



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

**PRODUZIONE SEMINTENSIVE DI GIOVANILI DI SPECIE MARINE DA ACQUACOLTURA BIOLOGICA
(*Sparus aurata* come caso di studio).**

Acronimo: PROSEGAB

II Relazione semestrale

MONITORAGGIO DELLE ATTIVITÀ

Le attività svolte nel secondo semestre vengono di seguito riportate, per ogni *Working Package* (WP). Per favorire la lettura, sotto ogni intestazione dei vari WP è stato riportato il razionale che lo sottintendeva (così come riportato nel programma approvato), in corsivo. Gli obiettivi si riferiscono a quanto riportato nel programma di ricerca approvato.

WP1: Impostazione delle modalità sperimentali

Le attività previste sono di supporto al raggiungimento dell'obiettivo A, in particolare A.1 (ottenimento di uova da riproduttori biologici). A tal fine occorre predisporre le condizioni di allevamento per poter disporre di riproduttori definiti biologici secondo le norme contenute nel Regolamento CE 710/2009 che prevedono un allevamento in regime di produzione biologica per almeno tre mesi prima dell'utilizzo per la riproduzione. Pertanto in questa fase, oltre ad aggiornare la ricerca bibliografica di riferimento, verranno individuati regimi alimentari biologici ottimali per riproduttori e giovanili di orata.

A partire dall'inizio di ottobre sono stati costituiti i due stock di riproduttori di orata atlantica da destinare uno all'alimentazione biologica, l'altro a quella convenzionale, come previsto dal protocollo sperimentare. L'utilizzo del ceppo atlantico di orata è ormai pratica diffusa negli impianti Mediterranei per la sua maggior tolleranza alle basse temperature invernali. Un totale di 34 individui (peso medio 2 kg) è stato selezionato ed immesso in ognuna di due vasche rettangolari (3mx7mx1,5m) identiche di cemento, con una disponibilità di volume di 30 m³, situate all'aperto, ad una densità stimata di 2,7 kg/m³, ben al di sotto rispetto al coefficiente di densità massimo pari a 15 kg/m³ previsto dal regolamento CE 710/09. La *sex ratio* di 1:1 è stata ottenuta identificando i maschi e le femmine con parere esperto, basato sulle differenze di taglia tra i due sessi (l'orata è un ermafrodita proterandrico), eliminando così di stressare gli animali con le biopsie.

Il fotoperiodo è naturale ed il ricambio giornaliero con acqua di mare è maggiore del 100%.

L'andamento della temperatura nelle due vasche ha rispecchiato quello dell'acqua di mare, fino al primo evento di deposizione avvenuto il 16 dicembre. A partire da quella data, l'acqua di mare è stata miscelata con acqua di pozzo salina, con le stesse caratteristiche chimiche e fisiche dell'acqua di mare ma costantemente a 21°C, in quantità tale da mantenere un *range* compreso tra i 17,5° ed i 18°C (*range* di temperatura in cui si verifica la riproduzione naturale in orata).

L'ossigeno disciolto è maggiore del livello di saturazione ed è compreso tra i 6 e gli 8 ppm.

WP2: Verifica dell'applicabilità di un protocollo di alimentazione biologica a riproduttori di specie ittiche marine eurialine

In questo WP sono comprese le attività finalizzate al raggiungimento dell'obiettivo A e le attività previste sono quelle definite come A.1 (ottenimento di uova da riproduttori biologici), A.2 (valutazione della qualità delle uova ottenute da riproduttori biologiche e confronto con quelle ottenute da riproduttori convenzionali) e A.3 (valutazione integrata dei dati produttivi, economici e biologici ottenuti ai fini della valutazione degli effetti del regime alimentare dei riproduttori sulla produttività economica e biologica in avannotteria): in pratica si predisporrà un modulo di allevamento sperimentale per riproduttori biologici e la qualità delle uova da essi ottenuta verrà confrontata con quella delle uova ottenute parallelamente da riproduttori alimentati con alimenti tradizionali nello stesso impianto.

