided to use alginate for its particular gelling property (Smidsrød and Skjåk-Braek, 1990) in the presence of calcium chloride (salt); therefore, when “dropped” through a syringe, it tends to create spherical structures. The system of encapsulation with alginate-chitosan beads has already been successfully used in fish and Penaeidae to deliver antigens and DNA orally (Romalde et al., 2004; Rajeshkumar et al., 2009; Chotigeat, 2013). The system of oral delivery was tested using the crustacean hyperglycemic hormone (CHH), instead of the GIH, because the bioassay is extremely simple, as it only requires to identify an increase in hemolymph glycemia for assessing its absorption

Development of baits to deliver GIHs

In order to make alginate-chitosan beads with hormones more attractive, they were mixed with different bait substances. We decided to use the homogenized feed because it is a commercial product readily available and also facilitates the sinking of baits, which is a very important aspect as crayfish only feed on the river bottom. As crayfish fragment the beads to eat them, we created microbeads that could be entirely swallowed, thus avoiding a further loss of peptides in the water. Microbeads were prepared using an electrostatic generator of beads (Strand et al., 2002). Microbeads were placed in a gelling solution and agitated for ten minutes, and then washed with deionized water. Subsequently, beads were gathered in groups (about 30 microbeads); these groups were in turn included in a new matrix of alginate and homogenized feed: this second matrix, obtained through *in situ* gelification, creates a capsule which further protects hormones. Thanks to this structure, the alginate matrix can pass through the stomach and finally melt in the midgut, where the incorporated substances are released. The final structure of beads was characterized by an outer capsule which included a lot of microbeads containing hormones (Fig. 92).

Experiments to test the functionality of the oral delivery of peptide hormones

Experiments were conducted on males of *P. clarkii* captured in the river Brancoletto (Lido di Staranzano, Friuli Venezia Giulia) using traps and acclimated for one week. To test the functionality of the beads it was decided to administer the crustacean hyperglycemic hormone (CHH), which belongs to the same family of GIH. This hormone was chose as the bioassay for determining its biological activity is faster and standardized with respect to that of GIH. In detail, in order to assess the presence of bioactive amounts of this hormone in the hemolymph is sufficient to measure the blood glucose value, which increases due to its hyperglycemic function. Experiments regarded ten crayfish, each without bilateral peduncles (to eliminate the endogenous source of CHH). They were divided into three groups. The first group consisted of 4 animals, which were administered 3 baits each containing 30 µg of synthetic CHH. The second group was given 3 baits without hormone per animal, and the last two animals were injected the hormone to assess the functionality of the hormone synthesis. Considering the time of digestion for crayfish, it was decided to begin the hemolymph sampling after six hours: the following samples were taken every two hours until the twenty-second. At the 6th hour after oral delivery, the animals fed with hormonal baits had a blood sugar of 11.7±0.35 mg/dL, statistically higher than that of animals fed on baits without hormone (6.22±0.42 mg/dL) (Wilcoxon rank sum test, p-value = 0.02747). Therefore, this result demonstrated the effectiveness of the alginate-chitosan beads system in the

oral delivery of peptide hormones species-specific in decapod crustaceans (Fig. 93).

Perspectives and conclusions on the applicability of baits containing the gonad inhibiting hormone

The new autocidal method proposed to contain the number of *P. clarkii* has many advantages: the release of hormonal baits in the infested river before spawning season is simple to implement and does not require specialized personnel; the gonad inhibiting hormone is species-specific and should not affect the metabolism of non-target species; even if the oral delivery has a low efficiency, minimal circulating doses are sufficient to exert its biological activity. In short: 1- alginate/chitosan baits that allow the absorption of adequate quantities of bioactive peptide hormones sufficient to raise the blood glucose in treated animals have been developed; 2- the gonad inhibiting hormone of *P. clarkii* has been characterized and its role was confirmed by means of RNA interference; 3- the solid phase chemical synthesis of GIH is in progress. The synthesis of adequate amounts of the hormone will allow the validation of the technique in a population of *P. clarkii* during the breeding season.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

- 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. 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.
- 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. 2010. The use of sex pheromones for the control of invasive populations of the crayfish *Procambarus clarkii*: a field study. Hydrobiologia, 649:249-254.
- Aspden TJ, Mason JDT, Jones NS, Lowe J, Skaugrud Ø & Illum L. 1997. 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, 86:509-513.
- Atema J, Fay RR, Popper AN & Tavolga 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, Kozłowski CP, McIntyre JC, Huber R & Daws AG. 2003. Temporal dynamics and communication of winner-effects in the crayfish *Orconectes rusticus*. Behaviour, 140:805-825.
- Borgatti SP. 2002. NetDraw: graph visualization software. Harvard: Analytic Technologies.
- Breithaupt T, Lindstrom DP & Atema J. 1999. Urine release in freely moving catheterised lobsters (*Homarus americanus*) with reference to feeding and social activities. J Exp Biol, 202:837-844.
- Bushmann 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.
- Cecchinelli E, Aquiloni L, Orioli G & Gherardi F. 2010. L'uso della SMRT (*Sterile Male Release Technique*) e di Pyblast per il controllo del gambero invasivo *Procambarus clarkii* nel Consorzio della Bonifica Parmigiana Moglia-Secchia. Consorzio di Bonifica Parmigiana-Moglia-Secchia, Reggio Emilia.
- Chotigeat W. 2013. Activation of an immune response in *Litopenaeus vannamei* by oral immunization with phagocytosis activating protein (PAP) DNA.
- 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.
- Curtis CF. 1985. Genetic control of insect pests: growth industry or lead balloon? Biol J Linn Soc, 26: 359-374.
- De Kleijn DPV. 1994. Cloning and expression of mRNA encoding prepro-gonad-inhibiting hormone (GIH) in the lobster *Homarus americanus*. FEBS Letters, 353(3): 255-258.
- Dodane V & Vilivalam VD. 1998. Pharmaceutical applications of chitosan. Pharm Sci Technol Today, 1:246-253.
- Dorsett Y & Tuschl T. 2004. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. Nat Rev Drug Discov, 3(4): 318-329.
- Dunham DW & Oh JW. 1992. Chemical sex discrimination in the crayfish *Procambarus clarkii*: Role of antennules. J Chem Ecol, 18:2363-2372.
- Edomi P, Azzoni E, Mettullo R, Pandolfelli N, Ferrero EA & Giulianini PG. 2002. Gonad-inhibiting hormone of the Norway lobster (*Nephrops norvegicus*): cDNA cloning, expression, recombinant protein production, and immunolocalization. Gene, 284(1-2): 93-102.
- 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.
- Erkan M, Tunali Y & Sancar-Bas S. 2009a. Male reproductive system morphology and spermatophore formation in *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (Decapoda: Astacidae). J Crustacean Biol, 29: 42-50.
- Erkan M, Tunali Y, Balkis H e Oliveria E. 2009b. Morphology of testis and vas deferens in the xanthoid crab, *Eriphia verrucosa* (forsk., 1775) (Decapoda: Brachyura). J Crustacean Biol, 29: 458-465.
- Gherardi F, Baldaccini GN, Barbaresi, Ercolini, De Luise G, Mazzoni D & Mori M. 1999. The situation in Italy. In: Crayfish in Europe as Alien Species. How to Make the Best of a Bad Situation? Eds F Gherardi & DM Holdich, pp. 107-128. A.A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands.
- 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.
- Giulianini PG & Edomi P. 2006. 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, pp. 225-252.
- 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.
- Hemsworth R., Villareal W., Patullo B.W. & Macmillan D.L. 2007. Crustacean social behavioral changes in response to isolation. Biol Bull, 213: 187-195.
- 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.
- Knipling EF. 1960. Eradication of screw-worm fly. Sci Am, 203: 54-61.
- 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
- Lodge DM, Williams SL, MacIsaac H et al. 2006. Biological invasions: recommendations for U.S. policy and management. Ecological Applications, 16: 2035-2054.
- Mejía-Ruiz C, Vega-Peña S, Alvarez-Ruiz P & 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, 107(1): 65-68.
- 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.

- Ollivaux C, Vinh J, Soyez D & Toullec JY. 2006. Crustacean hyperglycemic and vitellogenesis-inhibiting hormones in the lobster *Homarus gammarus*: Implications for structural and functional evolution of a neuropeptide family. *FEBS Journal*, 273(10): 2151-2160.
- Onishi H & Machida Y. 1999. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*, 20:175-182.
- Pamuru RR, Rosen O, Manor R, Chung JS, Zmora N, Glazer L, Aflalo ED, Weil S, Tamone SL & Sagi A. 2012. Stimulation of molt by RNA interference of the molt-inhibiting hormone in the crayfish *Cherax quadricarinatus*. *General and comparative endocrinology*, 178 (2): 227-236.
- Rajeshkumar S, Venkatesan C, Sarathi M, Sarathbabu V, Thomas J, Anver Basha K & Sahul Hameed AS. 2009. Oral delivery of DNA construct using chitosan nanoparticles to protect the shrimp from white spot syndrome virus (WSSV). *Fish Shellfish Immunol*, 26:429-437.
- Rao SB & Sharma CP. 1997. Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *J Biomed Mater Res*, 34:21-28.
- Romalde JL, Luzardo-Alvarez A, Ravelo C, Toranzo AE & Blanco-Méndez J. 2004. Oral immunization using alginate microcapsules as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. *Aquaculture*, 236:119-129.
- Rotllant G, Chiva M, Durfort M & Ribes E. 2012. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Astacidea). *J Morphol*, 273: 572-585.
- 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.
- Shechter A, Glazer L, Cheled S, Mor E, Weil S, Berman A, Bentov S, Aflalo ED, Khalaila I & Sagi A. 2008. A gastrolith protein serving a dual role in the formation of an amorphous mineral containing extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci*, 105(20): 7129-7134.
- 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, Krützfeldt 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.
- Strand BL, Gåserød O, Kulseng B, Espevik T & Skjåk-Braek G. 2002. Alginate-polylysine-alginate microcapsules: effect of size reduction on capsule properties. *J Microencapsul*, 19:615-630.
- Tierney AJ, Thompson CS & Dunham DW. 1984. Site of Pheromone Reception in the Crayfish *Orconectes propinquus* (Decapoda, Cambaridae). *J Crustac Biol*, 4:554.
- Treerattrakool S, Panyim S, Chan SM, Withyachumnarnkul B & Udomkit A. 2008. Molecular characterization of gonad-inhibiting hormone of *Penaeus monodon* and elucidation of its inhibitory role in vitellogenin expression by RNA interference. *FEBS Journal*, 275(5): 970-980.
- Ventura T, Manor R, Aflalo ED, Weil S, Rosen O & Sagi A. 2012. Timing sexual differentiation: full functional sex reversal achieved through silencing of a single insulin-like gene in the prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Biol Reprod*, 86(3).
- 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.
- Word B & Hobbs H. 1958. Observations on the testis of the crayfish *Cambarus montanus acuminatus* Faxon. *Am Micros Soc*, 77: 435-450.
- 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.

L'ANALISI GENETICA DELLE POPOLAZIONI DI *A. PALLIPES* COMPLEX DEL FRIULI VENEZIA GIULIA

– V. Bertucci, C. Manfrin & A. Pallavicini –

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste,
via L. Giorgeri, 5 (Edificio Q) • I - 34127 Trieste
email: pallavic@units.it

INTRODUZIONE

Negli ultimi cinquant'anni la tassonomia del gambero di fiume è stata più volte rivisitata, proponendo vari criteri per la classificazione dei gruppi morfologicamente e geneticamente diversi. L'attuale posizione (Grandjean et al., 2000; 2002a, b,) basata sull'analisi delle subunità ribosomali 16S e supportata da studi morfologici (Bott, 1950; Karaman, 1962; Brodsky, 1983; Grandjean et al., 1998) e allozimatici (Santucci, et al., 1997), sostiene che *A. pallipes* sia un complesso di specie con una pronunciata struttura genetica a livello sia inter che intra-specifico. Il complesso è costituito da due specie geneticamente ben distinte: *A. pallipes* e *A. italicus*. Nel territorio italiano *A. pallipes* è confinato nelle regioni nord occidentali, mentre *A. italicus* è distribuito lungo l'intera penisola. Il taxon *A. italicus* appare costituito, a sua volta, da quattro sotto-specie, *A. i. italicus* nell'Appennino toscano-emiliano, *A. i. carsicus* nelle regioni nord-orientali, *A. i. carinthiacus* nelle regioni centrali e nord occidentali e *A. italicus meridionalis* nelle regioni centro-meridionali (Fratini et al., 2005). Poiché in una politica di conservazione della specie le entità sottospecifiche devono essere considerate come "unità gestionali" distinte, gli interventi di tutela e reintroduzione e/o ripopolamento non possono prescindere dalla tipizzazione genetica delle popolazioni coinvolte. Il progetto RARITY ha, quindi, previsto una serie di analisi genetiche in grado di fornire informazioni utili alla costituzione di stock di gamberi nativi adulti per la riproduzione di giovanili da allevare in cattività ai fini della successiva immissione in natura. È importante, infatti, poter disporre di riproduttori che contengano nel genoma la maggior parte della diversità genetica presente nelle popolazioni naturali, minimizzando nel contempo il rischio di inquinamento genetico nei siti di rilascio mediante l'introduzione di soggetti geneticamente non compatibili con quelli già presenti.

CAMPIONAMENTO E ANALISI GENETICHE

Allo scopo di caratterizzare le popolazioni dei principali bacini, sono stati raccolti campioni biologici (un pereiopode,

rimosso alla base tramite l'uso di forbici) immediatamente fissati in etanolo al 96%, dai soli individui maschi, per un numero massimo di 20 organismi per stazione. Si è scelto di campionare solamente individui maschi per evitare di creare eccessivo stress nelle femmine in periodo riproduttivo. Il prelievo per le analisi genetiche è stato effettuato durante l'ultimo giorno del monitoraggio di ogni stazione, per non alterare in alcun modo il comportamento dei gamberi durante la settimana di monitoraggio, in particolare per non alterare i dati del censimento con la tecnica marcatura/ricattura. Allo scopo di tipizzare geneticamente le popolazioni dei principali bacini idrici regionali sono stati raccolti campioni biologici da 440 individui provenienti da 56 stazioni (Fig. 94, Tab. 7), dei quali sono stati analizzati due geni del DNA mitocondriale: il gene che codifica la subunità ribosomiale minore 16S (16S rDNA) e il gene che codifica la subunità I dell'enzima citocromo c ossidasi (COI). Il 16SrDNA ha già trovato ampia applicazione in numerosi studi filogenetici a vari livelli gerarchici ed è stato applicato con successo alla definizione tassonomica del genere *Austropotamobius* (Grandjean & Souty-Grosset, 2000a, 2000b; Zaccara, 2004; Fratini et al., 2005). Il COI, per il suo maggior grado di polimorfismo, è attualmente molto utilizzato per indagare la struttura genetica e la filogeografia (distribuzione geografica delle linee evolutive) delle popolazioni animali, oltre ad essere universalmente utilizzato per il riconoscimento molecolare delle specie animali (DNA barcoding). Tali regioni di DNA, infatti, possono essere utilizzate come una sorta di carta d'identità genetica per l'identificazione di specie e sottospecie e risultano particolarmente utili nel caso in cui queste non siano facilmente distinguibili dal punto di vista morfologico, come accade nel gambero di fiume. I dataset ottenuti da entrambi i marcatori sono stati utilizzati per delineare una "mappatura genetica" delle popolazioni friulane, attraverso:

1. l'inquadramento sistematico delle popolazioni attraverso l'analisi filogenetica;
2. la stima dei livelli di variabilità genetica e differenziamento delle popolazioni;
3. l'identificazione di gruppi di popolazioni che meritino una gestione separata in quanto unità evolutivamente distinte (Evolutionarily Significant Units, ESU).



Fig. 94. Mappa delle stazioni con campionamento per le analisi genetiche.
Fig. 94. Sampling sites for genetic analysis

Successivamente sono stati analizzati 64 riproduttori presenti nell'impianto di Amaro e provenienti da 5 località (tab.1). Per evitare di stressare gli animali in fase riproduttiva con il taglio di un pereopode, abbiamo deciso di campionare le esuvie dei gamberi, raccolte nelle vasche durante il periodo di muta, poiché contengono una quantità di dna sufficiente per effettuare le analisi genetiche.

RISULTATI

Analisi filogenetiche delle popolazioni regionali

Le sequenze ottenute da entrambi i marcatori (419 sequenze della lunghezza di 426 paia di basi per il 16s, e 434 sequenze di 310 paia di basi per il COI) sono state utilizzate per la produzione degli alberi filogenetici che hanno permesso di inquadrare dal punto di vista sistematico le popolazioni gambericole regionali (Tab. 7). Per assegnare un posizionamento tassonomico agli individui campionati e facilitarne il confronto sono state utilizzate sequenze di *Austropotamobius pallipes* complex disponibili nelle banche dati (GenBank, EMBL), per entrambi i marcatori. In una prima fase le analisi sono state condotte su tutte le sequen-

ze ottenute; successivamente, per chiarezza grafica nell'esposizione dei risultati, sono stati individuati i rappresentanti dei differenti aplotipi (varianti genetiche) e le successive analisi sono state condotte sugli aplotipi.

Per la ricostruzione filogenetica del 16S sono stati utilizzati i 38 aplotipi in cui sono stati raggruppati gli individui campionati e 27 sequenze scaricate da Genbank, georeferenziate, comprendenti la maggior parte degli aplotipi finora descritti per le 4 sottospecie di *A. italicus*, ed alcune sequenze di *A. pallipes* propriamente detto e di *A. torrentium*. I 419 individui RARITY analizzati appartengono alla sottospecie *Austropotamobius italicus* che, sulla base dei nostri risultati ed a conferma degli studi precedenti, è nettamente separata da *A. pallipes*.

Abbiamo inoltre individuato la presenza di 2 sottospecie di *Austropotamobius italicus*: *A.i. carsicus* esclusivamente nel torrente Rosandra e *A.i.meridionalis* nelle restanti 55 località analizzate (Fig. 95). Uno studio genetico precedente (Fratini et al., 2005) aveva individuato la presenza di *A.i. carsicus* in FVG, in seguito ad un esiguo numero di campioni provenienti proprio dal torrente Rosandra: perciò si era data per scontata la presenza di questa sottospecie in tutta la regione, considerando anche la sua distribuzione nel vicino

codice code	località locality	Bacino Basin	N	N hap 16s	N hap COI	ESU	sottospecie subspecies
2	Liola	Cormor	5	3	2	1	<i>A.i. meridionalis</i>
5	Val Rosandra	Levantino	26	1	1	4	<i>A.i. carsicus</i>
8	Pradulin	Tagliamento	5	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
9	Palar	Tagliamento	26	1	3	6	<i>A.i. meridionalis</i>
13	Palude Sequals	Livenza	7	2	3	5	<i>A.i. meridionalis</i>
22	Cornino	Tagliamento	20	5	3	6	<i>A.i. meridionalis</i>
28	Bars 2	Tagliamento	5	1	1	6	<i>A.i. meridionalis</i>
47	Villaggio Orsi(Budrin)	Isonzo	4	1	1	6	<i>A.i. meridionalis</i>
49	Rieka Savogna	Isonzo	1	1	1	3	<i>A.i. meridionalis</i>
50	Seuza	Isonzo	7	2	2	3	<i>A.i. meridionalis</i>
51	Peternel	Isonzo	8	3	3	3	<i>A.i. meridionalis</i>
52	Judrio Malinsche	Isonzo	2	1	1	3	<i>A.i. meridionalis</i>
54	San Leonardo	Isonzo	2	1	1	3	<i>A.i. meridionalis</i>
56	Aborna Tarpezzo	Isonzo	10	3	3	3	<i>A.i. meridionalis</i>
58	Squarzulis	Isonzo	2	2	1	3	<i>A.i. meridionalis</i>
60	Mernicco	Isonzo	3	2	2	3	<i>A.i. meridionalis</i>
61	Canalutto	Isonzo	4	1	1	6	<i>A.i. meridionalis</i>
62	Prestento	Isonzo	1	1	1	3	<i>A.i. meridionalis</i>
64	Malinsciach	Isonzo	2	1	2	1	<i>A.i. meridionalis</i>
67	Rio Gorgons	Isonzo	5	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
68	Taipana	Isonzo	7	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
70	Salandri	Isonzo	4	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
71	Montenars	Tagliamento	2	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
72	Borgo Urana	Cormor	3	2	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
76	Racchiuso	Isonzo	2	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
78	Raschiacco	Isonzo	5	2	2	1	<i>A.i. meridionalis</i>
82	Groina	Isonzo	4	2	1	3	<i>A.i. meridionalis</i>
83	Piumizza	Isonzo	8	1	1	3	<i>A.i. meridionalis</i>
109	Paisa	Livenza	1	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
110	Acqua Molino	Livenza	1	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
112	Livenza Bus Dei Salt	Livenza	1	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
115	Colvera Jouf	Livenza	10	1	3	5	<i>A.i. meridionalis</i>
116	Colvera Raut	Livenza	1	1	1	5	<i>A.i. meridionalis</i>
118	Barcis Vecchia Diga	Livenza	5	2	2	1	<i>A.i. meridionalis</i>
120	Andreis	Livenza	7	3	5	1	<i>A.i. meridionalis</i>

codice code	località locality	Bacino Basin	N	N hap 16s	N hap COI	ESU	sottospecie subspecies
130	Comugna	Tagliamento	12	1	1	2	<i>A.i. meridionalis</i>
132	Campone	Livenza	21	1	1	5	<i>A.i. meridionalis</i>
134	Meduna Pradis	Livenza	8	3	3	5	<i>A.i. meridionalis</i>
135	Rio Gamberi	Livenza	17	4	3	5	<i>A.i. meridionalis</i>
136	Inglagna	Livenza	11	2	1	5	<i>A.i. meridionalis</i>
159	Povici	Tagliamento	3	2	1	7	<i>A.i. meridionalis</i>
160	Rio Nero	Tagliamento	3	2	1	7	<i>A.i. meridionalis</i>
189	Ambiesta	Tagliamento	1	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
203	Acqua Reale	Stella	5	2	1	6	<i>A.i. meridionalis</i>
208	Raveo	Tagliamento	11	1	2	1	<i>A.i. meridionalis</i>
210	Verzegnis	Tagliamento	11	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
211	Zamlin	Tagliamento	53	6	3	7	<i>A.i. meridionalis</i>
214	Rio Molat	Tagliamento	20	2	5	5	<i>A.i. meridionalis</i>
215	Morius	Tagliamento	9	1	2	2	<i>A.i. meridionalis</i>
216	Valcanda	Isonzo	5	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
218	Torre	Livenza	6	1	2	5	<i>A.i. meridionalis</i>
222	Pradielis	Isonzo	8	2	2	1	<i>A.i. meridionalis</i>
224	Tarcetta	Isonzo	9	1	2	1	<i>A.i. meridionalis</i>
226	Rio Mersino	Isonzo	8	2	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
227	Judrio Lipon	Isonzo	10	2	1	3	<i>A.i. meridionalis</i>
3	Prestento Bobon	Isonzo	3	1	1	1	<i>A.i. meridionalis</i>
				RIPRODUTTORI			
RIPR.	Inglagna	Livenza	12	4	2	5	<i>A.i. meridionalis</i>
RIPR.	rio gamberi	Livenza	11	3	1	5	<i>A.i. meridionalis</i>
RIPR.	Gorgons	Isonzo	13	4	2	1	<i>A.i. meridionalis</i>
RIPR.	Palar	Tagliamento	9	1	2	6	<i>A.i. meridionalis</i>
RIPR.	Grivò/Valcanda	Isonzo	19	3	3	1	<i>A.i. meridionalis</i>

Tab. 7. Tabella riassuntiva dei dati genetici per singola località campionata; sono riportati i codici delle stazioni e i rispettivi bacini idrici; N= numero di individui sequenziali; N hap: numero di aplotipi rilevati per ogni marcatore (16S e COI); ESU= Unità significativa dal punto di vista evolutivo; infine è indicata la sottospecie presente.

Tab. 7. Summary table of genetic data for each locality sampled. Station codes and river basins are reported; N = number of sequenced individuals; Hap N: number of haplotypes detected for each marker (16S and COI); ESU= Evolutionarily Significant Unit; finally, the subspecies present is indicated.

Veneto. In realtà la nomenclatura con queste sottodivisioni proposte nel 2005 dovrebbe essere rivisitata al momento che la sottospecie *A.i. meridionalis* mostra una distribuzione geografica ben più ampia di quanto precedentemente riportato.

Per la ricostruzione filogenetica della COI sono stati utilizzati i 36 aplotipi in cui sono stati raggruppati gli individui campionati e 36 sequenze scaricate da Genbank, rappresentative di tutti i gruppi di aplotipi finora noti, secondo la nomenclatura e la classificazione proposte da Trontelji (Trontelji

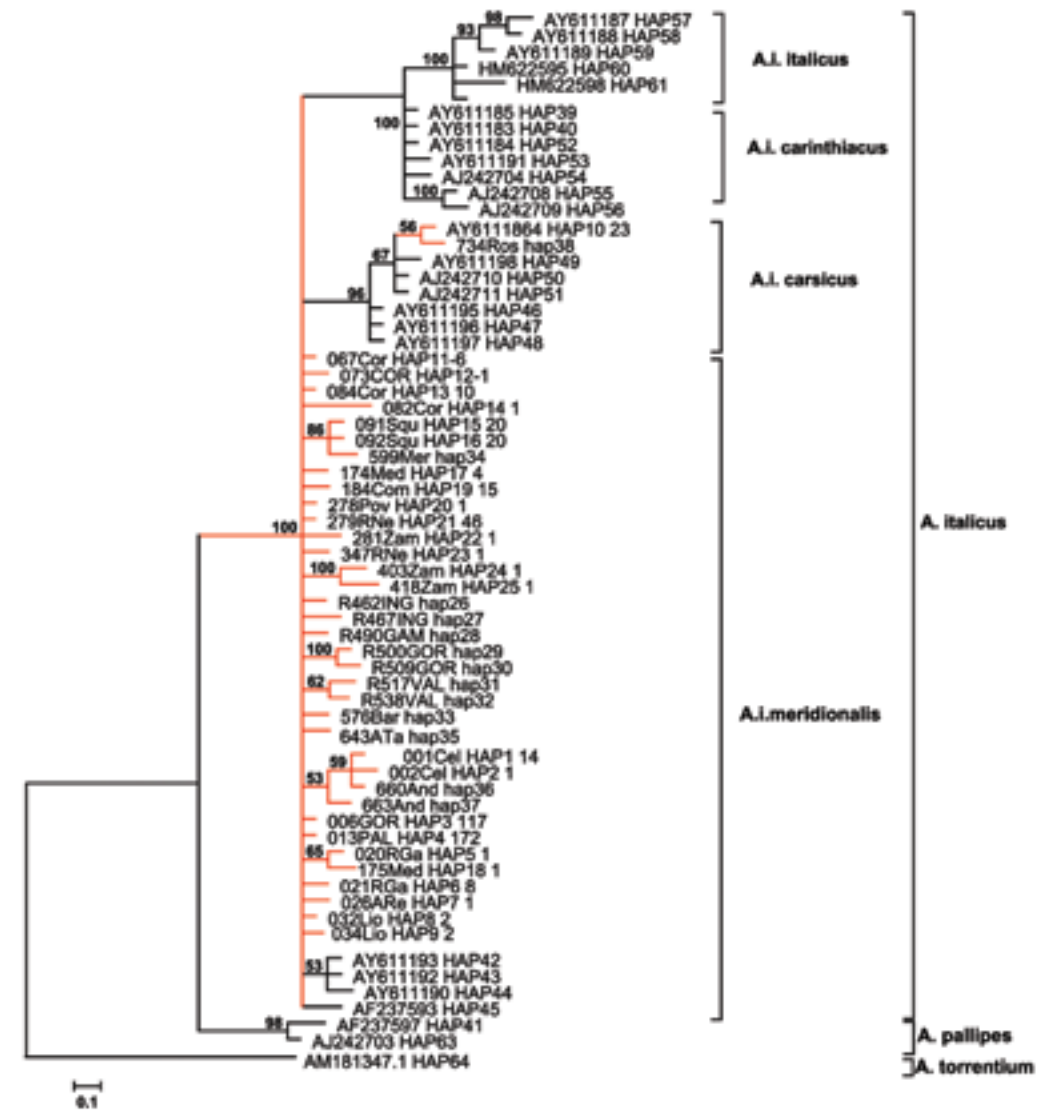


Fig. 95. Albero filogenetico 16S. Sopra i nodi sono indicati solo i valori di probabilità di una determinata topologia superiori al 50%. I rami in rosso rappresentano gli aplotipi rilevati nelle sequenze del progetto; il numero dopo l'aplotipo rappresenta il numero di individui analizzati che presentano quel determinato aplotipo.

Fig. 95. 16s phylogenetic tree. Numbers above nodes are probability values of a given topology greater than 50%. The red branches represent haplotypes found in this study; the number after the haplotype represents the number of individuals that share that particular haplotype.

et al., 2005). Secondo questa classificazione il gruppo Western Europe comprende la specie *A. pallipes pallipes* mentre i 5 restanti aplogruppi sembrano rappresentare la specie *A. italicus*, formando 3 cluster ben distinti nell'albero filogenetico. Si può notare che non c'è una corrispondenza totale sottospecie con i cladi individuati dall'analisi del 16S. Il primo clade è rappresentato dal gruppo NW Italy in cui sono compresi sia *A. i.italicus* che *A.i. carinthiacus*; il secondo è rappresentato dal gruppo Istra 1 in cui sono raggruppati gli *A.i. carsicus*; il terzo comprende i restanti 3 gruppi, SE Alps/W balkans, Istra 2 e Appennine, e dovrebbe corrispondere alla sottospecie *A.i. meridionalis*. I 434 esemplari analizzati in RARITY ricadono nei 2 gruppi di aplotipi: Istra 1 (solo i campioni provenienti dal torrente Rosandra, descritti come

A.i. carsicus con il 16S mtDNA) e SE Alps/W balkans (tutti gli altri campioni dalle restanti 55 località), descritti come *A.i. meridionalis* con il 16s mtDNA (Fig. 96).

Analisi genetiche per verificare presenza di A. torrentium

Sono stati analizzati i 59 esemplari campionati in 3 stazioni (Zamlin, Rio nero e Povici) con protocollo modificato, dove si voleva verificare la presenza della specie *A. torrentium*, specie altamente minacciata e ormai presente nel territorio italiano solo con alcune popolazioni relitte proprio in FVG e la cui presenza era stata segnalata in passato in queste località nel bacino settentrionale del Tagliamento e nello Slizza. Purtroppo le analisi filogenetiche classificano i campioni come *A. italicus* (sottospecie: *A.i. meridionalis*).

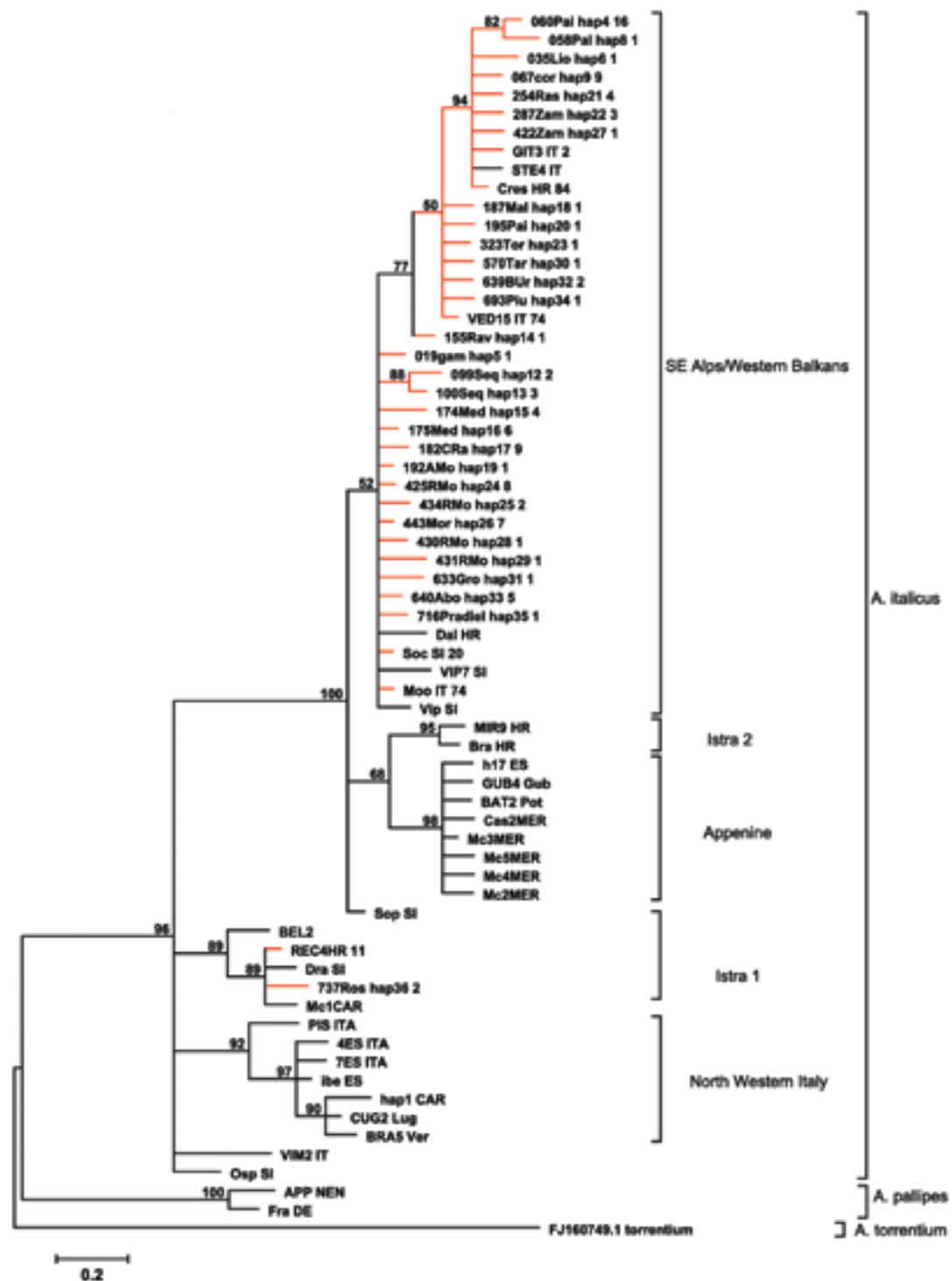


Fig. 96. Albero filogenetico COI. Sopra i nodi sono indicati solo i valori di bootstrap superiori al 50%. I rami in rosso rappresentano gli aplotipi rilevati nelle sequenze del progetto; il numero dopo l'aplotipo rappresenta il numero di individui che presenta quel determinato aplotipo.

Fig. 96. COI phylogenetic tree. Numbers above nodes are probability values of a given topology greater than 50%. The red branches represent haplotypes found in this study; the number after the haplotype represents the number of individuals that share that particular haplotype.

COI	N	S	H	Hp	Hr	Hd ± SD	π ± SD
Tagliamento	181	12	16	12	2,341	0,763 ± 0,028	0,0058 ± 0,0005
Livenza	96	11	11	8	1,65	0,595 ± 0,053	0,0049 ± 0,0005
Isonzo	124	12	14	9	2,145	0,754 ± 0,028	0,0108 ± 0,0004
Cormor	8	4	3	2	1,667	0,607 ± 0,164	0,0038 ± 0,0017
Rosandra	26	2	2	2	0,354	0,153 ± 0,092	0,0010 ± 0,0006
Stella	5	0	1	0	0	0	0,0000
TOT FVG	440	37	36			0,868 ± 0,008	0,0148 ± 0,0010

Tab. 8 Tabella riassuntiva degli indici di diversità genetica per il marcatore COI, per ogni bacino idrico e per l'intera regione. **N**= numero di individui; **S** = numero di siti polimorfici; **H** = numero di aplotipi; **Hp** = numero aplotipi privati; **Hr** = diversità aplotipica (normalizzata); **Hd**= diversità aplotipica; **π** = diversità nucleotidica; **SD** = deviazione standard.

Tab. 8. Summary table of COI genetic diversity indices for the separate river basins and for the whole region. **N** = number of individuals; **S** = number of polymorphic sites; **H** = number of haplotypes; **Hp** = number of private haplotypes; **Hr** = haplotype diversity (normalized); **Hd** = haplotype diversity; **π** = nucleotide diversity; **SD** = standard deviation.

Variabilità genetica e differenziamento delle popolazioni

La variabilità genetica rappresenta la base necessaria per l'adattamento delle specie ai futuri cambiamenti evolutivi ed i livelli di tale diversità nelle popolazioni possono fornire utili informazioni sullo stato di salute delle stesse e sulle condizioni ambientali del loro habitat; fattori di stress ambientale infatti portano tipicamente ad una riduzione della diversità genetica, attraverso la riduzione numerica della popolazione, con conseguente riduzione della fitness (spesso dovuto all'incrocio tra consanguinei, *inbreeding*) e aumento del rischio di estinzione.

Per stimare la variabilità genetica delle popolazioni è stato utilizzato il dataset del marcatore più idoneo, il COI, e sono stati calcolati alcuni indici di diversità, sia per l'intera regione che per i principali bacini idrici, riportati in Tab. 8: il numero di siti polimorfici (**S**), il numero di aplotipi (**Nh**), il numero di aplotipi privati (esclusivi di un corso d'acqua o bacino idrico), la diversità aplotipica (**h**) e quella nucleotidica (**π**). La diversità aplotipica rappresenta il numero ed abbondanza di aplotipi diversi presenti in una popolazione; mentre la diversità nucleotidica esprime il grado di diversità delle varianti genetiche osservate. Per poter confrontare tra loro campioni con numerosità diversa gli indici di diversità sono stati normalizzati attraverso curve di rarefazione.

La diversità aplotipica complessiva è piuttosto elevata, con i valori più elevati nel Tagliamento, seguito da Isonzo e Livenza, e infine Cormor e Rosandra. Inoltre, il numero di aplotipi privati è molto elevato rispetto al numero totale di aplotipi trovati nei diversi bacini idrici, evidenziando un notevole differenziamento tra i principali bacini regionali. La diversità nucleotidica è maggiore nell'Isonzo rispetto agli altri bacini, con il ramo orientale (fiume Natisone) ben differenziato rispetto al ramo occidentale (fiume Torre), suggerendo la

presenza di popolazioni antiche dal punto di vista evolutivo che hanno mantenuto nel tempo un notevole isolamento riproduttivo rispetto alle altre popolazioni dello stesso bacino. Nonostante gli indici di diversità genetica dei campioni regionali mostrino un elevato grado di variabilità genetica, sia per il grande numero di aplotipi campionati sia per la loro diversità intrinseca, bisogna capire come sia distribuita tale variabilità, e cioè se è dovuta alla variabilità all'interno delle popolazioni o al differenziamento genetico tra le popolazioni. L'analisi della struttura genetica delle popolazioni evidenzia un forte del differenziamento su scala geografica, sia tra popolazioni di bacini idrici diversi, sia tra popolazioni appartenenti allo stesso bacino idrico, indicando un significativo grado di isolamento e di frammentazione genetica delle popolazioni (Fig. 97).

Questo fenomeno è in parte da ascrivere alle caratteristiche eco-etologiche della specie che presenta un basso tasso di dispersione e quindi di flusso genico, ma anche alla frammentazione degli habitat come conseguenza dell'impatto antropico.

Nonostante la variabilità genetica complessiva sia risultata piuttosto elevata, le popolazioni gambericole regionali mostrano per lo più bassi livelli di diversità intra-popolazione.

Identificazione di unità evolutivamente distinte (Evolutionarily Significant Units, ESU)

Lo studio combinato delle due regioni del DNA mitocondriale, attraverso statistiche di tipo bayesiano, ha permesso di identificare 7 gruppi di popolazioni altamente differenziate dal punto di vista genetico e che rappresentano probabilmente linee evolutive peculiari del territorio o "unità evolutivamente significative" (ESU) da trattare come unità gestionali separate (Fig. 98).



Fig. 97. Risultato dell'analisi di struttura di popolazione. I numeri esprimono i valori percentuali in cui è suddivisa la variabilità genetica osservata. Il 54,52% è da attribuire a differenziazione tra bacini, il 37,13 a differenziazione tra popolazioni all'interno di un bacino, e l'8,36% a variabilità intra-popolazione.

Fig. 97. Population structure analysis results. Numbers indicate the percentage contribution of the 3 levels of variation to the observed genetic variability: 54,52% is attributable to differentiation between basins, 37,13% to the differentiation between populations within a basin, and 8.36% to the intra-population variability.

I cluster 2, 3, 4 e 7 mostrano un forte segnale di struttura geografica, cioè raggruppano al loro interno popolazioni provenienti da un solo bacino idrico e rappresentano delle potenziali unità di conservazione a sé, da gestire in maniera separata per preservare la loro diversità; in particolare il gruppo 4 include solo la popolazione del Rosandra, che già dai dati filogenetici sappiamo costituire un'unità di gestione indipendente. Il gruppo 3 include popolazioni provenienti esclusivamente dal bacino dell'Isonzo e in particolare dal lato orientale, in corrispondenza delle valli del fiume Natisone, così come anche il gruppo 7 è rappresentato esclusivamente da località dell'alto corso del Tagliamento orientale; infine il gruppo 2 comprende due popolazioni del ramo occidentale dell'alto Tagliamento; questi ultimi due gruppi mostrano un netto differenziamento rispetto alle popolazioni dello stesso bacino idrico dovuto probabilmente a una forma di isolamento riproduttivo per la presenza di barriere di tipo geografico/ecologico. Le popolazioni comprese in questi gruppi andrebbero, a nostro avviso, gestite separatamente come ESU (Unità Evolutivamente Significative), in particolare per quanto riguarda le pratiche di ripopolamento, per le quali sarebbe opportuno utilizzare esclusivamente riproduttori locali e cioè provenienti da zone limitrofe al sito di introduzione o comunque facenti parte della stessa ESU.

ANALISI DEI RIPRODUTTORI

Abbiamo analizzato 64 riproduttori presenti nell'impianto di Amaro e provenienti da 5 località (Tab. 7) nei 3 principali bacini idrici regionali: Livenza (Rio Gamberi e Inglagna), Tagliamento (Palar) e Isonzo (Rio Gorgons e Valcanda). Nel complesso i riproduttori analizzati mostrano buoni livelli di variabilità genetica con un numero medio di aplotipi uguale a 3 per il 16s e 2 per la COI.

I riproduttori analizzati appartengono a 3 ESU diverse; gli individui del Livenza appartengono alla ESU 5, quelli dell'Isonzo alla ESU 1 e quelli del Tagliamento alla ESU 6. Queste tre ESU nella mappatura regionale raggruppano al loro interno un numero di popolazioni molto elevato (38 delle 52 popolazioni analizzate), appartenenti a bacini idrici diversi; questi riproduttori costituiscono pertanto un buon pool genico da cui attingere per prelevare riproduttori per ripopolamenti/reintroduzioni in numerosi siti regionali.

Riteniamo, inoltre, che i riproduttori provenienti da località appartenenti alla stessa ESU possano essere incrociati tra loro per aumentare la variabilità genetica complessiva delle nuove generazioni, e che il rilascio nei siti di ripopolamento debba seguire, ove possibile, la mappatura genetica regionale delle ESU: un sito facente parte di una determinata ESU andrebbe ripopolato con individui appartenenti alla stessa ESU, in modo da evitare l'inquinamento genetico delle popolazioni naturali con l'introduzioni di individui non compatibili, che comporterebbe la perdita di linee evolutive peculiari del territorio. Nel caso di reintroduzioni in siti in cui le popolazioni siano scomparse, si dovrebbero utilizzare come riproduttori individui provenienti dalle popolazioni più vicine di cui si dispongono informazioni genetiche.

SUGGERIMENTI GESTIONALI E PROSPETTIVE FUTURE

I risultati ottenuti dalle analisi genetiche ci permettono di formulare alcuni suggerimenti gestionali per quanto riguarda le pratiche di ripopolamento e reintroduzione del gambero di fiume nativo in FVG. Riassumendo i punti principali è necessario:

- considerare le 2 sottospecie individuate (*meridionalis* e *carsicus*) come unità di gestione separate;
- selezionare riproduttori compatibili con i siti di immissione/rilascio (preferibilmente appartenenti alla stessa ESU);
- è possibile aumentare la diversità genetica delle popolazioni da rafforzare effettuando incroci tra riproduttori provenienti da località diverse, ma sempre all'interno della stessa ESU.