La dieta *convenzionale* (OC1) per i riproduttori nel periodo pre-riproduttivo è a base di gamberi ed alaccie congelati e sminuzzati, mentre ai riproduttori destinati al biologico (OB1) è stato somministrato un mangime certificato biologico. Non essendo attualmente presente in commercio un mangime biologico specifico per riproduttori di orata è stato utilizzato un mangime biologico specifico per l'ingrasso dell'orata: Ecolife Pearl 864 6,5 mm prodotto dalla Biomar. Tale mangime con certificazione biologica ISO, GLOBALG.A.P., e QUALITÈ-FRANCE presenta concentrazioni di vitamina E e di acidi grassi che sono state considerate compatibili con le esigenze nutrizionali dei riproduttori. Gli allegati 1 e 2 riportano rispettivamente i valori nutrizionali del mangime e le certificazioni ottenute.

In entrambe le vasche la quantità di alimento somministrato ha variato, in accordo con la temperatura, tra il 3 ed il 5 % della biomassa dei riproduttori.

L'alimentazione con mangime biologico (OB1) e convenzionale (OC1) ha avuto inizio il 17/10/2011, in entrambe le vasche, ed è tuttora in corso.

A partire dal 17/01/2012 (data in cui è terminato il periodo minimo di tre mesi di regime alimentare biologico richiesto dal regolamento europeo N. 710/09 per l'ottenimento di uova biologiche) è stato quindi ottenuto un parco riproduttori biologico ed uno convenzionale.

Entrambi i gruppi di riproduttori hanno iniziato a deporre spontaneamente e regolarmente dal 16 dicembre.

WP3: Contributo alla costruzione di un protocollo per avannotterie biologiche di specie ittiche marine eurialine

Scopo di questo WP è chiarire, con un caso di studio, la possibilità di applicazione dei principi del biologico sulla produzione di novellame, capitolo ancora incerto del regolamento, suscettibile di evoluzioni nei prossimi anni (Obiettivo B – attività B.2). In particolare, le larve ottenute dalla schiusa da uova biologiche verranno allevate con la tecnica dei Grandi Volumi. Questo approccio si basa su un sistema controllato sviluppato per ricreare il più possibile le condizioni ambientali presenti nelle nursery naturali.

Nella prima settimana di febbraio è prevista la raccolta di uova dai due gruppi di riproduttori e la loro incubazione in condizioni identiche.

Alla schiusa, le larve ottenute dai riproduttori OC1 e quelle dagli OB1 verranno suddivise in due gruppi, destinati all'allevamento larvale in condizioni intensive (allevamento larvale 'convenzionale') e nei Grandi Volumi (allevamento larvale 'biologico').

WP4: Valutazione in orata degli effetti della densità e dei volumi di allevamento delle larve e dei giovanili e della qualità dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità e il benessere dei pesci

Questo WP riguarda le attività finalizzate al raggiungimento dell'obiettivo B: in particolare quelle inerenti le attività B.1 (analisi fisiologiche), B.3 (valutazione delle performance produttive del novellame biologico) e B.4 (applicazione di tecniche di intelligenza artificiale (SOMs) e costruzione di un modello globale, multi-approccio e dinamico, dei diversi descrittori di stato e di processo che sono alla base della identificazione/descrizione/sintesi di un protocollo di allevamento larvale "biologico").

B.4 Messa a punto del monitoraggio "multidimensionale" di controllo:

1) analisi degli effetti dell'alimentazione dei riproduttori sulla qualità delle uova

Da ogni gruppo di riproduttori, verrà effettuato un campionamento di uova al momento della raccolta (inizio sviluppo embrionale) e un altro all'inizio della fase di schiusa; le larve verranno campionate alla schiusa, per condurre le analisi previste dal protocollo.