Sarebbe auspicabile proseguire con il monitoraggio genetico delle popolazioni in cui sono stati effettuati ripopolamenti/reintroduzioni per verificare i livelli di fitness delle nuove generazioni gambericole e valutare l'esito delle pratiche gestionali per la corretta pianificazione di futuri interventi.

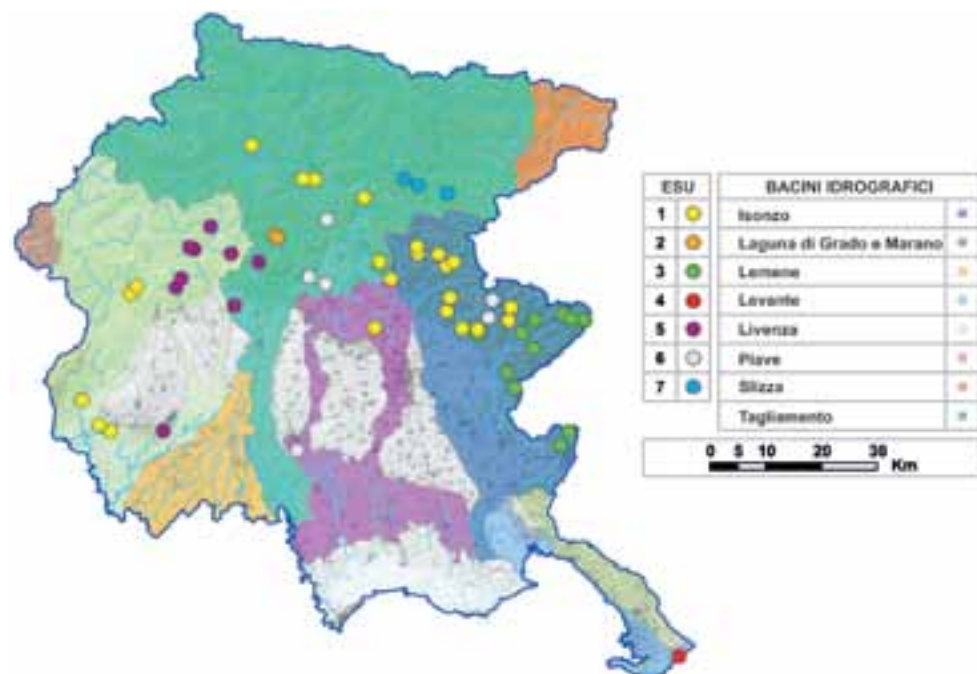


Fig. 98. Mappa delle ESU identificate in FVG. Ogni popolazione è rappresentata da un colore sulla base dell'appartenenza a uno dei 7 gruppi genetici (ESU), come da legenda. Sullo sfondo sono rappresentati i diversi bacini idrografici regionali.

Fig. 98. Crayfish ESU (Evolutionarily Significant Unit) map of the FVG region. Each population is represented by a color corresponding to one of the seven genetic groups (ESU), as reported in the figure caption. major regional watersheds are displayed in the background.

GENETIC CHARACTERIZATION OF THE *A. PALLIPES* COMPLEX POPULATIONS IN FRIULI VENEZIA GIULIA

– V. Bertucci, C. Manfrin & A. Pallavicini –

Dipartimento di Scienze della Vita, Università di Trieste,
via L. Giorgeri, 5 (Edificio Q) • I - 34127 Trieste
email: pallavic@units.it

INTRODUCTION

Over the past fifty years the taxonomy of the white-clawed crayfish has been repeatedly revised and several criteria for the classification of morphologically and genetically different groups have been proposed. The current position (Grandjean et al., 2000, 2002a, b), based on 16S ribosomal subunits analysis and supported by morphological studies (Bott, 1950; Karaman, 1962; Brodsky, 1983; Grandjean et al., 1998) and allozymes studies (Santucci et al., 1997), claims that *A. pallipes* is a species complex with a pronounced genetic structure at both the inter and intra – specific level. The complex consists of two genetically distinct species: *A. pallipes* e *A. italicus*. In the Italian territory *A. pallipes* is confined to the north-western regions, while *A. italicus* is distributed along the entire peninsula. The *A. italicus* taxon is constituted, in turn, of four subspecies: *A. i. italicus* in the Tuscan-Emilian Apennines, *A. i. carsicus* in the north-eastern regions, *A. i. carinthiacus* in the central and north-western regions and *A. i. meridionalis* in the central and southern regions (Fratini et al., 2005). Since in a correct species conservation policy subspecific entities should be regarded as distinct “management units”, any protection plan involving reintroduction/restocking must be preceded by the genetic characterization of the populations involved.

The RARITY project has therefore envisaged a set of genetic analysis in order to provide useful information for the constitution of a native crayfish broodstock to be used for new offspring production in captivity and subsequent release into the wild. It is important, indeed, to create a broodstock containing in the genome most of the genetic diversity found in natural populations, whilst minimizing the risk of genetic pollution in the releasing sites through the introduction of genetically incompatible individuals.

SAMPLING AND GENETIC ANALYSIS

In order to genetically characterize crayfish populations of major river basins, biological tissue samples were collected (one pereopod, removed through the use of scissors)

immediately fixed in 96% ethanol, only from male individuals, for a maximum number of 20 specimen per station. Only male individuals were sampled to avoid creating undue stress in females during the reproductive period. Sampling for genetic analysis was carried out at each station during the last day of the monitoring week, not to alter in any way the behavior of animals, biasing the census data scored through the marking / recapture technique. Biological samples were collected from 440 individuals from 56 stations (Fig. 94, Tab. 7), and two mitochondrial DNA genes were analyzed: the gene encoding the 16S small ribosomal subunit (16S rDNA) and the gene encoding for the subunit I of cytochrome c oxidase enzyme (COI). The 16S rDNA has previously found wide application in many phylogenetic studies at different hierarchical levels and it has been successfully applied to the taxonomic definition of the genus *Austropotamobius* (Grandjean & Souty-Grosset, 2000a, 2000b; Zaccara, 2004; Fratini et al., 2005). The COI, given its greater degree of polymorphism, is currently the marker of choice to investigate the genetic structure and phylogeography (geographic distribution of lineages) of animal populations, as well as being widely used for molecular identification of animal species (DNA barcoding). These DNA regions indeed can be used as a sort of genetic identity card for the species and subspecies identification and they have proven to be particularly useful when species are not easily distinguishable from the morphological point of view, that being the case of the white-clawed crayfish. The datasets obtained from both markers were used to define a “genetic mapping” of the FVG populations, through:

1. the definition of the taxonomical status of wild populations through phylogenetic analysis;
2. the estimation of genetic diversity levels and population differentiation;
3. the identification of population groups representing Evolutionarily Significant Units (ESU) to be treated as separate management units.

We then analyzed 64 adult breeders at the Amaro aquacultural implant, selected from 5 regional sampling sites (tab.1). In order to avoid stressing the animals in their reproductive period through the cutting of a pereopod, we decided to

sample crayfish exuvia collected from the watertanks during the moulting period, since it contains a sufficient amount of DNA to perform the genetic analysis.

RESULTS

Phylogenetic analysis of regional populations

Sequences obtained from both markers (419 sequences with a length of 426 base pairs for the 16S, and 434 sequences with a length of 310 base pair for the COI) were used to produce phylogenetic trees in order to assign a systematic placement to the regional crayfish populations.

Additional *Austropotamobius pallipes* complex sequences available from public databases (GenBank, EMBL) were included in the analysis, for both markers, to assign the taxonomic position to the sampled individuals and facilitate their comparison. At first the analysis were conducted on all obtained sequences; thereafter to simplify results presentation, the representatives of the different haplotypes (genetic variants) were identified and subsequent analyses were conducted on haplotypes. For the phylogenetic reconstruction of the 16S tree we used the 38 haplotypes in which the individuals sampled were grouped and 27 georeferenced sequences downloaded from Genbank, comprising the majority of haplotypes described so far for the four subspecies of *A. italicus*, and a few sequences of *A. pallipes* and *A. torrentium* species.

The 419 RARITY individuals analyzed belong to the subspecies *A. italicus*, that appears clearly separated from *A. pallipes*, in agreement with previous studies findings.

Moreover we revealed the presence of two *A. italicus* subspecies: *A. i. carsicus* exclusively in the Rosandra stream and *A. i. meridionalis* in the remaining 55 sampled locations (Fig. 95). A previous genetic study (Fratini et al., 2005) identified the presence of *A. i. carsicus* in FVG, after analysing a small number of samples coming from the Rosandra stream: the presence of this subspecies in the whole region was inferred, considering furthermore its distribution in the nearby Veneto. Actually the white-clawed crayfish nomenclature proposed in 2005 should be revised since the *A. i. meridionalis* subspecies shows a much wider geographical distribution than previously reported.

For the phylogenetic reconstruction of the COI we used the 36 sampled haplotypes and 36 sequences downloaded from GenBank, representing all groups of haplotypes known to date, according to the nomenclature and classification proposed by Trontelji (Trontelji et al., 2005). According to this classification, the Western Europe group includes the *A. pallipes* species while the remaining 5 haplogroups seem to represent the *A. italicus* species, forming three distinct clades in the phylogenetic tree. The first clade is represented by the group NW Italy which includes both *A. i. italicus* and *A. i. carinthiacus* subspecies; the second clade is the Is-

tra 1 which comprises the *A. i. carsicus* subspecies; the third clade includes the remaining 3 haplogroups, SE Alps / W balkans, Istra 2 and Appennine, and should correspond to the *A. i. meridionalis* subspecies. The 434 specimen analyzed fall in 2 groups of haplotypes: Istra 1 (only the samples from the Rosandra described as *A. i. carsicus* with the 16S mtDNA) and SE Alps / W balkans (all other samples from the remaining 55 locations), described as *A. i. meridionalis* with the 16S mtDNA (Fig. 96).

Genetic analysis to verify the presence of *A. torrentium*

We analyzed 59 specimens from 3 sites (Zamlin, Rio nero and Povici) with a modified sampling protocol, in order to verify the presence of *A. torrentium*, a highly endangered crayfish species which is currently represented, in the Italian territory, by a few relict populations in FVG, whose presence has been reported in the past in the north-eastern Tagliamento and Slizza basins. Unfortunately, the phylogenetic analysis classified all specimen analyzed as belonging to *A. italicus* species (subspecies: *A. i. meridionalis*).

Genetic diversity and population differentiation

Genetic variability is the necessary basis for the adaptation of species to future evolutionary changes and the levels of such diversity in populations can provide useful information about their health status and about the environmental conditions of their habitat; environmental stressors in fact typically lead to a reduction in genetic diversity, through a decrease in population size, often resulting in reduced fitness (often linked to inbreeding) and increased risk of extinction.

To estimate genetic diversity of populations the COI dataset was used and different diversity indices were calculated for the whole FVG region and for the major hydrographic basins separately, as shown in table 2: the number of polymorphic sites (S), the number of haplotypes (Nh), the number of private haplotypes (exclusive of a water course or river basin), the haplotype diversity (h) and nucleotide diversity (π). The haplotype diversity is the number of different haplotypes sampled in a population, while nucleotide diversity takes into account the degree of diversity of the genetic variants (haplotypes) observed. To be able to compare sites with different sample sizes the diversity indices were normalized through rarefaction curves. The overall haplotype diversity was quite high, with the highest values in the Tagliamento and Isonzo basins followed by Livenza, and finally Cormor and Rosandra. Furthermore, the number of private haplotypes was very high compared to the total number of haplotypes found in the different basins, highlighting a significant differentiation between the main regional basins. The highest nucleotide diversity was detected in the Isonzo basin, with the eastern branch (Natisone river) well-differentiated from the western branch (Torre river), suggesting the presence of evolutionary ancient populations that

maintained substantial reproductive isolation from other populations of the same basin.

Although the genetic diversity indices show a high degree of genetic variability, because of the large number of haplotypes and their intrinsic diversity, a key issue is to understand how such variability is distributed and, that is, if it is due to variability within populations or to genetic differentiation between populations. The genetic structure analysis of populations showed a strong differentiation on the geographic scale, both between populations of different basins as well as between populations of the same basin, indicating a significant degree of isolation and genetic fragmentation of populations (Fig. 97).

This phenomenon can be partially attributed to some ecological life history traits of the species, a low dispersion rate and thus gene flow, but also to habitat fragmentation as a result of human impact. Despite a quite high overall genetic variability, regional crayfish populations mostly display low levels of intra-population diversity.

Identification of Evolutionary Significant Units (ESU)

The combined study of the two mitochondrial DNA regions, through Bayesian statistics, allowed us to identify seven groups of genetically differentiated populations which may represent evolutionary lines characterizing different geographical areas or “Evolutionarily Significant Units” (ESU), to be treated as separate management units (Fig. 98). Cluster 2, 3, 4 and 7 show a strong signal of geographical structure, i.e. they group together populations from the same river basin, and potentially represent conservation units, to be managed separately in order to preserve their diversity; especially cluster 4 includes only the Rosandra stream population, already identified from phylogenetic data to represent a separate management unit; group 3 includes populations exclusive of the eastern branch of the Isonzo basin, namely the Natisone river valleys, as well as the group 7 is represented only by populations from the upper course of eastern Tagliamento; Finally, Group 2 consists of two populations of the north-western branch of Tagliamento; these last two groups show a clear differentiation with the other populations of the same river basin, likely due to a pattern of reproductive isolation influenced by the presence of geographical/ecological barriers. The populations included in all these groups should, in our opinion, be managed separately as ESUs (Evolutionarily Significant Units), especially in the matter of restocking and reintroduction practices, where stocked crayfish should originate from local broodstock, or at least from breeders belonging to the same genetic ESU.

BROODSTOCK ANALYSIS

We analyzed 64 selected breeders in the Amaro aquacultural implant, collected from 5 localities (Tab. 7) along the 3

major river basins: Livenza (Rio Gamberi and Inlagna), Tagliamento (Palar) and Isonzo (Rio Gorgons and Valcanda). Overall, breeders showed good levels of genetic variability with an average number of 3 and 2 haplotypes for the 16s and the COI marker respectively and were assigned to three different ESU: breeders from Livenza to ESU 5, those from Isonzo to ESU 1 and those from Tagliamento to ESU 6. In the regional genetic mapping these three ESUs include a high number of populations from different river basins (38 of the 56 analyzed populations); this broodstock may represent therefore a suitable gene pool to draw from the breeding material needed for restocking / reintroduction practices in several regional sites.

We also believe that breeders coming from localities within the same ESU can be crossbred to increase the overall genetic variability of their offspring, and that any release of animals should follow, where possible, the regional ESUs genetic mapping: a site belonging to a specific ESU should be restocked with individuals belonging to the same ESU, in order to avoid the genetic pollution of wild populations through the introduction of not compatible individuals, entailing the loss of local peculiar evolutionary lineages. In reintroduction cases, where the wild population has completely disappeared from a site, breeders should be selected from the nearest populations for which genetic data are available.

MANAGEMENT IMPLICATIONS AND FUTURE PERSPECTIVES

The obtained genetic data enable us to express some suggestions for future management practices of native crayfish, including restocking and reintroduction, in Friuli Venezia Giulia. To summarize the main issues, it would be necessary to:

- consider the two identified subspecies (*meridionalis* and *carsicus*) as separate management units;
- select compatible breeders with the wild populations of the restocking sites (preferably belonging to the same ESU);
- it is possible to increase genetic diversity of the populations to be reinforced intercrossing breeders from different localities, as long as they belong to the same ESU.

It would be recommended to continue the genetic monitoring of the populations in which restocking / reintroduction plans were carried out, to test the fitness level of the new crayfish generations and to evaluate the effects of such management strategies for an appropriate planning of future interventions.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

- Bagley MJ, Franson SE, Christ SA, Waits ER & Toth GP. 2002. Genetic Diversity as an Indicator of Ecosystem Condition and Sustainability: Utility for Regional Assessments of Stream Condition in the Eastern United States. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.
- Bott R. 1950. Die Flusskrebse Europas (Decapoda; Astadidae). Proc Senck Nat Soc, 483:1-36.
- Brodsky SY. 1983. On the systematic of paleartic crayfishes (Crustacea, Decapoda). Freshwater crayfish, 5: 464-470.
- Excoffier L & Lischer HE. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources, 10: 564-567.
- Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotype: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics, 131: 479-491.
- Fratini S, Zaccara S, Barbaresi S, Grandjean F, Souty Grosset C, Crosa G & Gherardi F. 2005. Phylogeography of the threatened crayfish (genus *Austropotamobius*) in Italy: implications for its taxonomy and conservation. Heredity, 94(1): 108-118.
- Grandjean F & Souty-Grosset C. 2000. Mitochondrial DNA variation and population genetic structure of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes pallipes*. Conserv. Genet., 1: 309-319.
- Grandjean F, Bouchon D & Souty-Grosset C. 2002a. Systematic of the European endangered crayfish species *Austropotamobius palipes* (Decapoda, Astacidae) with a re-examination of the status of *Austropotamobius berndhauseri*. J Crust Biol, 22(3): 677-681.
- Grandjean F, Frelon-Raymond M & Souty-Grosset C. 2002 b. Compilation of molecular data for the phylogeny of the genus *Austropotamobius*: one species or several? Bull Fr Pêche Piscic, 367: 671-680.
- Guillot G, Mortier F & Estoup A. 2005. Geneland: a computer package for landscape genetics. Molecular Ecology Notes, 5(3): 712-715.
- Karaman MS. 1962. Ein beidrag zur Systematic der Astacidae (Decapoda). Crustaceana, 3: 173-191.
- Librado P & Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics, 25:1451-1452.
- Moritz C, Lavery S & Slade R. 1995. Using allele frequency and phylogeny to define units for conservation and management. In: Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining Unique Units in Population Conservation (eds Nielsen JL Powers GA), pp. 249-262. Symposium 17. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Palumbi SR & Wilson AC. 1990. Mitochondrial DNA diversity in the sea urchins *Strongylocentrotus purpuratus* and *S. droebachiensis*. Evolution, 44: 403-415.
- Pedraza-Lara C, Alda F, Carranza S & Doadrio I. 2010. Mitochondrial DNA structure of the Iberian populations of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius italicus italicus* (Faxon, 1914). Molecular Phylogenetics and Evolution, 57(1): 327-342.
- Posada D & Crandall KA. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. Bioinformatics 14: 817-818.
- Santucci F, Iaconelli M & Andreani P. 1997. Allozyme diversity of European freshwater crayfish of the genus *Austropotamobius*. Bull Fr Pêche Piscic, 347: 663-676.
- Soule ME. 1987. Viable Populations for Conservation. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
- Tamura K, Dudley J, Nei M & Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24: 1596-1599.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F & Higgins DG. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 24: 4876-4882.
- Trontelj P, Machino Y & Sket B. 2005. Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 34(1): 212-226.
- Weir BS. 1990. Intraspecific differentiation. In Molecular systematics. Hillis D. M. & Moritz C. (eds). Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp. 373-410.
- Zaccara S, Stefani F, Galli P, Nardi PA & Crosa G. 2004. Taxonomic implications in conservation management of white-clawed crayfish (*Austropotamobius pallipes*) (Decapoda, Astacidae) in Northern Italy. Biol Conserv, 120: 1-10.



APPROCCIO INTEGRATO DI TRAPPOLAGGIO INTENSIVO ED SMRT PER IL CONTROLLO DI *PROCAMBARUS CLARKII* NEL SITO DI CASETTE

– L. Aquiloni¹ & M. Zanetti² –

¹ Itinera C.E.R.T.A. srl
via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

² Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia, via Colugna, 3 • I - 33100 Udine
email: massimo.zanetti@regione.fvg.it

Il sito di Casette (Fig. 99) è un lago situato in Comune di Sesto al Reghena, ma presso il centro abitato di Cordovado (Pordenone) ed è vicino a strade di grande percorrenza. Il lago, alimentato da acque di risorgiva, non presenta né immissari né emissari e, pertanto, la popolazione che ospita può essere considerata “chiusa”, ovvero soggetta ad un numero nullo o molto basso di eventi di immigrazione/emigrazione da corpi idrici limitrofi eventualmente invasi da questa specie.

Le peculiarità del sito e la presenza di una piccola popolazione rilevata nel 2012 hanno determinato la scelta della SMRT (dall'inglese *Sterile Male Release Technique*, ovvero tecnica di sterilizzazione dei maschi e rilascio) come metodo di controllo più idoneo al contesto di applicazione. Unitamente a tale tecnica innovativa è stato attuato anche un trappolaggio intensivo.

Un approccio integrato con queste due tecniche è infatti da preferire per il suo effetto sinergico: il trappolaggio determina una immediata riduzione della popolazione consentendo la selezione degli animali da irraggiare e, nello stesso tempo, aumenta la probabilità dei maschi sterili di accoppiarsi con le poche femmine rimaste. I maschi irraggiati, prima di essere rilasciati, devono quindi essere marcati per evitare la loro rimozione durante le operazioni di trappolaggio. La marcatura consiste in una cauterizzazione dell'esoscheletro prodotta con un saldatore da campo che produce un segno semi-permanente e riconoscibile anche dopo la muta (Fig. 100).

La cattura degli animali marcati nel trappolaggio permette anche di stimare l'abbondanza della popolazione del sito (metodo di Cattura-Marcatura-Ricattura). L'irraggiamento dei maschi selezionati è stato eseguito presso il CRO di Aviano, in orari e sedi concordate col personale ospedaliero per non intralciare l'ordinaria attività della struttura. L'approccio integrato di trappolaggio intensivo ed SMRT è stato utilizzato nel 2013 e nel 2014.

Il monitoraggio standardizzato al termine delle attività di controllo fornirà un indice CPUE che ci consentirà di stimare l'impatto ottenuto nella popolazione per confronto con lo stesso indice calcolato nel 2012 prima degli interventi di controllo e pari a 1.14 gamberi per nassa al giorno.



Fig. 99. Stazione di monitoraggio RARITY 0709300 - Casette nei pressi di Cordovado in cui per il controllo del *Procambarus clarkii* sono stati effettuati trappolaggi intensivi e rilascio di maschi sterili (tecnica SMRT).

Fig. 99. RARITY 0709300 monitoring station - Casette near Cordovado, where intensive trapping and the release of sterile males (SMRT technique) have been carried out to control *Procambarus clarkii*.



Fig. 100. Marcatura dei maschi irraggiati con cauterizzazione dell'esoscheletro mediante saldatore da campo.

Fig. 100. Radiated male marking by branding the exoskeleton with a portable soldering iron.

Attività 2013

Un trappolaggio intensivo condotto tra giugno e luglio 2013 ha permesso di catturare 5927 esemplari, di cui 840 maschi con caratteristiche idonee che, in parte, sono stati sottoposti al trattamento di sterilizzazione con una dose di 20 Gy (Aquiloni et al., 2009), mentre gli altri 5087 sono stati trasportati nei centri di stoccaggio delle peschate in attesa del loro smaltimento a norma di legge. Sono stati complessivamente trattati 566 maschi che, nell'arco di poche ore dal trattamento, sono stati marcati e rilasciati nel sito di lavoro. Le loro successive ricatture ci hanno consentito di stimare la dimensione della popolazione presente a Casette che ammontava a 10.419 esemplari. Per ridurre ulteriormente la popolazione, ETP ha realizzato una nuova sessione di catture massive tra settembre e ottobre 2013 con la rimozione di 743 esemplari. Le attività sono state interrotte fino alla successiva stagione di pesca.

Attività 2014

Anche il secondo anno di attività è stato predisposto tra maggio e giugno un trappolaggio intensivo in cui sono stati catturati 3293 esemplari di cui 250 maschi selezionati per l'irraggiamento. Rispetto al precedente anno c'è stata una forte riduzione della taglia media del pescato che ha consentito di selezionare un numero più esiguo di maschi idonei all'irraggiamento. Seguendo le indicazioni delle ricerche condotte nell'ambito del RARITY per l'implementazione della SMRT, gli animali sono stati irraggiati a 40 Gy, ovvero con una dose doppia di radiazioni rispetto al precedente anno. Gli animali, preventivamente marcati con cauterizzazione, sono stati immediatamente rilasciati nel sito di Casette. 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 nell'ultima settimana di settembre 2014, ovvero in un periodo dell'anno analogo a quello del monitoraggio per il calcolo del CPUEi di due anni prima, in modo da minimizzare le eventuali differenze nella temperatura dell'acqua e nella propensione alla locomozione legata

alla stagionalità del ciclo biologico della specie. È stato catturato un esiguo numero di esemplari corrispondente ad un indice CPUE pari a 0.19. 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.

PROSPETTIVE E CONCLUSIONI

L'approccio combinato del trappolaggio intensivo tradizionale con il rilascio di maschi sterili ha determinato una forte riduzione dell'indice CPUE rilevato con monitoraggio standardizzato (da 1.14 a 0.19) che indica un abbattimento della popolazione dell'87% in soli due anni. Questo risultato eccezionale è legato al lavoro sinergico delle due tecniche, ciascuna delle quali colpisce *target* diversi nella stessa popolazione: i riproduttori catturati con le trappole e i giovani ridotti dalla SMRT. Occorre comunque sottolineare che il contributo del rilascio dei maschi sterili al controllo della popolazione, seppur determinando una immediata riduzione nel numero delle nascite, sarà quantificabile con precisione solo nei prossimi anni in cui sarà possibile valutare l'effetto del ridotto reclutamento 2013-2014. La stazione di Casette dovrà quindi essere monitorata in modo standardizzato nei prossimi 5 anni. A dimostrazione della reale applicabilità di questa tecnica innovativa anche da personale non esperto, 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. Il costo medio per esemplare si attesta su 2.7 euro ma può diminuire fino a 1.5 euro una volta consolidato l'iter da seguire da parte dell'ospedale di riferimento. In FVG, il CRO di Aviano, che ha effettuato tutti i trattamenti nell'ambito del progetto RARITY, si è reso disponibile a collaborare per il contrasto della specie e rappresenta quindi la struttura di riferimento per tale attività a livello regionale.

INTEGRATED INTENSIVE TRAPPING AND SMRT APPROACH FOR THE CONTROL OF PROCAMBARUS CLARKII: THE CASSETTE CASE STUDY

– L. Aquiloni¹ & M. Zanetti² –

¹ Itinera C.E.R.T.A. srl
via Isidoro del Lungo • I - 52025 Montevarchi (AR)
email: laura.aquiloni@itineracerta.it

² Ente tutela pesca del Friuli Venezia Giulia, via Colugna, 3 • I - 33100 Udine
email: massimo.zanetti@regione.fvg.it

The site of Casette (Fig. 99) is located near the centre of Cordovado (Pordenone) and is near main traffic arteries. The lake is fed by spring water and has no in-flowing or out-flowing waters, so its population can be considered "closed", i.e. subject to no, or a very low, immigration/emigration from neighbouring water courses possibly invaded by this species. The peculiarity of this site and the presence of a small population detected in 2012 led to the choice of SMRT (Sterile Male Release Technique) as the most suitable control method for the application context. Alongside this innovative technique intensive trapping was also undertaken. In fact an integrated approach using both techniques is preferable because of its synergic effect: trapping immediately reduces the population enabling selection of the animals for radiation and at the same time increases the probability of sterile males mating with the few remaining females. Consequently radiated males must be marked to avoid them being removed during trapping. Marking consists of branding the exoskeleton with a portable soldering iron, producing a semi-permanent mark that remains recognisable after moulting (Fig. 100). Capture of the marked animals when trapping also enables us to estimate the size of the site population (Capture-Marking-Recapture). Selected males were radiated at the CRO in Aviano, at times and venues agreed with the hospital staff to avoid hindering normal hospital activities.

This integrated trapping-SMRT approach was used in 2013 and 2014. The standardised monitoring undertaken at the end of control operations will provide a CPUE index that will enable us to estimate the resulting impact on the population. This will be compared with the index of 1.14 crayfish a day per trap, calculated in 2012, before control operations took place.

2013 Activities

Intensive trapping carried out in June/July 2013 enabled us to capture 5927 specimens, of which 840 males with suitable characteristics (Aquiloni & Gherardi 2008) underwent the sterilisation treatment with a dosage of 20 Gy (Aquiloni et al., 2009), and the other 5087 were taken to storage centres for fish catches, pending disposal as prescribed by law.

An overall total of 566 males were treated, then marked and released on the work site within a few hours. Their subsequent recapture allowed us to estimate the size of the Casette population, which came to 10,419 specimens. To reduce the population further, ETP organised another mass capture in September/October 2013, which led to the removal of 743 specimens. Activities were then interrupted until the following fishing season.

2014 Activities

Intensive trapping was also scheduled for May/June of the second year of activity, leading to the capture of 3293 specimens of which 250 males were selected for radiation. Compared to the previous year the average size of the fish caught had fallen considerably, leading to fewer males being selected for radiation. Following the findings of research in the RARITY project for the application of SMRT, the animals were radiated with 40 Gy, i.e. double the radiation dosage used the previous year. The animals were branded and then immediately released on the Casette site.

Standardised monitoring at the end of September 2014 will enable us to assess the overall decrease induced in the population.

MANAGEMENT INDICATIONS FOR THE APPLICATION OF INTENSIVE TRAPPING AND SMRT TO CONTROL PROCAMBARUS CLARKII

Intensive trapping has determined a reduction in the average size of fish caught and, thanks to the number of specimens removed from the site, a drop in the CPUE index (from 1.14 to 0.47) which requires confirmation by the next standardised monitoring. It must be stressed however that although the release of sterile males has determined an immediate reduction in the number of births, it will only contribute to population control in the next few years when the effect of the reduced 2013-2014 recruitment will be effectively quantifiable. The Casette station will therefore have to be monitored in a standardised way for the next 5 years. The demonstrate the real applicability of this innova-

tive technique even by non-expert personnel, the marking operations, assistance by hospital staff during sterilisation and the release of sterile males on the work site have been carried out by ETP personnel, previously trained by UNIFI, in full autonomy. The average cost per specimen is attested at 2.7 euros, but could drop to 1.5 euros once the *iter* has been consolidated by the hospital of reference. In FVG, the CRO in Aviano, which carried out all the treatments within the project RARITY, has made itself available to fight the species and is therefore the reference structure for these activities at regional level. Standardised monitoring was carried out at the end of the population control operations to assess their effective impact. This took place in the last week of September 2014, at a similar time of year to the monitoring for the CPUEi two years earlier, in order to minimise any differences in water temperature and locomotion tendency associated with the seasonal biological cycle of the species. A meagre number of specimens were captured amounting to a CPUE index of 0.187. Comparing the 2014 CPUEi with the 2012 CPUEi of 1.14, the reduction in the Casette population can be calculated at 87% in just 2 years of activity.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

- 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. 2008. Mutual mate choice in crayfish: large body size is selected by both sexes, virginity by males only. *Journal of Zoology London*, 274: 171-179.

ASPETTI SANITARI E PREVENZIONE DELLE MALATTIE

– A. Manfrin & T. Pretto –

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Laboratorio Nazionale di Riferimento per le malattie dei crostacei
via L. Da Vinci, 39 • I - 45011 Adria (Rovigo)
email: amanfrin@izsvenezie.it; tpretto@izsvenezie.it.

Il monitoraggio delle popolazioni gambericole effettuato dall'Ente tutela pesca nel triennio 2012-2014 ha permesso di prelevare campioni per la valutazione dello stato sanitario delle specie *Austropotamobius pallipes* e *Procambarus clarkii* presenti nei corsi d'acqua del Friuli Venezia Giulia. Il monitoraggio sanitario si è focalizzato sul rilevamento dell'oomicete *Aphanomyces astaci*, agente eziologico della peste del gambero o afanomicosi, nella specie autoctona *A. pallipes* e nella specie invasiva *P. clarkii* e di White Spot Syndrome Virus, virus responsabile della malattia dei punti bianchi, nel gambero rosso della Louisiana (*P. clarkii*). Analisi batteriologiche e chimiche sono state eseguite sulla parte edibile di *P. clarkii*, prelevati in diversi siti di monitoraggio in FVG, per valutare la possibile presenza di batteri agenti di tossinfezioni alimentari nell'uomo e l'accumulo di metalli pesanti. Non esistono segnalazioni da parte di ARPA Friuli sulla eventuale presenza di alghe tossiche nei corsi d'acqua dolce.

Aphanomyces astaci

La peste del gambero sostenuta da *Aphanomyces astaci* rappresenta la patologia a maggior contagiosità e letalità per le specie europee indigene appartenenti alla famiglia Astacidae. Questo oomicete è un patogeno specializzato nel parassitare i gamberi d'acqua dolce ed è incluso nella lista delle 100 specie maggiormente invasive al mondo secondo il Global Invasive Species Specialist Group of IUCN (International Union for Conservation of Nature). A partire dalla prima segnalazione della malattia in Lombardia nel 1859, *A. astaci* si è diffuso progressivamente in tutto il continente europeo determinando il collasso delle popolazioni gambericole indigene. *A. astaci* possiede un ciclo biologico diretto senza ospiti intermedi, si trasmette da gambero a gambero mediante zoospore, mobili nell'acqua. La zoospora aderisce all'esoscheletro del gambero, ne perfora la superficie penetrando nella cuticola e nei tessuti sottostanti formando un reticolo di ife fungine asettate. Queste ife fuoriescono nuovamente dalla cuticola, generalmente alla morte dell'ospite, e sviluppano all'esterno strutture riproduttive dette zoosporangi che rilasciano la nuova generazione di zoospore infettanti nell'ambiente acquatico. Si ri-

tiene che questo oomicete sia originario del Nord America ed abbia raggiunto con le specie autoctone della famiglia Cambaridae, a cui appartiene il gambero rosso della Louisiana, un equilibrio ospite-parassita. La risposta immunitaria delle specie Nord Americane è in grado di contenere le ife fungine sulla superficie esterna della cuticola rendendo i gamberi resistenti alla malattia, ma consentendo al parassita di sviluppare una nuova generazione di spore infettanti. Questo rende le specie della famiglia Cambaridae efficienti vettori biologici dell'infezione. L'introduzione in Europa delle specie *Pacifastacus leniusculus*, *Orconectes limosus* e *Procambarus clarkii* durante la seconda metà del '900 ha portato nuove linee genetiche di *A. astaci*, specificamente adattate a questi ospiti, ma estremamente letali per i gamberi europei dei generi *Austropotamobius* e *Astacus*. Attualmente nel territorio europeo si riscontrano 5 linee genetiche di peste. Un gruppo A isolato nella specie *Astacus astacus* riferibile alla prima ondata di peste europea, un gruppo B associato alla specie *P. leniusculus* importato in Svezia dal lago Tahoe (California), un gruppo C associato a *P. leniusculus* del lago Pitt (British Columbia), un gruppo D associato alla specie *P. clarkii* e un gruppo E isolato della specie *O. limosus* (Kozubíková et al., 2011).

In condizioni sperimentali di infezione, ceppi di *A. astaci* appartenenti al gruppo A presentano gradi variabili di letalità per le specie autoctone europee mentre il gruppo D veicolato da *P. clarkii* presenta elevata patogenicità.

Gli obiettivi del monitoraggio sanitario per *A. astaci* erano:

- nella specie invasiva *P. clarkii* valutare la presenza del patogeno e la prevalenza di gamberi portatori dell'oomicete nelle diverse località di campionamento
- nella specie indigena *A. pallipes* verificare la presenza del patogeno negli esemplari rinvenuti morti o moribondi durante il campionamento soprattutto nei tratti di torrenti sottoposti ad azioni di ripopolamento con prelievo di riproduttori e successivo rilascio di giovanili, e successivamente, nel monitoraggio 2014, una valutazione della prevalenza dell'infezione in alcune popolazioni apparentemente sane.

Diagnosi di *Aphanomyces astaci*

Per la diagnosi dell'afanomicosi, si è ricorsi inizialmente all'analisi molecolare PCR end-point con sequenziamento degli amplificati come riportato nel Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2012 OIE. Successivamente, nei campionamenti effettuati nel 2013-14, si è preferito applicare una metodica real-time PCR (Vrålstad et al., 2009), già utilizzata ampiamente da numerosi gruppi di ricerca europei, in grado di aumentare la sensibilità di rilevazione del DNA dell'oomicete.

Da tutti gli esemplari di *P. clarkii* e dai gamberi indigeni moribondi raccolti sono state prelevate piccole porzioni di cuticola addominale ventrale, apici degli uropodi, articolazioni dei pereopodi e tutte le aree ulcerate con deposito di melanina. Questi tessuti sono stati frammentati e sottoposti a digestione ed estrazione del DNA che è stato poi analizzato mediante le sopraelencate PCR real-time e/o PCR end-point.

Nel monitoraggio eseguito nel 2014 è stata impiegata una tecnica di prelievo non invasiva in grado di valutare la positività dei gamberi per il patogeno *A. astaci* mediante l'utilizzo di un tampone sterile applicato sulla superficie esterna degli animali (addome, uropodi, base degli arti, cefalotorace, peduncolo oculare). Questo metodo di prelievo ha consentito di aumentare il numero di esemplari *A. pallipes* esaminati da diverse popolazioni, in assenza di mortalità, senza uccidere gli animali.

L'isolamento di *A. astaci* in terreno di coltura RGY è stato effettuato con successo durante un episodio di mortalità presso l'impianto ETP di Amaro, a partire da frammenti di cuticola addominale con evidente presenza di ife fungine. Ciò ha consentito l'identificazione del gruppo genetico di appartenenza mediante analisi molecolari specialistiche RAPD-PCR e microsatelliti, effettuate rispettivamente in collaborazione con il Prof. Javier Dièguez-Urbeondo (Real Jardín Botánico-CSIC-Madrid) e Prof Frederic Grandjean (Université de Poitiers).

Risultati dell'analisi per *A. astaci*

I risultati del monitoraggio per *A. astaci* nel gambero di fiume autoctono *A. pallipes* in FVG nel triennio 2012-2014 sono presentati in Tab. 9, i risultati nella specie invasiva *P. clarkii* in Tab. 10. I siti di campionamento positivi per *A. astaci* in entrambe le specie sono evidenziati nella Fig. 101. Complessivamente sono stati analizzati 343 esemplari di *P. clarkii* provenienti da 4 siti di cattura. Le analisi ripetute nei tre anni di monitoraggio hanno evidenziato, almeno per un anno la presenza di soggetti portatori di *A. astaci* in tutti i siti di campionamento, con prevalenza variabile tra il 3,3% e l' 85,0%.

Per la specie indigena *A. pallipes* sono stati analizzati 45 esemplari tra il 2011 e 2013, rinvenuti morti o con lesioni dell'esoscheletro da 15 siti di campionamento, rilevando la presenza di *Aphanomyces astaci* in 6 corsi d'acqua. Il cam-

pionamento eseguito nel 2014 ha analizzato 212 esemplari vitali da 8 siti, con metodo non invasivo, ed ha evidenziato la presenza di esemplari portatori in 6 siti. In due stazioni di monitoraggio (Sequals e Meduna Pradis), campionate a distanza rispettivamente di 1 e 2 anni, è stato possibile riconfermare la presenza di esemplari indigeni positivi per il patogeno *A. astaci* in assenza di evidente mortalità della popolazione. Questo risultato inatteso fa pensare che sia presente una linea genetica a bassa patogenicità di *A. astaci*, diffusa in alcune popolazioni autoctone, che in condizioni naturali normali si trova in equilibrio con l'ospite *A. pallipes*. Esemplari positivi per l'oomicete infatti presentavano frequentemente depositi di melanina sulla cuticola dei pereopodi e dell'addome, manifestando una risposta immunitaria contro le ife fungine simile a quella osservata nei gamberi Nord Americani. Il mantenimento in condizioni di allevamento di *A. pallipes* adulti portatori di *A. astaci* ha tuttavia causato un episodio manifesto di peste del gambero caratterizzato da elevata mortalità.

Peste del gambero presso l'impianto ETP di Amaro

A partire dalla fine di Dicembre 2013 un aumento di mortalità con sintomi riferibili a peste del gambero (esemplari rovesciati sul dorso e paralizzati) è stato osservato in alcune vasche dell'impianto di Amaro, dove erano stabulati adulti riproduttori di *A. pallipes* provenienti da 8 popolazioni del FVG. Le analisi effettuate dalla cuticola di alcune femmine morte ad inizio gennaio hanno confermato la presenza di *A. astaci* (real-time PCR e PCR end-point con sequenziamento) mentre l'analisi dell'emolinfa ha evidenziato una setticemia da batteri del genere *Aeromonas*. La malattia, evidenziata progressivamente in tutte le vasche di riproduttori presenti in impianto ha portato ad una mortalità complessiva del 99% (dicembre 2013-luglio 2014). Si è tentato con successo l'isolamento dell'oomicete da esemplari moribondi, e le colonie di *A. astaci* cresciute in coltura sono state analizzate per identificare la linea genetica di appartenenza mediante RAPD-PCR (Huang et al., 1994) ed analisi dei microsatelliti (Grandjean et al., 2014). Le due metodiche hanno concordato nell'assegnare i ceppi isolati alla linea genetica A, diffusasi in Europa a partire dal primo focolaio di peste descritto nel 1859. L'introduzione dell'oomicete in impianto è avvenuta presumibilmente attraverso gamberi autoctoni portatori asintomatici, prelevati da popolazioni robuste e non in contatto con specie di gamberi Nord Americani.

Un'analisi retrospettiva sugli esemplari deceduti in impianto prima dell'inizio del focolaio ha identificato i primi esemplari positivi per *A. astaci* (morti in aprile e settembre 2013) provenienti dal sito Valcalda. Si ipotizza che la stabulazione in vasche con moderato flusso d'acqua ed elevata densità di esemplari abbia portato ad un aumento del numero di zoospore infettanti oltre un livello soglia in grado di scatenare la mortalità.

SITI DI CAMPIONAMENTO SAMPLING SITES	N° POSITIVI PER <i>A. ASTACI</i> SU N° DI ESEMPLARI ESAMINATI N° OF <i>A. ASTACI</i> POSITIVE SPECIMENS/ N° OF EXAMINED SPECIMENS			
	2011	2012	2013	2014
ETP CASE SPARSE, FLAMBRO	1/5			
TORRENTE CELLINA (BARCIS DIGA VECCHIA) 05118RN		1/5		
TORRENTE PATOC, SAN LEONARDO 1305400		3/4		
TORRENTE COSIZZA - SAN LEONARDO		1/1		
SEQUALS 06013RN			3/8	16/45
PALAR	0/1	0/5		26/43
RIO GAMBERI 0613500			0/3	0/30
RIO INGLAGNA 0613600	0/2			0/30
CHIARZÒ				3/30
MEDUNA PRADIS 0613400		2/2		2/10
CANALUTTO 1306100				2/12
RASCHIACCO 1107800				2/12
TORRENTE CHIARÒ, SQUARZULIS 1305800		0/2		
BUDRIN 13047RN		0/2		
JUDRIO 1305200		0/1		
POTOC DI TOPOLÒ 1305000		0/1		
CAMPONE 0613200		0/2		
TORRENTE ALBERONE 1305600			0/1	

Tab. 9. Risultati nella specie indigena *Austropotamobius pallipes*.

Tab. 9. Results obtained from the indigenous species *A. pallipes*.

SITI DI CAMPIONAMENTO SAMPLING SITES	N° POSITIVI PER <i>A. ASTACI</i> SU N° DI ESEMPLARI ESAMINATI N° OF <i>A. ASTACI</i> POSITIVE SPECIMENS/ N° OF EXAMINED SPECIMENS		
	2012	2013	2014
ALBERONI	5/16 (31,3%)	4/50 (8,0%)	6/9 (66,7%)
CAMPOMOLLE	0/5	2/60 (3,3%)	5/44 (11,4%)
CASSETTE	0/4	0/60	30 (66,7%)
VILLUTTA	1/6 (16,7%)	17/20 (85,0%)	10/29 (34,5%)
CELLINA	0/10		

Tab. 10. Risultati nella specie invasiva *Procambarus clarkii*.

Tab. 10. Results obtained from the invasive species *P. clarkii*.