2) studio della forma e delle anomalie scheletriche

Durante il periodo compreso tra il 29/06/2011 ed il 26/07/2011 sono stati prelevati presso "Acquacoltura Lampedusa" una serie di campioni di giovanili di orata provenienti da uova deposte da riproduttori mantenuti secondo il protocollo convenzionale. I campionamenti sono stati effettuati sia al termine della fase di allevamento larvale che durante la fase di preingrasso ed hanno riguardato lotti di giovanili di diversa età, allevati con la metodologia dei Grandi Volumi e in intensivo (denominati Piccoli Volumi; tab.1). Questo campionamento, non previsto nel progetto, è stato effettuato al fine di verificare la necessità di modificare il protocollo di fissazione dei campioni destinati agli studi morfometrici, per identificare i landmarks descrittivi della forma e per ampliare il dataset di dati relativi alle anomalie di sviluppo.

Tabella 1 – lotti di giovanili di orata di diverse età provenienti da Grandi Volumi (GV) e piccoli volumi (PV)

codice identificativo	PV2	GV5	GV9	PV13	PV17	GV21	GV29
età (gg)	49	98	88	33	33	33	110
provenienza	PV	GV	GV	PV	PV	GV	GV
n. individui	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120

Un campione di 340 individui afferenti a tre dei lotti allevati in Grandi Volumi (GV5, GV9 ed GV29 – vedi Tab. 2) è stato processato come segue:

- ciascun individuo, fissato in formalina al 10% (in tampone fosfato 0,1M, pH 7,5) è stato fotografato in aspetto laterale sinistro per mezzo di una Nikon D3X montata su uno stativo di precisione, e numerato;
- di ciascun individuo sono state rilevate la lunghezza totale (LT) e standard (LS);
- ciascun esemplare è stato diafanizzato e soggetto a colorazione selettiva per ossa e cartilagini secondo il metodo di Park e Kim modificato (1984).

Tabella 2 – Numero di individui (N), età e lunghezza standard (LS) media dei lotti analizzati

Lotto	N	Età (gg)	LS (mm)
GV5	120	98	19,1±3,8
GV9	120	88	18,3±2,5
GV29	100	110	3,03±2,9

L'analisi della forma, attualmente in corso, prevede il rilevamento di 17 *landmarks* omologhi di I e II tipo (Bookstein, 1991) e sei *semi-landmarks* (Zelditch *et al.* 2004; Perez *et al.* 2006); questi ultimi, a differenza dei *landmarks*, vengono automaticamente selezionati lungo il profilo tracciato da due punti di riferimento, rappresentati da *landmarks* omologhi, mediante il programma TpsDig 2.10 (Rohlf, 2006). I *landmarks* dipendenti da altri punti sono detti *semi-landmarks*, poiché possono essere selezionati esclusivamente lungo il profilo specificato, il che comporta una riduzione di un grado di libertà. I *semi-landmarks* utilizzati sono anche detti *sliding landmarks*, poiché ad essi è consentito il movimento lungo il profilo, al fine di minimizzare parametri quali la *bending energy* o le distanze di Procruste (Zelditch *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2006). Il modello utilizzato per il rilevamento di entrambi i tipi di *landmarks* nei giovanili di orata è rappresentato in figura 1.