White Spot Syndrome Disease (WSSD)

La malattia dei punti bianchi è una delle patologie di maggior importanza nell'allevamento dei gamberi peneidi marini ed è in grado di causare mortalità nei decapodi d'acqua dolce. Il virus replica nei tessuti epiteliali dei gamberi, causando nelle specie marine evidenti macchie biancastre sulla cuticola del cefalotorace. La specie autoctona *A. pallipes* si

è dimostrata sperimentalmente molto sensibile all'infezione e mortalità nel gambero rosso della Louisiana sono state descritte in natura in Nord America. Per valutare la presenza di questo virus nel territorio del FVG è stata scelta di monitorare la specie alloctona *P. clarkii* in ragione dei dati presenti in letteratura, della sua diffusione in acque moderatamente salmastre, favorevoli la replicazione del virus

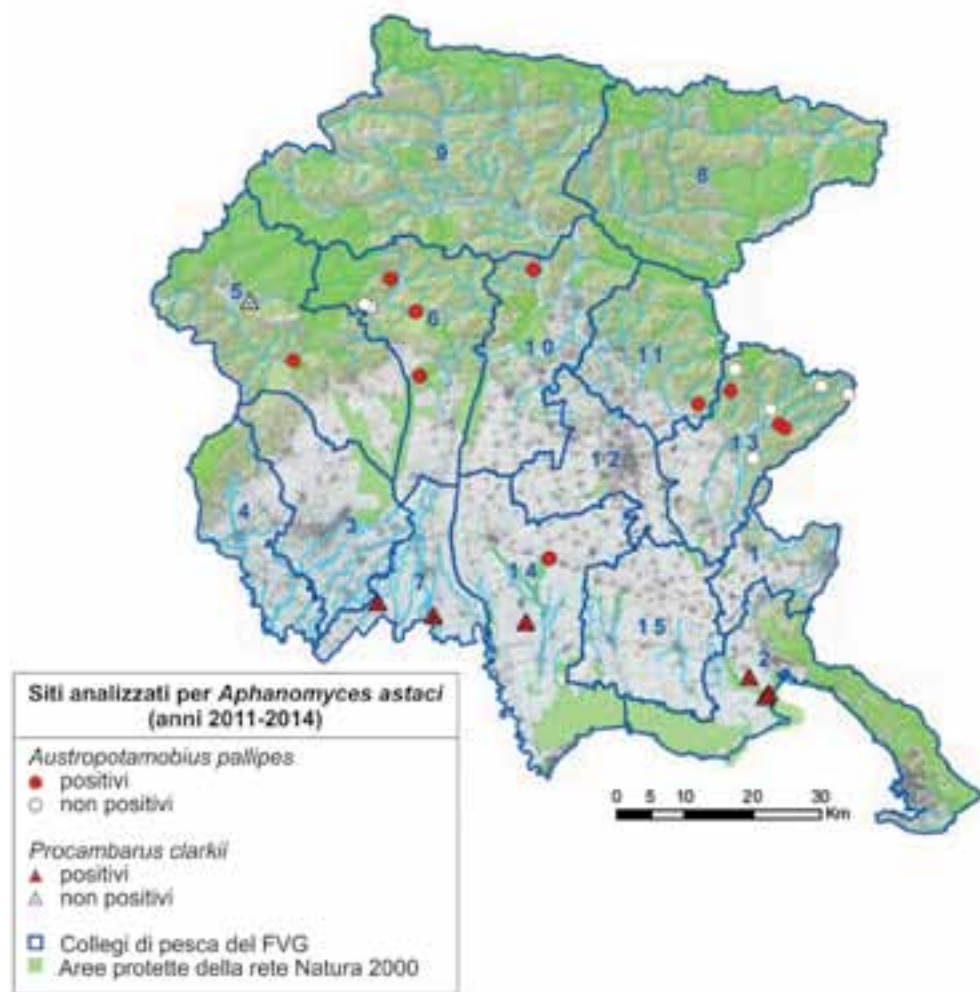


Fig. 101. Siti analizzati per la presenza di *Aphanomyces astaci* nelle popolazioni di gamberi indigene ed invasive in FVG.

Fig. 101. Analysed sites for *Aphanomyces astaci* presence in indigenous and invasive crayfish populations in FVG.

(foci dell'Isonzo) e della maggior disponibilità di esemplari. Campioni di tessuto cuticolare (pleopodi) e branchiale sono stati prelevati da 10 esemplari di *P. clarkii* provenienti da 2 siti (Alberoni e Casette) nel 2012 e da 4 siti (Alberoni, Casette, Villutta e Campomolle) nel 2013, per un totale di 58 campioni.

L'analisi molecolare per l'identificazione del DNA virale è stata effettuata mediante nested-PCR secondo il Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2012 OIE. Tutti i campioni analizzati hanno dato esito negativo.

Analisi microbiologiche e ricerca dei metalli pesanti in *Procambarus clarkii*

Procambarus clarkii è stato valutato per la possibile trasmissione attraverso il consumo alimentare, specialmente di prodotto crudo o poco cotto, di batteri agenti di tossinfezioni alimentari nell'uomo, quali *Salmonella* spp. e *Vibrio*

spp., nonché l'accumulo nei suoi tessuti di metalli pesanti quali piombo, cadmio e mercurio.

La presenza nelle acque dolci di batteri dei generi *Salmonella* e *Vibrio*, in grado di causare infezioni o tossinfezioni alimentari nell'uomo, è stata frequentemente associata a contaminazione fecale primaria (immissione diretta di scarichi fognari) o secondaria (dilavamento di suoli contaminati da liquami zootecnici). Il gambero rosso della Louisiana *P. clarkii*, a differenza della specie autoctona, è in grado di adattarsi efficacemente a corsi d'acqua di pianura eutrozzati o contaminati da reflui antropici, può quindi venire a contatto e mantenere sulla cuticola esterna e nel tratto intestinale specie batteriche patogene per l'uomo.

Il genere *Salmonella* comprende sierotipi con grado di patogenicità variabile, da forme tifoidi sistemiche (*Salmonella typhi* e *paratyphi*) a forme intestinali. Numerosi sierovar di *Salmonella enterica* sono causa di salmonellosi, infezio-

SITO ANALIZZATO ANALYSED SITE	METALLO METAL	ORGANO TARGET (pool di 50 g) TARGET ORGAN (pool of 50 g)	VALORE VALUE	LIMITI MASSIMI TOLLERATI MAXIMUM ACCEPTED LIMIT Reg. CE 1881/2006
ALBERONI	Cd	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	NON RILEVATO NOT DETECTED	0,5 ppm
		EPATOPANCREAS	0,27 ppm	
	Hg	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	0,26 ppm	0,5 ppm
		EPATOPANCREAS	0,13 ppm	
Pb	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	NON RILEVATO NOT DETECTED	0,5 ppm	
	EPATOPANCREAS	0,04 ppm		
CASETTE	Cd	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	NON RILEVATO NOT DETECTED	0,5 ppm
		EPATOPANCREAS	0,46 ppm	
	Hg	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	0,02 ppm	0,5 ppm
		EPATOPANCREAS	0,01 ppm	
Pb	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	NON RILEVATO NOT DETECTED	0,5 ppm	
	EPATOPANCREAS	0,03 ppm		
CAMPOMOLLE	Cd	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	NON RILEVATO NOT DETECTED	0,5 ppm
		EPATOPANCREAS	0,21 ppm	
	Hg	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	0,03 ppm	0,5 ppm
		EPATOPANCREAS	0,01 ppm	
Pb	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	NON RILEVATO NOT DETECTED	0,5 ppm	
	EPATOPANCREAS	0,03 ppm		
VILLUTTA	Cd	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	NON RILEVATO NOT DETECTED	0,5 ppm
		EPATOPANCREAS	0,33 ppm	
	Hg	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	NON RILEVATO NOT DETECTED	0,5 ppm
		EPATOPANCREAS	0,06 ppm	
Pb	ADDOME (muscolo + intestino) ABDOMEN (muscle + intestine)	0,05 ppm	0,5 ppm	
	EPATOPANCREAS	0,02 ppm		

Tab. 11. Risultati dell'analisi per metalli pesanti sulla parte edibile ed epatopancreas di *P. clarkii*
Tab. 11. Results of the analysis for heavy metals in the edible part and hepatopancreas of *P. clarkii*

ni del tratto gastroenterico che determinano, entro 12-72 ore dall'esposizione, diarrea, vomito, febbre e prostrazione. Il genere *Vibrio* comprende specie d'acqua dolce (*V. cholerae*) e specie d'acqua salmastra e marina (*V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*) causa d'infezioni diarroiche acute determinate da tossine batteriche che alterano l'equilibrio osmotico dell'epitelio intestinale.

Per valutare la presenza di *Salmonella* sp. e *Vibrio* sp. nella parte edibile di *P. clarkii* si è proceduto analizzando 30 esemplari da 4 siti con differenti caratteristiche idrologiche (palude con acque ferme e salmastre, laghetti e canali con acque dolci e correnti). Da ciascun esemplare, dopo eutanasia, è stata prelevata la muscolatura addominale e il tratto intestinale, separandoli dall'esoscheletro, simulando la manualità normalmente applicata in ambiente domestico. Raggiunti i 25 grammi di polpa si è proceduto con le indagini di laboratorio secondo metodo ISO 6579:2002 Cor1:2004: (E) per ricerca di *Salmonella* sp. e mediante semina del tessuto prelevato, omogenato in acqua peptonata, su terreni Agar Sangue e TCBS per l'isolamento di *Vibrio* sp.. Le colonie tipiche per *Vibrio* sono state caratterizzate fenotipicamente e in micrometodo API20E, tipizzate bio-molecolar-

mente e sono stati valutati i fattori di virulenza (TDH, TRH ecc. .). Le analisi microbiologiche per *Salmonella* sp. hanno dato esito negativo in tutti e quattro i campioni analizzati mentre i gamberi prelevati presso Alberoni (palude con acqua lievemente salmastra) hanno evidenziato la presenza di un ceppo di *Vibrio parahaemolyticus* non tossigeno. I tre campioni prelevati in siti con acqua dolce (Villutta, Campomolle e Casette) non hanno evidenziato la presenza di batteri del genere *Vibrio*.

Analisi chimiche per determinare la presenza di metalli pesanti potenzialmente tossici per l'uomo (cadmio, mercurio e piombo) sono state eseguite mediante la tecnica di assorbimento atomico su campioni di epatopancreas e di parte edibile (muscolatura addominale ed intestino) prelevati da *P. clarkii* nei medesimi 4 siti (gruppi di 30 esemplari ciascuno). Tutti i gruppi analizzati sono risultati entro i limiti di contaminazione previsti per legge dal Reg. CE 1881/2006 pari a 0,5 ppm (Tab. 11).

Questi risultati ridimensionano il rischio igienico-sanitario derivante dal consumo di *P. clarkii* provenienti dal territorio del FVG, probabilmente in virtù della buona qualità delle acque superficiali.

ASPECTS OF HEALTH AND DISEASE PREVENTION

– A. Manfrin & T. Pretto –

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
Laboratorio Nazionale di Riferimento per le malattie dei crostacei
via L. Da Vinci, 39 • I - 45011 Adria (Rovigo)
email: amanfrin@izsvenezie.it; tpretto@izsvenezie.it.

The monitoring plan of the crayfish populations performed by the ETP staff between 2012 and 2014 has allowed us to take samples for the assessment of the health status of the native *Austropotamobius pallipes* and the invasive *Procambarus clarkii*, the two crayfish species present in the streams of the Friuli Venezia Giulia region.

The health monitoring has focused on the detection of the oomycetes *Aphanomyces astaci*, the causative agent of the crayfish plague or aphanomycosis, in the species *A. pallipes* and in *P. clarkii*, and the detection of the White Spot Syndrome Virus in the red swamp crayfish (*P. clarkii*).

Moreover chemical and bacteriological analyses were performed on the edible portion of *P. clarkii*, collected from different monitoring sites in Friuli Venezia Giulia, in order to assess the possible presence of bacterial agents of food-borne diseases in humans and the accumulation of heavy metals.

Aphanomyces astaci

The crayfish plague is the most contagious and lethal disease for the species belonging to the indigenous European family Astacidae. This oomycete is a primary pathogen specialized in parasitizing the freshwater crayfish and is included in the list of 100 most invasive species in the world according to the Global Invasive Species Specialist Group of the IUCN (International Union for Conservation of Nature). Since the first report of the disease in Lombardy in 1859, *A. astaci* has spread gradually across the continental Europe leading to the collapse of the indigenous crayfish populations. *A. astaci* has a direct life cycle without intermediate hosts, it is transmitted horizontally from crayfish to crayfish by motile zoospores in water.

The zoospore adheres to the exoskeleton of the crayfish, it pierces the surface of the cuticle and spreads to the underlying tissues, forming a network of fungal aseptate hyphae. These hyphae emerge again from the cuticle, usually at the death of the host, and develop on the outside the reproductive structures called zoosporangia that release the next generation of infectious zoospores in the aquatic environment.

It is believed that this oomycete is native to North Amer-

ica and has reached host-parasite equilibrium with the species of the family Cambaridae, which comprises the red swamp crayfish. The immune response of the North American species is able to contain the fungal hyphae on the outer surface of the cuticle, thus making the crayfish resistant to the disease, but allowing the parasite to develop a new generation of infectious spores. This makes the species of the family Cambaridae efficient biological vectors of *A. astaci* infection.

The introduction in Europe of the species *Pacifastacus leniusculus*, *Orconectes limosus* and *Procambarus clarkii* during the second half of the '900, brought new strains of *A. astaci*, specifically adapted to these hosts, but extremely lethal to European crayfish of the genera *Astacus* and *Austropotamobius*. Currently in the European territory 5 strains of plague have been identified: a group A isolated from the species *Astacus astacus* referable to the first wave of plague in Europe, a group B associated with the species *P. leniusculus* imported in Sweden from Lake Tahoe (California), a group C associated with *P. leniusculus* from Lake Pitt (British Columbia), a group D associated with the species *P. clarkii* and a group E recently isolated from *O. limosus* (Kozubíková et al., 2011).

Under experimental conditions the infection by strains of *A. astaci* belonging to group A, show varying degrees of lethality for native European species, while the group D, carried by *P. clarkii*, shows always high pathogenicity for indigenous species.

The targets of the health monitoring for *A. astaci* were:

- in the invasive species *P. clarkii* to assess the presence of the pathogen and the prevalence of *A. astaci* carriers in the different sampling sites
- in the native species *A. pallipes* to verify the presence of the pathogen in the dead or moribund specimens observed during sampling, especially in the case of streams subject to recovery action with the collection of broodstock and subsequent release of juveniles; and at a later stage, in the 2014 monitoring plan, extend the evaluation of the prevalence of infection in some apparently healthy populations.

Diagnosis of *Aphanomyces astaci*

For the diagnosis of the aphanomycosis, a molecular method was initially chosen, based on end-point PCR with sequencing of the amplicons as described in the Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2012 OIE. Subsequently, for the samples taken in 2013-14, it was decided to implement a real-time PCR method (Vrålstad et al., 2009), already widely used by many research groups in Europe, which enables to increase the sensitivity of DNA detection of the oomycete. From all the specimens of *P. clarkii* and from the dead indigenous crayfish examined, small portions of the ventral abdominal cuticle, tips of the uropods, joints of the pereopods, and all the ulcerated areas with a deposit of melanin were collected. These cuticular tissues were fragmented and subjected to enzymatic digestion and extraction of the DNA, which was then analysed by the above-listed real-time PCR and/or PCR end-point.

In the monitoring performed in 2014 a non-invasive sampling technique has been employed, able to evaluate the positivity of the crayfish for the pathogen *A. astaci* through the use of a sterile swab applied on the outer surface of the animals (abdomen, uropods, basis of the limbs, cephalothorax and eyestalk). This method of sampling permitted to increase the number of *A. pallipes* examined from different populations with no evidence of mortality, without killing the animals. The isolation of *A. astaci* in culture medium RGY was successfully performed during an episode of mortality at the ETP facility of Amaro, from fragments of abdominal cuticle with evident presence of fungal hyphae. This allowed the exact identification of the genetic group through specific molecular analysis, RAPD-PCR and microsatellites, carried out in collaboration with Prof. Javier Dieguez-Urbeondo (Real Jardín Botánico-CSIC-Madrid) and Professor Frederic Grandjean (University of Poitiers) respectively.

Results of the analysis for *A. astaci*

The results obtained from the monitoring plan for *A. astaci* presence in native white-clawed crayfish *A. pallipes* in Friuli Venezia Giulia, during 2012-2014, are presented in Tab. 9. The results for the invasive *P. clarkii* are summarized in Tab. 10. The sampling sites positive for *A. astaci* in both species are highlighted in Fig. 101.

A total of 343 *P. clarkii* specimens were analysed from 4 collecting sites. The analyses were repeated during the three years of monitoring and showed, at least for one year, the presence of carrier specimens of *A. astaci* in all the sampling sites, with prevalence ranging between 3.3% and 85.0%.

For the native species *A. pallipes*, 45 specimens found dead or with injured exoskeleton were analysed between 2011 and 2013 from 15 sampling sites, detecting the presence of *A. astaci* in 6 streams. The monitoring performed in 2014 analysed 212 viable specimens from 8 sites with non-invasive method, and showed the presence of *A. astaci* carrier specimens in 6 sites. In two monitoring sites (Sequals and Medu-

na Pradis), sampled after of 1 and 2 years respectively from the first detection of the pathogen, it was possible to confirm the presence of indigenous specimens positive for *A. astaci* without evident mortality of the population. This unexpected result suggests that there is a strain of *A. astaci*, common in some indigenous populations, characterised by low pathogenicity, which is in equilibrium with the host *A. pallipes* in normal natural conditions. Specimens positive for the oomycete in fact had frequently melanin deposits on the cuticle of pereopods and abdomen, showing an immune response against the fungal hyphae similar to that observed in the North American crayfish. The maintenance in farming conditions of *A. pallipes* broodstock with *A. astaci* chronic infection, however led to an episode of crayfish plague with high mortality.

Crayfish plague at Amaro ETP facility

In the end of December 2013 an increased mortality, with symptoms related to crayfish plague (crayfish overturned on their back and paralyzed), have been observed in some tanks of the Amaro plant, where adult *A. pallipes* broodstock from 8 populations of FVG were housed. Analysis undertaken from the cuticle of some females dead in early January confirmed the presence of *A. astaci* (real-time PCR and end-point PCR with sequencing), while the bacteriological analysis of the haemolymph revealed a septicæmia from bacteria of the genus *Aeromonas*. The disease, progressively observed in all the tanks of the facility has led to an overall mortality of 99% (from December 2013 to July 2014). The attempt to isolate the oomycete from moribund specimens was successful. The colonies of *A. astaci* grown in culture were analysed to identify the genetic line of belonging by RAPD-PCR (Huang et al., 1994) and microsatellite analysis (Grandjean et al., 2014). The two methods agreed in assigning the isolates to the genetic line A, which it is believed to be related to the first outbreak of crayfish plague described in 1959. The introduction of the oomycete in the facility occurred presumably through asymptomatic carriers taken from robust white-clawed crayfish populations that were not in contact with North American crayfish. A retrospective analysis, of the specimens dead in the facility before the clear start of the outbreak, has identified the first *A. astaci* positive specimens (which died in April and September 2013) from the Valcaldà population. It is hypothesized that high crayfish density in tanks with moderate water flow has increased the number of infectious zoospores above a threshold level capable of elicit clinical symptoms and inducing mortality.

White Spot Syndrome Disease (WSSD)

The White Spot Syndrome is a viral disease of major importance in marine penaeid shrimps and can cause mortality also in freshwater decapods. The virus replicates in the epithelial tissues producing noticeable whitish spots on the cuticle of the cephalothorax in marine species. The native crayfish

A. pallipes appeared very sensitive to the infection in experimental trial and mortality in the red swamp crayfish have been reported in wild population in North America. In order to assess the presence of this virus in the territory of Friuli Venezia Giulia, the non-native species *P. clarkii* was chosen considering the data in the literature, its spread in moderately brackish waters, that favour the viral replication (mouth of the Isonzo river) and the availability of this species. Samples from cuticular (pleopods) and gill epithelium were collected from 10 specimens of *P. clarkii* from two sites (Alberoni and Casette) in 2012 and from 4 sites (Alberoni, Casette, Villutta and Campomolle) in 2013, for a total of 58 specimens. Molecular analysis for the identification of viral DNA was performed by nested-PCR according to the Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals, 2012 OIE. All samples tested were negative.

Microbiological analysis and heavy metals detection in *Procambarus clarkii*

P. clarkii was evaluated for the possible transmission of bacteria, agents of food-borne diseases such as *Salmonella* spp. and *Vibrio* spp., to humans through food consumption, especially for raw or undercooked crayfish products. The accumulation of heavy metals such as lead, cadmium and mercury in edible tissues (abdominal musculature) was also assessed. The presence of bacteria of the genus *Salmonella* and *Vibrio* in surface waters, which can cause infection or food poisoning in humans, has been frequently associated with primary faecal contamination (direct input of sewage water) or secondary contamination (leaching of soil contaminated by animal manure). The red swamp crayfish *P. clarkii*, unlike the native species, is able to adapt effectively to eutrophic lowland streams contaminated by sewage and can maintain on the outer cuticle and intestinal tract bacterial species pathogen to humans.

The genus *Salmonella* includes serotypes with variable pathogenicity, from systemic typhoid forms (*Salmonella typhi* and *paratyphi*) to intestinal forms. Many serovar of *Salmonella enterica* cause salmonellosis, infection of the gastrointestinal tract that induces, within 12-72 hours after exposure, diarrhoea, vomiting, fever and prostration. The genus *Vibrio* includes freshwater species (*V. cholerae*) and marine and brackish water species (*V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*) cause of acute diarrheal infection produced by bacterial toxins that alter the osmotic balance of the intestinal epithelium. To evaluate the presence of *Salmonella* sp. and *Vibrio* sp. in the edible portion of *P. clarkii*, bacteriological analysis was carried out from pooled samples (30 specimens each) obtained from four sites with different hydrological characteristics (marshes with standing water and brackish ponds vs canals with running freshwater). From each specimen, after euthanasia, the abdominal muscles and intestinal tract was separated from the exoskeleton, simulating the manual operation normally applied at home. A total of 25 grams of pulp were obtained

for each sampling site, and submitted to laboratory investigations according to the method ISO 6579: 2002 COR1: 2004 (E) for the detection of *Salmonella* spp.. For the isolation of *Vibrio* sp. a fraction of the pulp was homogenized in peptone water, and plated on TCBS agar and blood agar. Typical *Vibrio* colonies were phenotypically characterized, analysed by micromethod API20E, typed biomolecularly and were evaluated for the presence of virulence factors (TDH, TRH, etc...). Microbiological analyses for *Salmonella* sp. were negative in all the samples analysed while the red swamp crayfish collected at Alberoni (swamp with slightly brackish water) showed the presence of a non-toxigenic strain of *Vibrio parahaemolyticus*. The three freshwater sampling sites (Villutta, Campomolle and Casette) did not revealed the presence of bacteria of the genus *Vibrio*.

Chemical analyses to determine the presence of heavy metals potentially toxic to humans (cadmium, mercury and lead) were performed by atomic absorption technique on samples of hepatopancreas and the edible portion (abdominal muscles and intestine) of *P. clarkii* in the same four sampling sites (pools of 30 specimens each).

All groups analysed were within the limit of contamination of 0.5 ppm, as indicated by Reg. CE 1881/2006 (Tab. 11). These results seem to diminish the hypothesized sanitary risk connected to the consumption of *P. clarkii* from the territory of Friuli Venezia Giulia, probably because of the good quality of the surface waters.

BIBLIOGRAFIA/REFERENCES

- Grandjean F, Vrålstad T, Diéguez-Urbeondo J, Jelić M, Mangombi J, Delaunay C, Filipová L, Rezinciuc S, Kozubíková-Balcarová E, Guyonnet D, Viljamaa-Dirks S, Petrussek A. 2014. Microsatellite markers for direct genotyping of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci* (Oomycetes) from infected host tissues. *Veterinarian Microbiology* 170(3-4):317-24.
- Kozubíková E, Viljamaa-Dirks S, Heinikainen S, Petrussek A. 2011. Spiny-cheek crayfish *Orconectes limosus* carry a novel genotype of the crayfish plague pathogen *Aphanomyces astaci*. *Journal of Invertebrate Pathology* 108: 214-216
- Huang T-S, Cerenius L, Söderhäll K. 1994. Analysis of genetic diversity in the crayfish plague fungus, *Aphanomyces astaci*, by random amplification of polymorphic DNA. *Aquaculture* 126: 1-10
- Vrålstad T, Knutsen AK, Tengs T, Holst-Jensen A. 2009. A quantitative TaqMan MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinarian Microbiology* 137(1-2):146-55
- Global Invasive Species Specialist Group of IUCN (International Union for Conservation of Nature) <http://www.iucnredlist.org>

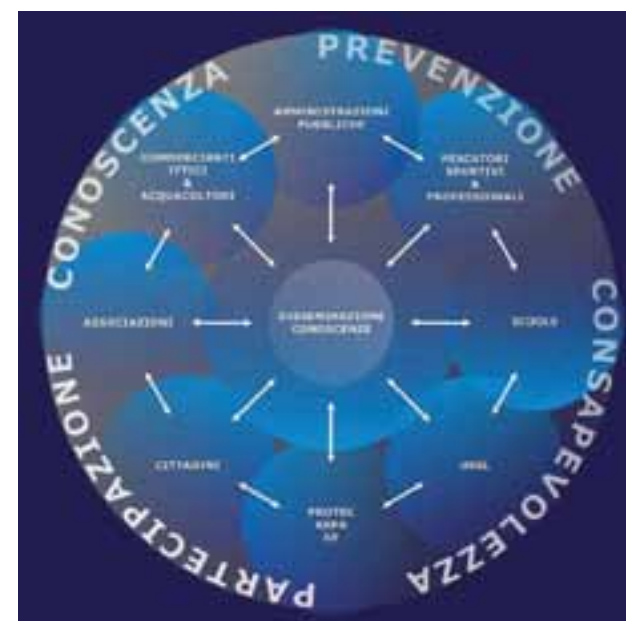


CONOSCENZA PREVENZIONE CONSAPEVOLEZZA PARTECIPAZIONE RARITY E LA SFIDA DELLA DISSEMINAZIONE

– T. Scovacricchi, F. Acri, M. Botter, D. Cassin & N. Nesto –

Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Scienze Marine
Castello, 2737/F (Arsenale Tesa 104) • I - 30122 Venezia
emai: tiziano.scovacricchi@ve.ismar.cnr.it

L'Istituto di scienze marine di Venezia ha avuto il non semplice compito di divulgare i temi RARITY nei più diversi ambiti sociali, rivolgendo la propria attenzione tanto a soggetti selezionati (che avrebbero poi fatto da "volano" e da "cassa di risonanza" informativi e conoscitivi in contesti specifici) quanto al pubblico generico.



A questa serie di azioni a largo raggio ISMAR ha molto spesso partecipato in prima persona, offrendo attraverso i propri ricercatori un contributo articolato in termini di proposte informative, ausili didattici, idee e discussione. Altre volte si è avvalso della preziosa collaborazione delle strutture e del personale ETP, col quale si sono create reti interattive ben funzionanti e sinergiche. Più in generale, infine, la disseminazione ha visto collaborare tra loro tutti i partner, in linea con un processo di collaudata relazione tra le diverse competenze ed esperienze e di attenzione agli interlocutori, che ha prodotto risultati davvero significativi.



ISMAR ha organizzato o coordinato la pianificazione di quattro convegni tenutisi a inizio e fine progetto, due dei quali dedicati ai portatori di interesse (pescatori professionali e sportivi, organizzazioni di pescatori, agenzie per la salute pubblica, commercianti di prodotti ittici, acquacoltori e ogni altro soggetto influente nei confronti di iniziative economiche o di altro tipo, quali clienti, fornitori, finanziatori, collaboratori, gruppi di vario genere) e due invece alle pubbliche amministrazioni. I convegni hanno fatto il punto della situazione riguardo al problema "gambero rosso" in Regione Friuli Venezia Giulia mettendo a confronto costruttivamente visioni, idee, prospettive sviluppate da angolazioni e soggetti diversi. L'Istituto ha contribuito inoltre attivamente alla progettazione della conferenza finale, alla quale ha voluto come ospite d'onore – per rimarcare l'elevato grado di interazione tra cambiamenti climatici e diffusione di specie aliene – il noto meteorologo Luca Mercalli.

ISMAR ha anche coordinato l'organizzazione di numerosi corsi e seminari di formazione, informazione e aggiornamento rivolti al personale direttamente coinvolto nelle operazioni di monitoraggio e cattura dei gamberi (Guardie e Collaboratori ittici ETP), ad insegnanti della scuola, Guardie forestali, Pro-

tezione civile, ARPA, Polizia provinciale, Consorzi di bonifica e diversi altri addetti al monitoraggio e alla vigilanza faunistico-venatoria e territoriale. Tali attività sono state seguite da oltre 300 persone e i relativi materiali didattici sono stati elaborati e raccolti in un manuale dal titolo "Didattica per gli operatori" che rimane così a disposizione degli addetti ai lavori e di ogni altro possibile attore interessato.



A questo ha fatto poi seguito la redazione di un secondo manuale destinato specificamente alle pubbliche amministrazioni. Esse possono qui trovare risposte ai numerosi quesiti cui sono giocoforza tenute a rispondere nel momento in cui vengano interessate dal problema delle invasioni biologiche. Il "Manuale per le Pubbliche Amministrazioni", infatti, è uno strumento tecnico-operativo a disposizione di istituzioni, organizzazioni pubbliche e amministratori, risultato dell'esperienza e della professionalità dello staff RARITY e dell'interazione con Comuni, Province, Regioni, Consorzi di bonifica ed altre numerose e diversificate entità pubbliche.



Alle attività di formazione e informazione destinate a soggetti "mirati" si sono poi aggiunte quelle di sensibilizzazione e divulgazione rivolte ad un pubblico generico.



I temi del gambero di fiume, delle invasioni biologiche, della biodiversità, sono stati portati all'attenzione di circa 6.000 studenti (bambini e ragazzi di scuole di ogni ordine e grado) e 35.000 persone che hanno visitato l'Acquario delle specie ittiche d'acqua dolce del Friuli Venezia Giulia, dell'Ente tutela pesca (ETP), ad Ariis di Rivignano (Udine), nel triennio 2012-2014.



Gli stessi temi sono stati anche disseminati e discussi:

- in occasione di innumerevoli incontri tenutisi presso scuole, biblioteche, associazioni, consorzi di bonifica, università, enti, istituti di ricerca nazionali ed internazionali, convegni, trasmissioni radio-televisive e seminari *ad hoc*;
- nel corso di interventi e con la presentazione di poster a congressi nazionali ed internazionali;
- tramite la sottoscrizione di un protocollo di intesa fra ETP, Comuni e Pro loco (sagre del gambero);

PROTOCOLLO DI INTESA

Le principali sagre del gambero che si svolgono ogni estate in Friuli Venezia Giulia (Amaro, Orcenico Superiore, Remanzacco e Saletto di Morsano al Tagliamento), le Pro Loco che le organizzano e le gestiscono e le rispettive amministrazioni comunali, sottoscrivono un significativo protocollo di intesa che impegna le Parti citate e RARITY in azioni di divulgazione dei temi di progetto, di ricerca di sinergie e coordinamento delle iniziative che hanno per oggetto il gambero di fiume e di promozione di attività che ne possano favorire la protezione e la valorizzazione. Punto qualificante del protocollo, inoltre, è che le sagre firmatarie non utilizzeranno quale prodotto edibile nell'ambito delle rispettive manifestazioni specie aliene o aliene invasive commercializzate come prodotto vivo quali il "gambero turco" *Astacus leptodactylus*, gamberi dei generi *Astacus* e *Pacifastacus*, gamberi americani appartenenti ai generi *Procambarus* e *Orconectes* e gamberi australiani del genere *Cherax*.



- attraverso la partecipazione con stand, materiali divulgativi ed acquari con esemplari vivi di gambero rosso e di gambero nativo a manifestazioni, eventi, fiere (quali ad esempio "NEAR" e "NEXT", Trieste 2013; "Artigiano in fiera", Milano 2013; "Giro d'Italia", Maniago 2014) nonché a sagre del gambero che hanno coinvolto decine di migliaia di visitatori;



- per mezzo di articoli su giornali e riviste, quali ad esempio la "Newsletter RARITY" e il Notiziario ETP "Pesca e ambiente", che hanno raggiunto, con cadenza trimestrale o quadrimestrale, oltre 1.500 persone e circa 28.000 pescatori rispettivamente;
- grazie al *networking* con altri progetti e soggetti (progetti Life ST.A.R., CRAINat e Friuli FENS, progetto SIIT, IZS Abruzzo e Molise, Provincia di Torino, Fondazione Mach, Istituto nazionale di biologia di Lubiana, Uffici per la gestione dei fiumi della Regione Carinzia, ecc ...) ed a collaborazioni che hanno, ad esempio, portato RARITY all'interno della mostra "Biodiversitas" organizzata a Udine, tra il 2013 e il 2014, dal Museo friulano di storia naturale e visitata da quasi 10.000 persone.



Un ulteriore veicolo di diffusione è stato il film RARITY “Alieni tra noi”, prodotto in 2.000 copie in formato DVD, sia in versione italiana che sottotitolata in lingua inglese. Di queste 1.500 sono già state distribuite a scuole e gruppi presso l’Acquario di Ariis e durante convegni ed incontri associati ad attività informative e formative. Il film è visionabile anche online (oltre 1.000 *internet plays*) all’indirizzo <http://vimeo.com/60482246>.



ISMAR ha anche curato la realizzazione del website RARITY (www.life-rarity.eu) preoccupandosi di arricchirlo continuamente di notizie e materiali informativi, di inserirvi moltissimi prodotti scaricabili e notizie dell’ultima ora e di tenerlo scrupolosamente aggiornato.

RARITY E CITIZEN SCIENCE

La proficua collaborazione tra lo staff RARITY dell’Università di Trieste ed il progetto SIIT (www.siit.eu) ha permesso di creare un nuovo strumento informatico interattivo che consente a cittadini e addetti ai lavori di segnalare la presenza sul campo del gambero rosso fornendo notizie sul suo ritrovamento via tablet, smartphone o PC. Tale strumento (www.gamberialieni.divulgando.eu) è accessibile già dalla pagina principale del website di progetto.



KNOWLEDGE PREVENTION AWARENESS PARTICIPATION RARITY AND THE CHALLENGE OF DISSEMINATION

– T. Scovacricchi, F. Acri, M. Botter, D. Cassin & N. Nesto –

National Research Council, Institute of Marine Sciences
Castello, 2737/F (Arsenale Tesa 104) - 30122 Venice, Italy
email: tiziano.scovacricchi@ve.ismar.cnr.it

Within the RARITY frame the Institute of Marine Sciences of Venice has been in charge of the uneasy duty to disseminate the project themes among the most different social contexts, addressing its attention both to selected targets (which in turn could produce a sort of “flywheel effect” and be a true “resonating chamber” for the diffusion of the transmitted information) and to the generic public.

ISMAR has participated to this series of comprehensive actions on its own behalf, offering through its research scientists a contribution in terms of information proposals, teaching aids, ideas and discussion. On other occasions it took advantage of the facilities and the precious collaboration of the ETP staff through interactive well-working and synergic nets. Generally speaking, the dissemination process has seen the common and effective collaboration of all partners along a tested relation among different skills and experiences and with a great attention to reached targets which produced significant results.

ISMAR organized and coordinated the planning of four meetings held at the beginning and at the end of the project. Two of these meetings have been addressed to the stakeholders (recreational and professional fishermen, fishermen organizations, public sanitary agencies, fish merchants and farmers, financiers, collaborators, diversified groups) and the other two to the public administrations. The meetings took stock of the situation about the “red swamp” problem in the Region Friuli Venezia Giulia constructively juxtaposing visions, ideas, perspectives developed from different corners and subjects. Furthermore, it actively contributed to the planning and organization of the final conference also inviting as special guest – to outline the high degree of interaction between climate changes and the diffusion of alien species – the well-known climatologist Luca Mercalli.

RARITY has organized several training courses, seminars, information and dissemination events addressed to ETP personnel (fish guards and fish collaborators) directly involved in the crayfish monitoring and capture activities, to school teachers, forest guards, the civil defence, ARPA

(regional environmental agencies), provincial police, land reclamation authorities, and several other subjects dealing with the land monitoring, surveillance and protection. These activities have been attended by more than 300 persons and teaching aids have been organized and published in a booklet titled “Didattica per gli operatori” that remains at disposal of people overseeing the territory and of any other interested actor.

This publication has been followed by a second one specifically addressed to the public administrations. Here they can find answers and suggestions to the many questions arising when the issues of biological invasions become a problem to deal with. The “Manual for the Public Administrations” in fact is a technical and operational instrument providing solutions and directives and it is the result of the experience and professionalism of the RARITY staff as well as the interaction with municipalities, land reclamation authorities and several other public entities.

Information and training addressed to selected targets have been joined by awareness raising and dissemination activities addressed to a generic public.

During the period 2012-2014, the themes of the biological invasions, the red swamp crayfish and the biodiversity have been brought to the attention of about 6,000 students (kids and teenagers from schools at all levels) and 35,000 persons which have been visiting the “Aquarium of freshwater fish species of Friuli Venezia Giulia” in Ariis di Rivignano, Udine, owned and managed by ETP.

The same themes have also been disseminated and discussed:

- during several meetings held in schools, public libraries, associations, land reclamation authorities, universities, corporations, national and international research institutes, workshops, radio-TV broadcastings and *ad hoc* seminars;
- during oral or poster presentations at national and international congresses;
- through the subscription of a significant agreement among ETP, municipalities and “Pro Loco” / “sagre del gambero” (crayfish festivals);

THE AGREEMENT

The main crayfish festivals taking place each summer in Friuli Venezia Giulia (Amaro, Orcenico Superiore, Remanzacco and Saletto di Morsano al Tagliamento), the “Pro Loco” in charge of their organization and management, and the respective municipalities have subscribed a significant agreement obligating the above mentioned subjects and RARITY to carry out common dissemination initiatives about the project themes in order to promote any possible action for the protection and valorization of the river crayfish. Moreover, a particularly qualifying article of the agreement is that the crayfish festivals will not utilize as edible products alien or invasive alien species traded as live product such as the “Turkish crayfish” *Astacus leptodactylus*, crayfishes of the genera *Astacus* and *Pacifastacus*, American crayfishes of the genera *Procambarus* and *Orconectes* and Australian crayfishes of the genus *Cherax*.

- participating with stands, information materials and aquaria containing live specimens of the red swamp and the white-footed crayfishes to exhibitions, fairs, events (such as “NEAR” and “NEXT”, Trieste 2013; “Artigiano in fiera”, Milan 2013; “Giro d’Italia”, Maniago 2014) and to crayfish festivals which have welcomed dozen thousand visitors;
- through newspaper, magazine and other publication articles such as the “RARITY Newsletter” and the ETP Journal “Pesca e Ambiente” that quarterly or four-monthly reached more than 1,500 persons and about 28,000 recreational fishermen, respectively;
- by networking with other projects and subjects (the Life

projects ST.A.R., CRAINat and Friuli FENS, the SIIT project, the “IZS Abruzzo and Molise”, the Province of Turin, the “Fondazione Mach”, the National Institute of Biology, Ljubljana, the Office for the Management of Rivers of the Carinthia Region, etc.) and collaborations which brought for example RARITY inside the exhibition “Biodiversitas” opened in Udine between 2013 and 2014 and organized by the “Museo Friulano di Storia Naturale” which had been visited by about 10,000 people.

A further dissemination vehicle has been the RARITY movie “Aliens among us”, produced in 2,000 DVD copies, both in an Italian version and in an English subtitled version. About 1,500 copies have already been distributed to schools and groups at the ETP Aquarium in Ariis and during meetings and workshops associated to information and training activities. The movie can be watched online (more than 1,000 internet plays already) at the page <http://vimeo.com/59907389>. ISMAR has also created and daily managed the RARITY website (www.life-rarity.eu) continuously adding news and information materials, and inserting lots of downloadable products and last minute news to keep it scrupulously updated.

RARITY AND THE CITIZEN SCIENCE

The collaboration between RARITY and the SIIT project (www.siit.eu) has allowed for the creation of a new and interactive IT tool which make citizens able to warn the presence of the Louisiana red swamp crayfish providing news about its finding (date and place, quantity of observed animals, pictures, etc.) through tablet, smartphone or PC. See www.gamberialieni.divulgando.eu.

RINGRAZIAMENTI

RARITY desidera ringraziare vivamente tutti coloro che, a vario titolo, hanno contribuito alla realizzazione del progetto e si sono spesi generosamente nelle molte attività svolte: docenti, ricercatori, dottorandi, studenti, amministrativi, tecnici e personale di ogni genere, ordine e grado afferente agli enti beneficiari (coordinatore e associati).

Grazie ai tanti, pazienti e preparatissimi volontari ETP: ai Colaboratori ittici Nivardo Bressani, Giulio Bruera, Alberto Bunello, Mario Burlin, Attilio Canciani, Sergio Cicuttin, Bruno Ciligot, Ugo Ciligot, Cristina Coglievina, Tiziano Croatto, Fabio De Marco, Gianluigi Delicato, Angelo Della Schiava, Riccardo Di Lenardo, Paolo Facchin, Giulio Fait, Stefano Falaschi, Plinio Federico, Oscar Galetti, Moreno Galluzzo, Monica Iacuzzo, Romero Iacuzzo, Valerio Iob, Diego Ivan, Valeriano Lendaro, Giacomo Lepore, Ugo Marcon, Tarcisio Mattioz, Giovanni Milani, Giobatta Mizzaro, Claudio Morassi, Gianni Moro, Luciano Mottes, Rino Ornella, Angelo Osualdella, Renato Pasutti, Valentino Pecile, Daniele Petrichiutto, Gianni Pilosio, Renzo Pin, Giancarlo Pizzin, Marco Presello, Fulvio Schiava, Renato Stinat, Sergio Terlicher, Fabrizio Terrenzani, Bruno Turcatel, Andrea Vettor, Renzo Vettor, Giuseppe Viola, Daniele Vogrig, Carletto Zampa, Renzo Zanel, Maurizio Zanier e alle Guardie ittiche Lucio Agrimi, Roberto Anziutti, Luciano Baldo, Franco Barbiani, Sergio Bassi, Ezio Basso, Giovannino Bearzi, Massimo Bellomo, Marina Benedetti, Paolo Bergamasco, Marcello Bernardis, Giovanni Bettagno, Lucio Bianco, Massimo Biancucci, Luca Biancuzzi, Ivo Brun, Massimo Burberi, Gino Burelli, Gabriele Buzzi, Roberto Cainero, Enrico Capitani, Piergiorgio Cecon, Arturo Cella, Nicola Cicuttin, Pierpaolo Cocianni, Alessio Codromaz, Matteo Costaperaria, Guerrino Cragolini, Massimo Dal Nin, Giancarlo Davanzo, Giuseppe Davilla, Gioacchino De Caro, Roberto De Monte, Silvio De Prato, Denis De Prato, Graziano Del Fabbro, Aldo Del Negro, Christian Della Mea, Bruno Di Giusto, Vittorino Di Gleria, Roberto Donadi, Giovanni Donazzolo, Claudio Doretto, Mario Durat, Valentino Durat, Stefano Facchin, Daniele Fantin, Michele Fattori, Davide Feroli, Gianni Raimondo Fior, Giorgio Flaibani, Lorenzo Flego, Corrado Foschi, Felice Galante, Armando Garland, Nicholas Gerion, Massimo Giavon, Luigi Giuriato, Giulia Greatti, Ezio Guerra, Luca Innocente, Giovanni Iob, Lucio Iob, Danilo Larice, Davide Lazzara, Sandro Leonarduzzi, Roberto Lizzi, Raffaele Lizzi, Giovanni Lucchese, Livio Marmolo, Alessandro Manganaro, Silvano Marini, Alessandro Mariuz, Fabrizio Marco Marsanich, Luigino Martin, Ivan Massar, Giuseppe Masutti, Matteo Mattei, Andrea Meazza, Antonio Melchiorre, Bruno Morassut, Michele Morocutti, Roberto Muscari, Loris Offoiach, Paolo Olivetto, Claudio Olivo, Stelio Padovan, Gianfranco Pala, Paolo Parisi, Gino Pascutto, Demetrio Passante, Simone Passera, Nello Perin, Bruno Petrucci, Giandomenico Pevero, Dario Pio, Elvis Pontoni, Valter Puiatti, Ales-

sandro Raganato, Piero Rossetti, Alessio Rossetto, David Santarossa, Iginio Santarossa, Silvia Santin, Elvio Scaini, Roberto Scian, Mauro Sigura, Roberto Silvestrin, Marianna Simo, Ivan Simonitto, Francesco Stefani, Angelo Stefanutti, Sandro Stefanutti, Paolo Tarnold, Domenico Tolazzi, Matteo Toller, Mirco Tonello, Luca Toso, Bruno Tosolini, Giovanni Truant, Armando Urbanetti, Franco Vaccari, Giuseppe Valdevit, Domenico Valla, Gian Luigi Verilli, Stefano Verona, Gianfranco Vignando, Federico Violati Tescari, Sergio Zampa, Dario Zanardo, Giovanni Zancan, Adriano Zanutto, Valter Zoldan, Claudio Zorzetto, Giovanni Zucchiatti, Livio Zuliani.