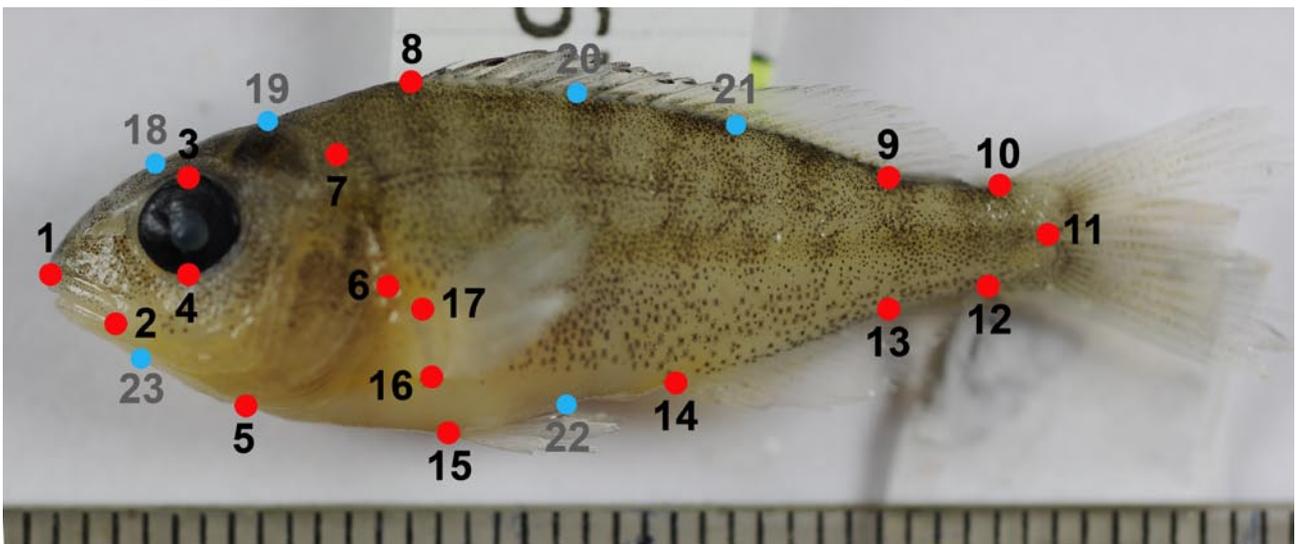


Figura 1. Modello dei 17 *landmarks* (in rosso, numerati da 1 a 17) e 6 *semi-landmarks* (in blu, numerati da 18 a 23), utilizzato per la descrizione della variazione della forma nei giovanili di orata.

Landmarks e *semi-landmarks* saranno successivamente convertiti in coordinate della forma mediante una procedura iterativa detta *General Procrustes Superimposition* (Rohlf e Slice, 1990). Le tecniche di *superimposition* realizzano una sovrapposizione iterativa ottimale di ogni individuo (target) su un altro individuo considerato di riferimento, in modo che i loro rispettivi *landmarks* si allineino il più possibile. I residui sono poi analizzati con la funzione di interpolazione *thin plate spline* (TPS) (Bookstein, 1991), una tecnica di deformazione parsimoniosa che predice le differenze di forma tra la configurazione di riferimento e la configurazione target. Questa funzione minimizza l'energia richiesta per la deformazione (energia di curvatura o *bending energy*). L'energia ideale richiesta per tale deformazione viene espressa mediante la matrice di energia di curvatura

(*bending energy matrix*), generata invertendo una matrice ottenuta dalle distanze tra i punti e le coordinate dell'oggetto di riferimento. L'analisi spettrale della matrice di energia fornisce vettori ortogonali (le deformazioni principali o *principal warps*), ovvero costrutti matematici analoghi alle componenti principali. Dalle deformazioni principali vengono derivati i punteggi di deformazione parziale, o *partial warp scores*. Questi punteggi vengono riassunti in un vettore di lunghezza e quindi organizzati nella cosiddetta *Weight matrix (W)*, sulla quale sarà poi possibile eseguire le varie tecniche di analisi multivariata.

Oltre alle tecniche di morfometria geometrica, sarà applicata al campione l'analisi della matrice delle distanze euclidee (EDMA - Euclidean Distance Matrix Analysis, Lele & Richtsmeier 1995; 2001), al fine di garantire, come nei più moderni studi sulla forma, un approccio integrato e completo.

Gli stessi individui fotografati sono stati quindi colorati in toto e diafanizzati, e sottoposti alla conta dei caratteri meristici e all'analisi delle anomalie scheletriche. L'osservazione è stata condotta ad uno stereo microscopio WILD, su entrambi i lati del corpo.