Grazie agli addetti agli impianti ETP per la produzione di gamberi di fiume: Marco e Paolo Fior, Daniele Moroldo, Primo Concil. Un ringraziamento particolare ai volontari Eligio Giusti, Renato Limati, Giorgio Sut e al consulente Giorgio De Luise.

Grazie alla direzione (Giovanni Petris) e alla presidenza attuale (Flaviano Fantin) e trascorsa (Loris Saldan) di ETP nonché a tutto il personale dell’Ente che ha contribuito a vario titolo al successo del progetto: Andrea Antonelli, Anna Arivella, Marylisa Baschera, Francesco Bregant, Guglielmina Cucci, Raffaella Del Frate, Piero D’Olimpio, Mariacida Gazzani, Aldo Mattia, Esterina Marseu, Claudio Nimis, Mauro Nolli, Gigliola Novello, Ugo Pannain, Clelia Plez, Claudio Sangoi, Lisa Tamos, Ornella Trevisan, Fabio Vantusso, Denis Zilli, Lida Zinutti e Ervin Zorzini.

Grazie ai membri del Consiglio direttivo ETP Silvia Battistella, Luca Baron, Virginio Battiston, Ferruccio Bulfone, Luciano Ceraolo, Giancarlo Cecchin, Monia Cocchi, Roberto De Natali, Amedeo Ellero, Giacomo Fabris, Ezio Fain, Adriano Leoni, Damiano Marcotti, Gabriele Michelutti, Michele Miolo, Federico Odorico, Rolando Passon, Maurizio Peschiulli, Claudio Polano, Valter Peres, Walter Princi, Giovanni Protti, Luigi Ricciardi, Dino Spaggiari, Francesca Tulli, Fulvio Tuti, Giuseppe Vallar e Antonello Vuan.

Grazie alla Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, in particolare a: Antonella Asquini, Daniele Bidut, Daniele Belli, Sabina Bano, Antonietta Bertossi, Marina Bortotto, Dario Cancian, Giovanni Capaldi, Michele Celant, Marina Celegon, Flavio Cimenti, Marco Contento, Giorgia Cortellezzi, Fabio Di Bernardo, Daniele De Luca, Michela Dini, Umberto Fattori, Loreto Giordani, Lorenzo Gottardo, Gianni Mighetti, Maurizio Guzzinati, Wania Moschetta, Paolo Penzo, Laura Peric, Federica Russo, Luigi Savino, Ornella Sciauzero, Raffaella Silvestri, Luciano Sulli, Silvano Tius, Paolo Verdoliva, Pierpaolo Zanchetta e Stefano Zanini.

Grazie ai consulenti esterni Giuseppe Adriano Moro, Alessandro Di Giusto e Gianmaria Sigalotti.

Grazie all'assistenza tecnico-amministrativa di progetto (Starter srl, Padova) coordinata da Giulio Volpi in collaborazione con Barbara Archesso e Laura Tizianel.

Grazie agli stagisti, ai tesisti e ai tirocinanti Martina Duse Masin, Gregor Gabalin, Irene Raffaello, Sara Simi, Mattia Trenta e Miriam Venier.

Grazie ad Amelia De Iazzari, Iryna Kuklina, Gianfranco Magris, David Mazzoni e Yelena Patlakha per il loro disinteressato aiuto nello svolgimento di alcune attività RARITY.

Grazie al personale dell'IZSve: Gabriella Conedera, Giovanni Binato, Michele Civettini, Eleonora Fiocchi, Patrizia Gambarin, Marco Sello, Serena Tiozzo, Federica Tosi.

Un ringraziamento particolare a Paolo Stefanelli, ex-direttore ETP e al personale dell'Acquario ETP di Ariis di Rivignano: Paola Zanutel, Giorgio Tonizzo, Sandro Zoccolan e Ivan Turcato, sempre totalmente disponibile e collaborativo.

Grazie al personale dell'Ospedale di Pordenone e del CRO di Aviano Mauro Trovò, Carlo Furlan, Renato Bertoli, Lorenzo Tacchini e al personale del Dipartimento di scienze biomediche sperimentali e cliniche dell'Università di Firenze Manuela Balzi e Paola Faraoni.

Grazie all'ARPA FVG per la collaborazione e lo scambio di dati, in particolare a Giorgio Matassi, Claudia Orlandi, Gabriele Piazza, Erica Rancati, Raffaella Zorza.

Grazie all'artigiano Lorenzo Possenti e all'illustratrice Anna Scovacricchi che hanno realizzato rispettivamente delle riproduzioni in scala di gamberi e dei disegni per bambini sui temi di progetto, entrambi utilizzati nelle attività di divulgazione.

L'elenco delle persone che hanno contribuito al successo di RARITY è davvero lunghissimo. Vanno citati ad esempio i Sindaci e i Presidenti o i membri di molti Comuni e Pro loco: Amaro (UD) con Laura Zanella e Silvano Tomaciello in prima fila, e poi Remanzacco (UD) con Daniela Briz e Marina Furlan, Orsenico Superiore (PN) con Giorgio Milani e Dario Venier, Saletto di Morsano al Tagliamento (PN) con Lino Ostan, Zoppola (PN), Morsano al Tagliamento (PN), Muzzana (UD), Turgnano (UD) e tanti altri ancora.

Corsi, seminari, la partecipazione a manifestazioni ed eventi non sarebbero stati possibili senza la sensibilità e il concreto aiuto di tanti enti, associazioni, istituzioni: l'Associazione piscicoltori italiani, in particolare nella persona del suo presidente Pier A. Salvador, la Biblioteca civica V. Joppi di Udine nelle persone di Cristina Marsili, Marzia Plaino e Romano Vecchiet, la Protezione civile (un grazie "speciale" a Daniela Fabrici e Giuseppe Milocco), i Corpi di polizia provinciale, il Corpo forestale

regionale (tante grazie a Paolo Benedetti e Massimo Stroppa), la scuola (grazie a Gabriella Cappuzzo, Lucia D'Andrea, Paola Davanzo, Mario Iacob, Andrea Pesce, Laura Schenato, Angela Sameda, Silvana Spessot), il Museo friulano di storia naturale (grazie davvero a Luca Dorigo, Maria Manuela Giovannelli, Paolo Glerean, Luca Lapini e Giuseppe Muscio).

Grazie ai tanti relatori e moderatori che hanno animato i numerosi convegni organizzati da RARITY: Stefano Borella, Giuseppe Canali, Giuseppe Cherubini, Ivano Confortini, Paolo Ercolini, Andrea Fabris, Giulio Ferretti, Emilio Gottardo, Simone Maldotti, Luca Mercalli, Paolo Panontin, Federico A. Pirone, Alessandra Pugnetti, Giorgio Ranghiero, Rodolfo Riccamboni, Aronne Ruffini, Stefano Salviati, Pier D. Stefanuto, Luca Triandantasio Fabio Trincardi e Sara Vito.

Grazie anche a Pianeta Zero, azienda che ha prodotto il movie di progetto Alieni tra noi, e al regista del film Giulio Kirchmayr, che con intuito e competenza ha saputo dar vita a uno strumento comunicativo di grande presa ed efficacia.

Grazie ad Alvis Rampini (Eidos) e al suo staff per il prezioso supporto grafico-editoriale.

Grazie mille alla Commissione Europea per il supporto finanziario al progetto e ai monitor e ai referenti Ioana Cazan, Laura Minniti, Iva Rossi, Stefano Grignolio e Angelo Salsi.

Vanno anche ringraziate le persone che si sono rese utili nell'approntamento di spazi e luoghi di attività, nelle amministrazioni e in moltissimi altri ambiti.

Infine grazie a tutto lo staff RARITY: Francesca Bertos, Paolo Cè, Daniele Cossa, Valentina De Rocco, Paola Lupi, Maria Rosa Mulas, Alessandro Rucli, Giuseppe Vicenzino, Massimo Zannetti (ETP) Francesco Acri, Loredana Alfari, Margherita Botter, Daniele Cassin, Alessandro Ceregato, Nicoletta Nesto, Tiziano Scovacricchi, Roberto Zonta (ISMAR), Nicolinka Antcheva, Victoria Bertucci, Anna Corrente, Paolo Edomi, Enrico Ferrero, Piero Giulianini, Chiara Manfrin, Lorena Marson, Alberto Pallavicini, Federica Piazza, Luca Peruzza (UNITS), Laura Aquiloni, Silvia Borselli, Francesco Dessì Fulgheri, Francesca Giovannelli, Alberto Inghilesi, Giuseppe Mazza, Felicità Scapini, Marco Vannini (UNIFI), Giuseppe Arcangeli, Amedeo Manfrin, Tobia Pretto, Mario Rondina, Raffaella Testolin, Paola Trolese, Michela Zambon (IZSve).

Un grazie particolare a Francesca Gherardi, che ci ha lasciato prematuramente.

Avremo certamente dimenticato qualcuno ma se ciò è avvenuto ce ne scusiamo con gli interessati ai quali ribadiamo la gratitudine di RARITY per l'aiuto e la collaborazione che hanno dato.

ACKNOWLEDGEMENTS

RARITY kindly thanks all the people from its staff which, for different reasons and in different roles, took part in the project and generously spent time and efforts in the several activities carried out: teachers, researchers, students, technicians, personnel of every kind, order and grade from the coordinating and the associated beneficiary institutions.

Thank you to the many patient, and skilled ETP volunteers, to the Fish Collaborators Nivardo Bressani, Giulio Bruera, Alberto Bunello, Mario Burlin, Attilio Canciani, Sergio Cicuttin, Bruno Ciligot, Ugo Ciligot, Cristina Cogliavina, Tiziano Croatto, Fabio De Marco, Gianluigi Delicato, Angelo Della Schiava, Riccardo Di Lenardo, Paolo Facchin, Giulio Fait, Stefano Falaschi, Plinio Federico, Oscar Galetti, Moreno Galluzzo, Monica Iacuzzo, Romero Iacuzzo, Valerio Iob, Diego Ivan, Valeriano Lendaro, Giacomo Lepore, Ugo Marcon, Tarcisio Mattioz, Giovanni Milani, Giobatta Mizzaro, Claudio Morassi, Gianni Moro, Luciano Mottes, Rino Ornella, Angelo Osualdella, Renato Pasutti, Valentino Pecile, Daniele Petrichiutto, Gianni Pilosio, Renzo Pin, Giancarlo Pizzin, Marco Presello, Fulvio Schiava, Renato Stinat, Sergio Terlicher, Fabrizio Terrenzani, Bruno Turcatel, Andrea Vettor, Renzo Vettor, Giuseppe Viola, Daniele Vogrig, Carletto Zampa, Renzo Zanel, Maurizio Zanier and to the Fish Guards Lucio Agrimi, Roberto Anziutti, Luciano Baldo, Franco Barbiani, Sergio Bassi, Ezio Basso, Giovannino Bearzi, Massimo Bellomo, Marina Benedetti, Paolo Bergamasco, Marcello Bernardis, Giovanni Bettagno, Lucio Bianco, Massimo Biancucci, Luca Biancuzzi, Ivo Brun, Massimo Burberi, Gino Burelli, Gabriele Buzzi, Roberto Cainero, Enrico Capitani, Piergiorgio Cecon, Arturo Cella, Nicola Cicuttin, Pierpaolo Cocianni, Alessio Codromaz, Matteo Costaperaria, Guerrino Cragolini, Massimo Dal Nin, Giancarlo Davanzo, Giuseppe Davilla, Gioacchino De Caro, Roberto De Monte, Silvio De Prato, Denis De Prato, Graziano Del Fabbro, Aldo Del Negro, Christian Della Mea, Bruno Di Giusto, Vittorino Di Gleria, Roberto Donadi, Giovanni Donazzolo, Claudio Doretto, Mario Durat, Valentino Durat, Stefano Facchin, Daniele Fantin, Michele Fattori, Davide Ferroli, Gianni Raimondo Fior, Giorgio Flaibani, Lorenzo Flego, Corrado Foschi, Felice Galante, Armando Garland, Nicholas Gerion, Massimo Giavon, Luigi Giuriato, Giulia Greatti, Ezio Guerra, Luca Innocente, Giovanni Iob, Lucio Iob, Danilo Larice, Davide Lazzara, Sandro Leonarduzzi, Roberto Lizzi, Raffaele Lizzi, Giovanni Lucchese, Livio Mamolo, Alessandro Mangano, Silvano Marini, Alessandro Mariuz, Fabrizio Marco Marsanich, Luigino Martin, Ivan Massar, Giuseppe Masutti, Matteo Mattei, Andrea Meazza, Antonio Melchiorre, Bruno Morassut, Michele Morocutti, Roberto Muscari, Loris Offoiach, Paolo Olivetto, Claudio Olivo, Stelio Padovan, Gianfranco Pala, Paolo Parisi, Gino Pascutto, Demetrio Passante, Simone Passera, Nello Perin, Bruno Petrucci, Giandomenico Pevero, Dario Pio, Elvis Pontoni, Valter Puiatti, Alessandro Raganato, Piero Rosset-

ti, Alessio Rossetto, David Santarossa, Iginio Santarossa, Silvia Santin, Elvio Scaini, Roberto Scian, Mauro Sigura, Roberto Silvestrin, Marianna Simo, Ivan Simonitto, Francesco Stefani, Angelo Stefanutti, Sandro Stefanutti, Paolo Tarnold, Domenico Tolazzi, Matteo Toller, Mirco Tonello, Luca Toso, Bruno Tosolini, Giovanni Truant, Armando Urbanetti, Franco Vaccari, Giuseppe Valdevit, Domenico Valla, Gian Luigi Verilli, Stefano Verona, Gianfranco Vignando, Federico Violati Tesconi, Sergio Zampa, Dario Zanardo, Giovanni Zancan, Adriano Zanutto, Valter Zoldan, Claudio Zorzetto, Giovanni Zucchiatti, Livio Zuliani.

Thanks to the ETP persons in charge of the management of the white clawed crayfish hatcheries Marco e Paolo Fior, Daniele Moroldo, Primo Concil. A special thanks to the volunteers Eligio Giusti, Renato Limati, Giorgio Sut and to the consultant Giorgio De Luise.

Thanks to the ETP Director Giovanni Petris and to the present and past ETP President, Flaviano Fantin and Loris Saldan, respectively.

Thank you also to all ETP personnel which contributed to the success of the project: Andrea Antonelli, Anna Arivella, Marylisa Baschera, Francesco Bregant, Guglielmina Cucci, Raffaella Del Frate, Piero D'Olimpio, Mariada Gazzani, Aldo Mattia, Esterina Marseu, Claudio Nimis, Mauro Nolli, Gigliola Novello, Ugo Pannain, Clelia Plez, Claudio Sangoi, Lisa Tamos, Ornella Trevisan, Fabio Vantusso, Denis Zilli, Lida Zinutti and Ervin Zorzin.

Thank you to the members of the ETP Executive Council: Silvia Battistella, Luca Baron, Virginio Battiston, Ferruccio Bulfone, Luciano Ceraolo, Giancarlo Cecchin, Monia Cocchi, Roberto De Natali, Amedeo Ellero, Giacomo Fabris, Ezio Fain, Adriano Leoni, Damiano Marcotti, Gabriele Michelutti, Michele Miolo, Federico Odorico, Rolando Passon, Maurizio Peschiulli, Claudio Polano, Valter Peres, Walter Princi, Giovanni Protti, Luigi Ricciardi, Dino Spaggiari, Francesca Tulli, Fulvio Tuti, Giuseppe Vallar and Antonello Vuan.

Thanks to the Regione Autonoma Friuli Venezia Giulia, especially in the persons of Antonella Asquini, Daniele Bidut, Daniele Belli, Sabina Bano, Antonietta Bertossi, Marina Bortotto, Dario Cancian, Giovanni Capaldi, Michele Celant, Marina Ceglieon, Flavio Cimenti, Marco Contento, Giorgia Cortellezzi, Fabio Di Bernardo, Daniele De Luca, Michela Dini, Umberto Fattori, Loreto Giordani, Lorenzo Gottardo, Gianni Mighetti, Maurizio Guzzinati, Wania Moschetta, Paolo Penzo, Laura Peric, Federica Russo, Luigi Savino, Ornella Sclauzero, Raffaella Silvestri, Luciano Sulli, Silvano Tius, Paolo Verdoliva, Pierpaolo Zanchetta and Stefano Zanini.

Thank you to the ETP external consultants Giuseppe Adriano Moro, Alessandro Di Giusto and Gianmaria Sigalotti.

Many thanks to the project external assistance Starter srl, Padua, coordinated by Giulio Volpi in collaboration with Barbara Archesso and Laura Tizianel.

Thank you to the students: Martina Duse Masin, Gregor Gabalin, Irene Raffaello, Sara Simi, Mattia Trenta e Miriam Venier.

Thank you to Amelia De Iazzari, Iryna Kuklina, Gianfranco Magris, David Mazzoni and Yelena Patlakha for their good-natured help in carrying out some project activities.

Thank you to the IZSve personnel: Gabriella Conedera, Giovanni Binato, Michele Civettini, Eleonora Fiocchi, Patrizia Gambarin, Marco Sello, Serena Tiozzo, Federica Tosi.

A special thanks to Paolo Stefanelli, ETP ex-director, and to the personnel of the ETP Aquarium in Ariis di Rivignano Paola Zanutel, Giorgio Tonizzo, Sandro Zoccolan and Ivan Turcato, always and totally ready to collaborate and help.

Thanks to the personnel of the Hospital of Pordenone and of the ORC of Aviano (PN) Mauro Trovò, Carlo Furlan, Renato Bertoli, Lorenzo Tacchini and to the staff of the experimental and clinic biomedical science of the University of Florence Manuela Balzi e Paola Faraoni.

Thanks to ARPA FVG (environmental agency) for the cooperation and for the exchange of data, in particular to Giorgio Matassi, Claudia Orlandi, Gabriele Piazza, Erica Rancati, Raffaella Zorza.

Thanks to the artist Lorenzo Possenti and to the illustrator Anna Scovacricchi, who realized some on scale reproductions of crayfish and some drawings for kids, respectively, both used in the dissemination activities.

The list of persons which contributed to the RARITY success is really very long. We have to mention majors and presidents or members of many municipalities and Pro Loco: Amaro (UD) with Laura Zanella and Silvano Tomaciello first, then Remanzacco (UD) with Daniela Briz and Marina Furlan, Orcenico Superiore (PN) with Giorgio Milani and Dario Venier, Saletto di Morsano al Tagliamento (PN) with Lino Ostan, Zoppola (PN), Morsano al Tagliamento (PN), Muzzana (UD), Turgnano (UD) and many others.

Courses, seminars, exhibitions and events would not be feasible without the sensitiveness and help of many institutions, associations and other subjects: the Associazione Piscicoltori Italiani with its president Pier A. Salvador, the Udine Civic Library V. Joppi with Cristina Marsili, Marzia Plaino and Romano Vecchiet, the Civil Defence (thanks a lot to Daniela Fabrici and Giuseppe

Milocco), the Provincial Police Corps, the Forest Guard (thanks to Paolo Benedetti and Massimo Stroppa), the school with its teachers and executives Gabriella Cappuzzo, Lucia D'Andrea, Paola Davanzo, Mario Iacob, Andrea Pesce, Laura Schenato, Angela Someda and Silvana Spessot), the Museo Friulano di Storia Naturale in the persons of Luca Dorigo, Maria Manuela Giovannelli, Paolo Glerean, Luca Lapini and Giuseppe Muscio.

Our gratitude goes to the many speakers and moderators which animated the several meetings organized by RARITY: Stefano Borella, Giuseppe Canali, Giuseppe Cherubini, Ivano Confortini, Paolo Ercolini, Andrea Fabris, Giulio Ferretti, Emilio Gottardo, Simone Maldotti, Luca Mercalli, Paolo Panontin, Federico A. Pirone, Alessandra Pugnetti, Giorgio Ranghiero, Rodolfo Riccamboni, Aronne Ruffini, Stefano Salviati, Pier D. Stefanuto, Luca Triadantasio, Fabio Trincardi and Sara Vito.

Thank you also to Pianeta Zero, the movie producing company, and to the film director of the RARITY movie Aliens among us, Giulio Kirchmayr, who by means of his intuition and skills has been able to create a communication tool of great impact and efficacy.

Thanks a lot to Alvis Rampini, Eidos, Udine, and to his staff for their precious support in graphics and editing processes.

Thanks a lot to the European Commission for its financial support as well as to the project monitors and representatives: Ioana Cazan, Laura Minniti, Iva Rossi, Stefano Grignolio and Angelo Salsi.

Acknowledgements have to be also addressed to the many persons which have been so useful in the staging and preparation of activity sites and places, and/or helping from their positions in administrations or other institutions.

Lastly thanks to all the RARITY staff: Francesca Bertos, Paolo Cè, Daniele Cossa, Valentina De Rocco, Paola Lupi, Maria Rosa Mulas, Alessandro Rucli, Giuseppe Vicenzino, Massimo Zanetti (ETP) Francesco Acri, Loredana Alfarè, Margherita Botter, Daniele Cassin, Alessandro Ceregato, Nicoletta Nesto, Tiziano Scovacricchi, Roberto Zonta (ISMAR), Nicolinka Antcheva, Victoria Bertucci, Anna Corrente, Paolo Edomi, Enrico Ferrero, Piero Giulianini, Chiara Manfrin, Lorena Marson, Alberto Pallavicini, Federica Piazza, Luca Peruzza (UNITS), Laura Aquiloni, Silvia Borselli, Francesco Dessì Fulgheri, Francesca Giovannelli, Alberto Ing-hilesi, Giuseppe Mazza, Felicità Scapini, Marco Vannini (UNIFI), Giuseppe Arcangeli, Amedeo Manfrin, Tobia Pretto, Mario Rondina, Raffaella Testolin, Paola Trolese, Michela Zambon (IZSve).

A special thanks to Francesca Gherardi, who left us prematurely.

We surely have forgotten somebody but if this has happened let us apologize and reaffirm our deep and sincere gratitude for help and collaboration.

ALLEGATI

ALLEGATO I

Legge regionale 12 maggio 1971, n. 19 (Norme per la protezione del patrimonio ittico e per l'esercizio della pesca nelle acque interne del Friuli - Venezia Giulia).

(..OMISSIS..)

Art. 6 bis * (Tutela del gambero di acqua dolce)

1. Allo scopo di tutelare e incrementare le popolazioni di gamberi di acqua dolce appartenenti alla fauna regionale, l'Ente tutela pesca promuove e attua iniziative di prevenzione e di contrasto alla diffusione delle specie invasive di gamberi.
2. Per le finalità di cui al comma 1, il Consiglio direttivo dell'Ente tutela pesca approva, apposito Piano d'azione in cui sono individuate:
 - a) le specie invasive di gamberi di acqua dolce e le aree interessate dalla loro diffusione;
 - b) le aree nelle quali si attuano interventi per contenere le specie di cui alla lettera a);
 - c) le aree nelle quali si attuano interventi per eradicare le specie di cui alla lettera a);
 - d) le tipologie degli interventi e i protocolli operativi per il monitoraggio delle specie di cui alla lettera a) e per la prevenzione dei rischi correlati.
3. Le previsioni del Piano d'azione costituiscono linee guida per la gestione della fauna ittica nelle acque interne del territorio regionale.
4. Per l'attuazione del Piano d'azione l'Ente tutela pesca promuove accordi con altri enti pubblici o con soggetti privati senza fini di lucro.
5. L'Ente tutela pesca subordina il rilascio e il rinnovo dell'autorizzazione di cui all' articolo 17 della legge regionale 25 agosto 2006, n. 17 (Interventi in materia di risorse agricole, naturali, forestali e montagna e in materia di ambiente, pianificazione territoriale, caccia e pesca), all'osservanza delle previsioni del Piano d'azione.
6. Il Piano d'azione è pubblicato sul Bollettino Ufficiale e sul sito web della Regione, nonché sul sito web dell'Ente tutela pesca. L'Ente cura la divulgazione dei contenuti del Piano e attua iniziative di informazione sui rischi connessi alla diffusione delle specie invasive di gamberi d'acqua dolce.
7. Al fine di rendere efficace l'azione di prevenzione e contrasto alla diffusione delle specie invasive di cui al comma 2, lettera a), sul territorio del Friuli Venezia Giulia è vietata la cattura a scopo di pesca sportiva e di mestiere, nonché l'immissione e il rilascio in natura di esemplari vivi appartenenti alle specie medesime.
8. Chiunque violi i divieti di cui al comma 7 è soggetto alla sanzione amministrativa pecuniaria da 25 euro a 500 euro per ogni esemplare di specie invasiva. Gli esemplari oggetto della violazione sono sempre confiscati.

(..OMISSIS..)

* Articolo aggiunto da art. 2, comma 77, L. R. 27/2012

ALLEGATO II

Misure di conservazione dei SITI Natura 2000

La rete Natura 2000 della Regione Friuli Venezia Giulia si compone di 58 Siti di importanza Comunitaria (SIC), ora classificati come Zone speciali di conservazione (ZSC) e 8 Zone di protezione speciale (ZPS). 34 ZSC e 5 ZPS ricadono nella regione biogeografica continentale mentre i rimanenti in quella alpina.

L'articolo 6 della Direttiva 92/43/CEE assegna agli Stati membri il compito di stabilire le opportune misure per evitare nelle zone speciali di conservazione il degrado degli habitat naturali e degli habitat di specie di interesse comunitario.

Il decreto del Presidente della Repubblica 8 settembre 1997, n. 357, che recepisce la Direttiva, assegna alle Regioni l'obbligo di adottare, per tali siti, adeguate misure di conservazione nonché, ove necessari, appropriati piani di gestione finalizzati alla tutela degli habitat naturali e degli habitat di specie presenti nei SIC e nelle ZPS.

La legge regionale n. 7/2008 disciplina l'iter di approvazione delle misure di conservazione e dei piani di gestione stabilendone il carattere di prevalenza rispetto a disposizioni e provvedimenti regionali e locali concernenti la stessa materia, stan- te la priorità degli obiettivi di conservazione di habitat.

Le misure di conservazione dei siti della regione biogeografica alpina sono state approvate con Delibera della Giunta regio- nale n. 2494/2011 e pubblicate sul Bollettino Ufficiale della Regione il 28/12/2011. Quelle relative ai siti della regione bio- geografica continentale sono state approvate con DGR n. 546/2013 e pubblicate sul BUR I SO del 10/04/2013. Infine con DGR n. 726/2013, pubblicata sul BUR III SO del 24/04/2013 sono state apportate alcune modifiche.

Al momento della redazione del presente documento risultano approvati anche i piani di gestione di alcuni siti, poco rilevan- ti per la conservazione dei gamberi di fiume.

Di seguito si riportano i passaggi più rilevanti e significativi, ai fini della conservazione di gamberi, delle Misure di conserva- zione sinora approvate, precisando che esiste una sostanziale uniformità tra le misure dei siti delle regioni biogeografiche continentale ed alpina.

Ai fini di una maggior comprensione, si precisa che le Misure di conservazione sono organizzate in Misure trasversali, che si applicano in tutti i siti ed in Misure di conservazione per habitat, per specie vegetali e per specie animali, che si applicano nei siti in cui l'habitat o la specie sono ufficialmente segnalati.

Le Misure sono inoltre raggruppate per tipologia di attività (Infrastrutture, Zootecnia e agricoltura, Caccia, Pesca, Turismo) e strutturate nelle seguenti categorie:

- **RE Regolamentazioni** - hanno carattere cogente, la violazione comporta una sanzione, devono essere concertate ed in linea con le normative di settore vigenti
- **GA Gestione Attiva** - linee-guida, programmi d'azione o interventi diretti
- **IN Incentivi** - attività che devono trovare copertura finanziaria all'interno di strumenti già esistenti (FEASR, FESR, FEP, LIFE)
- **MR Monitoraggi** - obbligo di Direttiva; in attesa di linee guida ministeriali e di un programma regionale di monitorag- gio
- **PD Programmi Divulgativi** - piani di divulgazione, sensibilizzazione e formazione

MISURE DI CONSERVAZIONE TRASVERSALI, valide per tutti i siti:

- tipologia PESCA:
 - **RE:** Divieto di effettuare immissioni ittiche ad eccezione degli interventi di ripopolamento con soggetti apparte- nenti a specie autoctone provenienti da allevamento o da cattura nel
 - tipologia INDIRIZZI GESTIONALI E DI TUTELA DELLE SPECIE E HABITAT:
 - **RE:** Divieto di reintroduzione, introduzione e ripopolamento in natura di specie e popolazioni non autoctone (art. 12 DPR 357/1997)
 - **RE:** Divieto di cattura, immissione, allevamento e detenzione di crostacei decapodi alloctoni dei generi *Procamba- rus*, *Orconectes*, *Pacifastacus* e *Cherax*
 - **GA:** Definizione da parte dell'ente gestore del sito, in accordo con gli enti cui è assegnata la funzione della gestio- ne del patrimonio faunistico o floristico, di:
 - specie alloctone-invasive e delle aree oggetto di eradicazione/contenimento;
 - aree in cui, a seguito del contrasto alle specie alloctone, sia opportuno o necessario provvedere con interventi di *restocking*;
 - progetti/azioni di rafforzamento delle popolazioni esistenti o di reintroduzione per specie vegetali o animali di interesse conservazionistico;

- programmi di eradicazione progressiva di specie alloctone che mettano a rischio la conservazione di fauna e flo- ra autoctone.
- **GA:** Realizzazione di interventi in deroga finalizzati al controllo numerico delle specie problematiche e/o dannose, laddove la distribuzione di queste specie possa influenzare negativamente la conservazione di specie ed habitat di interesse comunitario, nel rispetto delle vigenti normative in materia;
- **GA:** (Limitatamente alle Misure di conservazione dei siti della regione biogeografica continentale). Individuazione di interventi specifici per il ripristino degli habitat acquatici e ripariali idonei al recupero della funzionalità ecologi- ca dei corsi d'acqua tesi a ripristinare condizioni adatte alla ricolonizzazione e riproduzione da parte di specie di in- teresse comunitario storicamente presenti
- tipologia MONITORAGGI
 - **MR:** Monitoraggio delle specie di allegato II della Direttiva *Habitat* secondo modalità e criteri definiti dal Program- ma regionale di monitoraggio degli habitat e delle specie Natura 2000.
 - **MR:** Monitoraggio delle specie floristiche e faunistiche alloctone secondo modalità e criteri definiti dal Program- ma regionale di monitoraggio degli habitat e delle specie Natura 2000.

MISURE DI CONSERVAZIONE PER SPECIE ANIMALI - CROSTACEI *Austropotamobius pallipes* (Gambero di fiume) e *A. tor- rentium* (Gambero di torrente),

- **RE:** Divieto di qualsiasi forma di cattura o uccisione deliberata di esemplari di tali specie nell'ambiente naturale, sal- vo provvedimenti di deroga previsti dalle vigenti disposizioni comunitarie, nazionali e regionali
- **GA:** Segnalazione dei casi di mortalità anomala all'Ente tutela pesca (ETP) ed all'Istituto Zooprofilattico Sperimen- tale (IZS).

ALLEGATO III

Legge regionale 23 aprile 2007, n. 9 (Norme in materia di risorse forestali)

(..OMISSIS..)

Capo IV

Sezione I

Tutela della flora e della fauna di importanza comunitaria e di interesse regionale

Art. 59 (Divieti)

(..OMISSIS..)

3. Fermo restando quanto previsto dalle norme sulla tutela della fauna selvatica omeoterma e fatti salvi i casi di prelievo legittimamente autorizzati, per le specie animali di cui all'allegato IV della direttiva 92/43/CEE, nonché di quelle di inte- resse regionale elencate nel regolamento sulla flora e fauna è fatto divieto di:
 - a) catturare o uccidere intenzionalmente esemplari di tali specie nell'ambiente naturale;
 - b) perturbare deliberatamente tali specie, in particolare durante tutte le fasi del ciclo riproduttivo o durante l'ibernazio- ne, lo svernamento e la migrazione;
 - c) distruggere intenzionalmente o raccogliere le uova e i nidi nell'ambiente naturale;
 - d) danneggiare intenzionalmente o distruggere i siti di riproduzione o le aree di sosta;
 - e) detenere, scambiare, trasportare e commerciare esemplari o parti di essi, in qualsiasi stadio di sviluppo.
4. I divieti di cui al comma 3 si riferiscono a tutte le fasi del ciclo biologico delle specie animali di cui al comma medesimo.
5. È vietato introdurre nell'ambiente naturale specie animali o vegetali non appartenenti alla flora o alla fauna regionali, fatto salvo quanto previsto dall'articolo 12 del regolamento emanato con decreto del Presidente della Repubblica 357/1997, e successive modifiche.

(..OMISSIS..)

Art. 65
(Sanzioni)

1. Salvo che il fatto non costituisca reato, chiunque violi le disposizioni di cui all'articolo 59, commi 1 e 3, è soggetto alla sanzione amministrativa pecuniaria da 25 euro a 500 euro per ogni esemplare o parte di esemplare oggetto della violazione. I minimi e i massimi edittali sono raddoppiati qualora si tratti di specie contemplate nell'allegato IV della direttiva 92/43/CEE. La sanzione è triplicata nel minimo e nel massimo edittale qualora oggetto o danno conseguente alla violazione siano specie definite prioritarie dalla direttiva 92/43/CEE.
(...OMISSIS...)
3. Salvo che il fatto non costituisca reato, la raccolta della flora e della fauna di importanza comunitaria e di interesse regionale in violazione alle disposizioni della presente sezione e del relativo regolamento comporta altresì il sequestro amministrativo.
4. Gli esemplari di fauna vivi oggetto di sequestro amministrativo sono tempestivamente rilasciati in località idonee, qualora questo sia compatibile con le loro esigenze ecologiche e il loro stato di salute.
5. Chiunque violi le disposizioni di cui all'articolo 59, comma 5, è soggetto alla sanzione amministrativa pecuniaria da 25 euro a 500 euro per ogni esemplare di specie alloctona immesso nell'ambiente naturale. La sanzione è triplicata nel minimo e nel massimo edittale qualora l'introduzione avvenga all'interno di un sito designato ai sensi delle direttive 79/409/CEE e 92/43/CEE.
(...OMISSIS...)

Decreto del Presidente della Regione 20 marzo 2009, n. 074/Pres.
(Regolamento per la tutela della flora e della fauna di importanza comunitaria e di interesse regionale, in esecuzione dell'articolo 96 della legge regionale 23 aprile 2007, n. 9 (norme in materia di risorse forestali))

(...OMISSIS...)

Art. 10
(Fauna di interesse regionale)

1. Ai sensi dell'articolo 59, comma 3, della legge regionale 9/2007 e ai fini del presente regolamento, fatte salve le specie incluse nell'allegato IV della direttiva 92/43/CEE, è di interesse regionale la fauna selvatica di cui all'allegato G.

(...OMISSIS...)

Allegato G (articolo 10)

Fauna di interesse regionale della Regione Friuli Venezia Giulia

(...OMISSIS...)

- c) Crostacei:
 - i) *Austropotamobius* spp. e *Astacus* spp. (Gamberi d'acqua dolce)
 - ii) *Potamon fluviatile* Herbst (Granchio di fiume)

(...OMISSIS...)

ANNEXES

ANNEX I

Regional law no. 19 of May 12, 1971
(Regulations for the protection of fish stocks
and for fishing in inland waters of Friuli - Venezia Giulia).

(...OMISSIS...)

Art. 6 bis *
(Protection of freshwater crayfish)

1. In order to protect and enhance the populations of freshwater crayfish belonging to the regional fauna, the Ente tutela pesca [Fish Protection Agency] promotes and develops initiatives to prevent and combat the spread of invasive species of crayfish.
2. For the aims of paragraph 1, the Board of Directors of the Ente tutela pesca approves a specific action plan in which the following are identified:
 - a) invasive species of freshwater crayfish and areas affected by their diffusion;
 - b) the areas in which measures shall be taken to control the species referred to in subparagraph a);
 - c) the areas in which action can be taken to eradicate the species referred to in subparagraph a);
 - d) the types of operations and operating protocols for the monitoring of the species referred to in subparagraph a) and for the prevention of the related risk.
3. The provisions of the Action Plan constitute guidelines for the management of freshwater fauna in inland waters of the region.
4. For the implementation of the Action Plan, the Ente tutela pesca promotes agreements with other public or nonprofit private entities.
5. For granting and renewal of the authorization referred to in Article 17 of regional Law no. 17 of August 25, 2006, the Ente tutela pesca requires compliance with the provisions of the Action Plan.
6. The Action Plan is published in the Official Gazette and on the website of the Region, and on the website of the Ente tutela pesca. The Ente tutela pesca circulates the contents of the Action Plan and implements information campaigns on the risks of the spread of invasive species of crayfish.
7. In order to improve the effectiveness of preventing and combating the spread of invasive species referred to in paragraph 2, letter a) in Friuli Venezia Giulia it is prohibited to capture live specimens of those species, both for sport and professional fishing, and the introduction and the freeing of the same specimens into the wild are banned.
8. Anyone who violates the prohibitions referred to in paragraph 7 is subject to a fine of between € 25 and € 500 for each specimen of invasive species. The specimens are always confiscated.

(...OMISSIS...)

* Article added by Art. 2, section 77 of Regional Law 27/2012

ANNEX II

Measures for the conservation of the Natura 2000 sites

The Natura 2000 network of Friuli Venezia Giulia includes 58 Sites of Community Importance (SCIs), now classified as Special Areas of Conservation (SACs), and 8 Special Protection Areas (SPAs). 34 SACs and 5 SPAs are included in the continental bio-geographical region while remaining within the alpine one.

Article 6 of Directive 92/43/EEC requires the Member States to determine appropriate measures to avoid, in the special areas of conservation, the deterioration of natural habitats and the habitats of species of Community interest. Presidential Decree no. 357/1997, which implements the Directive, lays down an obligation for the regions to adopt, for such sites, appropriate conservation measures and, where necessary, appropriate management plans aimed at the protection of natural habitats and the habitats of species present in the SACs and in SPAs. As the objectives of conservation of the habitats are priority, the law governing the approval procedures of the conservation measures and of management plans decrees that these prevail against regional and local provisions on the same subject.

The measures for the conservation of sites of the alpine bio-geographical region were approved by Resolution of the Regional Council no. 2494/2011 and published in the Official Bulletin of the Region (OBR) on 28/12/2011. Those relating to sites included in the continental bio-geographical region were approved by DGR 546/2013 and published in the OBR 1st Ordinary supplement (OS) on 04/10/2013. Finally with DGR 726/2013, published on 04.24.2013 in BUR III OS some changes were made.

At the time of writing of this document the management plans of some SACs are also approved, although they are of minor relevance for the conservation of freshwater crayfish.

Below are described the most relevant and significant approved measures for the conservation of crayfish. Note that there is a substantial correspondence between the measures of the sites of continental and alpine bio-geographical regions.

In the interests of better understanding, we point out that conservation measures are structured into "transverse measures", which concern all sites, and measures for the conservation of the habitat for plant species and animal species, which are applied in the sites where the habitats or species are officially reported.

The measures are also grouped by type of activity (infrastructure, livestock and agriculture, hunting, fishing, tourism) and structured in the following categories:

- **RE regulations** - have binding force, violation carries a penalty, must be concerted and in line with the relevant legislation in force
- **Active Management GA** - guidelines, action plans or direct interventions
- **Incentives IN** - activities that need to find funding within existing instruments (EAFRD, ERDF, EFF, LIFE)
- **MR Monitoring** - requirement of the Directive; pending ministerial and regional guidelines for monitoring.
- PD educational programs - plans for dissemination, awareness and training

Transverse CONSERVATION MEASURES, for all sites:

- FISHING type:
 - **RE:** ban on releasing freshwater fauna with the exception of those used for restocking with native species coming from breeding or capture in the same stream, and unless otherwise indicated in the management plan.
 - Type GUIDELINES FOR MANAGEMENT AND CONSERVATION OF SPECIES AND HABITATS
 - **RE:** prohibition of re-introduction, introduction and restocking in the wild with non-indigenous species and populations (Art. 12 Pres. Decree no. 357/1997)
 - **RE:** Prohibition of capture, release, breeding and possession of alien decapod crustaceans of the genera *Procambarus*, *Orconectes*, *Pacifastacus* and *Cherax*
 - **GA:** Identification, by the managing body of the Site, in accordance with the authorities assigned to the function of the management of fauna or flora, the following:
 - Invasive alien species and areas subject to eradication / containment;
 - Areas where, due to the contrast with the non-native species, it is appropriate or necessary to provide interventions for restocking;
 - Projects / actions to strengthen existing populations or reintroduction of plant or animal species of conservation concern;
 - Programs for the progressive eradication of non-native species that jeopardize the conservation of native flora and fauna.
 - **GA:** Implementation of measures aimed at the control of the species that create harmful impacts, in those sites in

which their spread may threaten the conservation of species and habitats having Community interest, in compliance with the current legislation GA;

- **GA:** (only for the continental bio-geographical region). Identification of specific actions to restore riparian and aquatic habitats and to restore the ecological functions of streams, aimed at re-establishing environmental conditions for the re-colonization and reproduction of the species of Community interest recorded in the past in those sites
- type MONITORING
 - **MR:** Monitoring of the species of Annex II of the Directive 92/43/EEC in accordance with procedures and criteria established by the "Regional Natura 2000 habitats and species monitoring Program".
 - **MR:** Monitoring of flora and fauna non-native species in accordance with procedures and criteria established by the "Regional Natura 2000 habitats and species monitoring Program".

CONSERVATION MEASURES FOR ANIMAL SPECIES - CRUSTACEAN (*Austropotamobius pallipes* (White clawed crayfish) e *A. torrentium* (Stone crayfish)

- **RE:** Prohibition of all deliberate capture or killing of specimens of these species in the wild, not including the exceptions provided in the existing Community, national and regional regulations
- **GA:** Reporting of cases of abnormal mortality to the Ente tutela pesca (ETP) and Institute (IZS).

ANNEX III

Regional law no. 9 of April 23, 2007 (Forestry regulations)

(..OMISSIS..)

Chapter IV

Section I

Protection of flora and fauna species having Community and regional importance

Art. 59 (Prohibitions)

(..OMISSIS..)

3. Without prejudice to the provisions on the protection of game and with the exception of authorized hunting cases, the species listed in Annex IV of the Directive 92/43/EEC and those having regional interest listed in the regional Regulation on flora and fauna, it is prohibited to:
 - a) deliberately capture or kill specimens in the wild;
 - b) deliberately disturb, especially during all reproductive phases or during hibernation, wintering and migration;
 - c) destroy or intentionally collect eggs and nests in the wild;
 - d) intentionally damage or destroy breeding sites or presence areas;
 - e) possess, exchange, trade and transport specimens or their parts, at any phase of development.
4. The prohibitions listed in comma 3 are referred to all phase of the life of specimens of the species referred to that subparagraph.
5. It is forbidden to release into the wild animal and plant species extraneous to regional flora or fauna, except as provided in Article 12 of Presidential decree no. 357/1997.

(..OMISSIS..)

Art. 65
(Fines)

1. Unless the act constitutes a crime, anyone who violates the provisions of Article 59, paragraphs 1 and 3 shall be liable to a fine of between € 25 and € 500 for each specimen or its part as prohibited. The minimum and maximum shall be doubled if the species is listed in Annex IV of Directive 92/43 / EEC. In case of priority species referred to in Directive 92/43/EEC the fine is tripled.
(...OMISSIS...)
3. Unless the act constitutes a crime, the specimens of flora and fauna species having Community and regional interest illegally picked or caught are seized.
4. The live specimens of fauna seized shall be promptly released into the wild in sites in the presence of environmental conditions compatible with their ecological needs and their state of health.
5. Anyone who violates the provisions of Article 59, paragraph 5, shall be liable to a fine of between € 25 and € 500 for each specimen of non-native species introduced into the wild. The fine is tripled if the specimens are released within a site designated pursuant to Directives 79/409 / EEC and 92/43/EEC
(...OMISSIS...)

Regional Presidential Decree no. 074/Pres. of March 20, 2007
(Rules for the protection of fauna and flora having Community and regional interest,
pursuant to Article 96 of Regional Law no. 9 of April 23, 2007 (Forestry regulations))

(...OMISSIS...)

Art. 10
(Regional interest fauna)

1. Pursuant to Article 59, paragraph 3 of Law 9/2007 and for the purposes of this Regulation, the species included in Annex IV of the Directive 92/43 / EEC and the fauna species listed in Annex G are considered as species having regional interest.
(...OMISSIS...)

Annex G (article 10)

Regional interest fauna of the Friuli Venezia Giulia Region

(...OMISSIS...)

- c) Crustaceans:
 - i) *Austropotamobius* spp. e *Astacus* spp. (freshwater crayfish)
 - ii) *Potamon fluviatile* Herbst (freshwater crab)

(...OMISSIS...)