I caratteri meristici considerati sono: le vertebre (incluso l'urostilo), gli elementi di sostegno interno delle pinne (epurali, ipurali, paraipurale, pterigiofori, radiali); i raggi delle pinne impari (dorsale, anale e caudale) e pari (pettorali e pelviche). I raggi duri o spine e i raggi morbidi della pinna dorsale sono stati contati separatamente, mentre quelli della pinna anale sono stati contati insieme; per i raggi della pinna caudale sono stati considerati i raggi principali superiori ed inferiori. Nelle conte meristiche sono state considerate anche le ossa predorsali.

Le diverse tipologie malformative sono state registrate utilizzando un riferimento dicotomico (vedi Tab. 3), nel quale la lettera indica la regione del corpo affetta da anomalie (dalla A ad L), mentre il numero indica il tipo di anomalia (da 1 a 29).

Le anomalie considerate gravi sono quelle la cui presenza altera la forma esterna del pesce e che possono compromettere le performances (alimentazione, nuoto).

E' attualmente in corso il secondo esame dei campioni (ogni rilevazione viene effettuata da 2 operatori diversi).

3) Analisi fisiologiche: Messa a punto del sistema di valutazione dello stato di immunocompetenza acquisito da orate alla fine della fase di allevamento larvale.

Il programma prevedeva la valutazione dello stato di immunocompetenza utilizzando una RT-PCR per evidenziare i geni dell'immunità innata. Nel corso di questo primo anno di attività ci si è resi conto, però, che sarebbe stato molto più utile ed indicativo dell'esistenza di differenze nell'immunità innata tra larve di orata allevate in Grandi Volumi e quelle allevate in intensivo, andare ad esaminare la presenza di differenze nell'attivazione dei geni dell'immunità innata, più che la presenza o meno dei geni stessi. Per questo motivo, si è deciso di andare ad analizzare i livelli di ROI (*Reactive Oxygen Intermediates*), che vengono normalmente prodotti durante processi infiammatori, infezioni batteriche o virali o in condizioni di stress ossidativo. Uno dei limiti che presenta questo tipo di approccio è che le analisi vanno effettuate su cellule vive, e quindi risulta necessario avere un Fluorimetro, lo strumento che legge i livelli di ROI, nell'impianto di Lampedusa. Il vantaggio risiede nel fatto che la lettura dei livelli di ROI non richiede protocolli sofisticati e quindi risulta facilmente praticabile in impianto.

A questo scopo, è stato acquistato un fluorimetro portatile (Bibby Scientific Italia srl, MODELLO 6270): nel periodo dicembre 2011-gennaio 2012 sono state effettuate una serie di misurazioni comparative utilizzando sullo stesso campione sia il fluorimetro portatile sia uno non portatile presente nella nostra Università, al fine di verificare l'attendibilità delle misurazioni effettuate con lo strumento portatile. Una volta accertata la possibilità di utilizzare lo strumento direttamente *in*

situ, sono state avviate una serie di prove per accertare la capacità di lettura dello strumento portatile su quantità molto ridotte di materiale al fine di individuare la taglia minima dei campioni per poter essere analizzati. Sono stati quindi effettuati una serie di prelievi di sangue da individui di tilapia (*Oreochromis niloticus*) di taglia via via decrescente e di omogeneizzati di pool di larve e giovanili di diversa taglia di cefali (*Mugil cephalus*), di cui abbiamo ampia disponibilità nel nostro Laboratorio. I risultati ottenuti hanno dimostrato la possibilità di misurare i ROI sia in quantità di sangue ridotte che su omogenati di pool di larve.

Tabella 3 - Legenda delle anomalie considerate. In grassetto sono evidenziate le anomalie gravi

REGIONE	A	Vertebre cefaliche (con coste epipleurali)	
	B	Vertebre pre-emali (con coste epipleurali e pleurali e con arco emale aperto, senza emaspina)	
	C	Vertebre emali (con arco emale chiuso da emaspina)	
	D	Vertebre caudali (con spine modificate in palette natatorie)	
	E	Pinna pettorale	
	F	Pinna anale	
	G	Pinna caudale	
	H	Regione dei raggi duri (spine) della pinna dorsale	
	I	Regione dei raggi morbidi (Iepidotrichi) della pinna dorsale	
	L	Pinna pelvica	
	TIPO	S	Scoliosi
		1	Lordosi
2		Cifosi	
3		Parziale fusione vertebrale	
3*		Fusione vertebrale completa	
4		Deformazione corpo vertebrale	
5		Arco neurale e/o neurospina anomala	
5*		Arco neurale e/o neurospina soprannumeraria	
6		Arco emale e/o emaspina anomalo/a	
6*		Arco emale e/o emaspina soprannumeraria	
7		Costa pleurale deformata	
7*		Costa pleurale soprannumeraria	
7		Raggio anomalo (deformato, assente, fuso, soprannumerario)	
8		Pterigioforo deformato (assente, fuso, soprannumerario)	
9		Ipurale anomalo (deformato, assente, fuso, soprannumerario)	
9*		Paraipurale anomalo o fuso oppure spezzato e fuso con ipurale o con emaspina	
10		Epurale anomalo (deformato, assente, fuso, soprannumerario)	
11		Raggio anomalo(deformato, assente, fuso, soprannumerario)	
12		Assenza di vescica natatoria	
13		Presenza di calcoli nei dotti urinari	
14		Mascellare o premascellare anomalo	
15		Dentale anomalo	
16		Altre anomalie craniali (glossoiale/neurocranio)	
17sx		Opercolo sinistro deformato o ridotto	
17dx		Opercolo destro deformato o ridotto	
17*sx		Raggi branchiostegi di sinistra deformati, assenti o fusi	
17*dx		Raggi branchiostegi di destra deformati, assenti o fusi	
18		Osso predorsale anomalo	
19		Ipurale con decalcificazioni	
20		Pterigiofori con decalcificazioni	
21		Setto intercostale	
22		Spine miosettali dorsali anomale	
23		Spine miosettali ventrali anomale	
24sx		Piastra opercolare sinistra con decalcificazioni	
24dx		Piastra opercolare destra con decalcificazioni	
25		Epurale decalcificato	
26		Ossificazione soprannumeraria	
27		Urostilo decalcificato	
28		Difetti di ossificazione di vertebre	
29		Post cleitro deformato	
Cl sx	Cleitro sinistro anomalo		
Cl dx	Cleitro destro anomalo		
Cor sx	Coracoide sinistro anomalo		
Cor dx	Coracoide destro anomalo		

Bibliografia citata

Bookstein F.L. (1991) *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. Cambridge University Press, Cambridge.

Lele S. & Richtsmeier J.T. (2001) *An invariant approach to statistical analysis of shapes*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton.

Lele S. & Richtsmeier J.T. (1995) Euclidian Distance Matrix Analysis: Confidence intervals for form and growth differences. *American Journal of Physical Anthropology* 98(1), 73-86.

Perez S.I., Bernal V.& Gonzalez P.N. (2006) Differences between sliding semilandmark methods in geometric morphometrics, with an application to human craniofacial and dental variation. *Journal of Anatomy* 208(6), 769-784.

Rohlf F.J. (2006) *TpsDig Ver. 2.10, Digitalized Landmarks and Outlines*. Department of Ecology and Evolution, Stony Brook, State University of New York.

Rohlf, F.J. & Slice, D. (1990). Extension of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* 39, 40–59.

Zelditch M.L., Swiderki D.L., Sheets H. D. & Fink W.L. (2004) *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. Elsevier, Academic Press, San Diego, CA.